



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS**  
**VEGETAIS - PPGRGV**

**LARISSA SIMÕES CERQUEIRA BISPO**

**ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Eriope***  
***blanchetii* (Benth.) Harley PARA QUANTIFICAÇÃO DA**  
**PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA**

Feira de Santana - BA

2019

**LARISSA SIMÕES CERQUEIRA BISPO**

**ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Eriope blanchetii* (Benth.) Harley PARA QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach

Co-orientador: Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani

Feira de Santana - BA

2019

**Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS**

B531e Bispo, Larissa Simões Cerqueira  
Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Eriope blanchetii* (Benth.)  
Harley para quantificação da produção de podofilotoxina / Larissa Simões  
Cerqueira Bispo . - 2019.  
74 f.: il.

Orientador: Alessandra Selbach Schnadelbach.

Coorientador: Moema Cortizo Bellintani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2019.

1. *Eriope blanchetii*. 2. Planta medicinal. I. Schnadelbach, Alessandra  
Selbach, orient. II. Bellintani, Moema Cortizo, coorient. III. Universidade  
Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.929.4

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Nazaré Guimarães Marchi  
Instituto Federal Baiano

---

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão  
Universidade Estadual de Feira de Santana

---

Profa. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach  
Orientadora e Presidente da Banca  
Universidade Federal da Bahia

## AGRADECIMENTOS

“Mais importante do que a chegada é a caminhada, e não há caminho sem metamorfose.”

Kamila Behling

E, por isso, eu deixo minha gratidão a todos que estiveram ao meu lado nesses dois anos de transformação:

Aos presidentes Lula e Dilma que, ao popularizar a Educação Superior, tornaram a universidade acessível para muitos jovens que, como eu, anteriormente não conseguiriam se imaginar pertencendo a uma realidade acadêmica.

Às minhas orientadoras por, generosamente, terem compartilhado seu tempo e conhecimentos. A Moema Bellintani (Mó) pela orientação de anos, pelo incentivo constante e por sempre estar disposta a ouvir e comprar minhas ideias loucas. A Alessandra Schnadelbach (Alê) por prontamente acreditar em mim e no meu projeto e pelo compromisso constante com a orientação.

A minha família por ser a base de tudo. Aos meus pais Vivaldo e Lourdes que, mesmo sem entender, apóiam minhas escolhas profissionais e vibram a cada conquista. A minha irmã Louise por sempre estar com um sorriso acolhedor me amparando em todos os momentos, por se importar, por ser a melhor beneficiadora de sementes que as plantas medicinais já viram, por ser, muito além de um título, a minha irmã. E a tia Deni por ser abrigo e refúgio.

A Nathani, por estar ao meu lado durante todo o caminho, por tocar primeiro nos espinhos, me impedindo de os sentir. Obrigada por aguentar meu choro, meus risos de pânico, meus dramas. Obrigada por ser minha companheira!

À família que a vida me deu, meus amigos. Em especial aos meus meninos do teatro, Victor, Marcelo e Augusto, por esses 17 anos dividindo os palcos da vida. A Daiana, por ser minha dupla na Biologia, nos sushis e nos venenos. A Quaresma, pela parceria durante as coletas, obrigada por ter rido todas as vezes que rolei duna abaixo, isso tornou tudo mais leve.

Aos queridos Biólogos da turma de Ciências Biológicas 2010.2 - UFBA, por tornarem a caminhada mais leve e por sempre trazerem o Pérgola. Aos futuros mestres em Recursos Genéticos Vegetais da turma de 2017.1 – UEFS, por todos os dias de luta (durante as disciplinas do curso) e de glória (no 4 Estações).

Aos companheiros de bancada do Laboratório de Cultura de Tecidos - UFBA, em especial a Sunshine, Kaique e Isabela (pudim) pelas incontáveis horas montando e desmontando experimentos e, o mais importante, por me aceitarem como tutora.

Ao querido Jota, pela paciência e disponibilidade em ser meu tutor e companheiro de bancada durante as análises fitoquímicas. E a professora Juceni David por abrir as portas de seu laboratório.

A todos os professores da UFBA e UEFS que contribuíram imensamente com a minha formação profissional. Em especial, a Nora Ney por ter sido a primeira a abrir as portas dentro da universidade para mim, me incentivando a seguir vida acadêmica. Aos funcionários e servidores da UFBA e UEFS, por manterem a universidade funcionando, sem eles seria impraticável desenvolver ciência e conhecimento.

À Universidade Estadual de Feira de Santana e ao programa de Recursos Genéticos Vegetais por ter me escolhido e acolhido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E incentivado financeiramente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

*Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.*

(Marie Curie)

## RESUMO

As lignanas, classe de metabólitos secundários de grande significado biológico, são encontradas em algumas espécies da família Lamiaceae. Dentre as várias espécies da família, destaca-se *Eriope blanchetii*, endêmica do Brasil, ocorrendo nas restingas da Bahia e Sergipe. O valor medicinal desta espécie já foi comprovado por estudo fitoquímico e de citotoxicidade, no qual foi detectado a presença de podofilotoxina, metabólito secundário precursor de dois derivados semissintéticos (etoposide e teniposide) que possuem efeito anticâncer. Considerando que a espécie foi categorizada como vulnerável, e levando-se em conta que a biossíntese de metabólitos secundários *in natura* apresenta larga variação em decorrência das condições ambientais, destaca-se o emprego da tecnologia de cultura de tecidos vegetais. Desta forma, este trabalho teve como objetivo geral estabelecer o cultivo de *E. blanchetii in vitro* e analisar a influência de fatores abióticos na expressão de podofilotoxina durante o cultivo *in vitro*. Foram testados diferentes protocolos de desinfestação, germinação, conservação e quebra de dormência de sementes, bem como a influência da concentração de sais no meio de cultura para o estabelecimento *in vitro*. Um novo protocolo de desinfestação de sementes foi proposto para *E. blanchetii*, composto por uma etapa pré-germinativa (a nível de semente) e outra pós-germinativa (a nível de planta). O protocolo mais eficiente para a superação da dormência de sementes foi a embebição em solução de giberelina 200mg.L<sup>-1</sup> por 1h. As sementes de *E. blanchetii* podem ser conservadas a -80°C por até 90 dias sem comprometer o seu potencial germinativo. A produção de maior quantidade de matéria fresca e seca de *E. blanchetii* pode ser obtida utilizando-se o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com carvão ativado 2g.L<sup>-1</sup>. Para a multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii*, explantes da região do nó foram submetidos a diferentes condições de cultivo *in vitro*, a fim de estimular a superprodução de podofilotoxina. Os melhores dados de enraizamento foram obtidos na ausência de reguladores. Para o desenvolvimento da parte aérea, matéria fresca e seca, recomenda-se o uso de 8,88µM de BAP. A temperatura ideal para a multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii* é 25 °C. As condições de cultivo *in vitro*, assim como os fatores abióticos empregados como fonte de estresse, inviabilizaram a expressão da podofilotoxina em *E. blanchetii*.

**Palavras-chave:** CLAE. Elicitação. Lamiaceae. Metabólitos Secundários. Planta Medicinal.

## ABSTRACT

The lignans, are a secondary metabolites class with great biological importance, which are found in some species of the Lamiaceae family. Among the species variety within this family, the outstanding *Eriope blanchetii*, endemic of Brazil, occurs on the restingas from Bahia and Sergipe. The medicinal value of this species was already proven by a phytochemical and cytotoxic study, on which was detected podophyllotoxin presence, a secondary metabolite that is a precursor of two semisynthetic derivatives (etoposide and teniposide) with an anticancer effect. Considering the vulnerable status given to this species, and being aware that the *in natura* the biosynthesis of secondary metabolites presents a large variation due to the environmental conditions, the use of vegetal tissues culture technology is here highlighted. Thus, this work aimed to establish *E. blanchetii in vitro* cultivation and analyze abiotics factors that might influence over podophyllotoxin expression after the *in vitro* cultivation. Different desinfestation, germination, conservation and seed dormancy breaking protocols were tested, as well as the salts concentrations influence during the *in vitro* establishment culture medium. Also, a new seeds desinfestation protocol was proposed for *E. blanchetii*, that was composed by a pre-germinative stage (at a seed level) and a pos-germinative stage (at a plant level). The most efficient protocol for overcoming seed dormancy procedure was the gibberellin solution at 200mg.L<sup>-1</sup> soaking for 1h. The *E. blanchetii* seeds can be preserved at -80°C for up to 90 days without compromising its germination potential. The biggest matter production of *E. blanchetii* can be obtained by the use of a MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) culture medium supplemented with active charcoal 2g.L<sup>-1</sup>. For *in vitro* multiplication of *E. blanchetii*, node regions explants were submitted to different *in vitro* cultivation conditions, aiming to stimulate a overproduction of podophyllotoxin. The best rooting data were obtained in the absence of regulators. For the aerial parts, fresh matter and dry matter development, the use of 8,88µM of BAP is recommended. The ideal temperature for *E. blanchetii in vitro* multiplication is 25°C. Finally, the *in vitro* cultivation conditions, as well as the abiotic factors used as a stress source, made the podophyllotoxin expression on *E. blanchetii* impossible.

**Key-words:** Elicitation. HPLC. Lamiaceae. Medicinal plants. Secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Distribuição geográfica no Brasil de *Eriope blanchetii*. Fonte: CNC FLORA, 2012.  
..... 12
- Figura 2.** Ramo de *Eriope blanchetii* com inflorescência. Parque das Dunas, Salvador – BA. A escala na figura representa 1cm. Autor: QUARESMA, L.G.P ..... 13
- Figura 3.** Estruturas químicas da podofilotoxina e seus derivados semissintéticos. Fonte: BRANDÃO et al., 2010..... 13

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Estruturas químicas da podofilotoxina e seus derivados semissintéticos. Fonte: BRANDÃO et al., 2010..... 23
- Figura 2.** Porcentagem de Contaminação, Germinação e Sobrevivência nos diferentes tratamentos de desinfestação de sementes de *E. blanchetii* durante o estabelecimento *in vitro*.  
..... 32

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Estruturas químicas da podofilotoxina e seus derivados semissintéticos. Fonte: BRANDÃO et al., 2010..... 41
- Figura 2.** Cromatogramas de alguns extratos de *E. blanchetii* (a, b, c, d, e) e padrão da podofilotoxina (f)..... 51

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Métodos de superação de dormência aplicados visando o estabelecimento *in vitro* de *E. blanchetii*.....26
- Tabela 2.** Métodos de desinfestação aplicados visando o estabelecimento *in vitro* de *E. blanchetii*.....27
- Tabela 3.** Valores médios de germinabilidade (G%), tempo médio de germinação, em dias, (TM) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes *Eriope blanchetii* em função dos diferentes tratamentos para quebra de dormência.....29
- Tabela 4.** Valores médios de germinabilidade (%) de sementes *Eriope blanchetii* em função do ambiente de conservação (sílica, -20 °C, e -80 °C) e tempo de armazenagem (30, 90, 180 e 360 dias).....33
- Tabela 5.** Valores médios de número de folhas, matéria fresca (g) e seca (g) de plantas de *Eriope blanchetii*, em função da presença e ausência de carvão ativado no meio de cultura...34
- Tabela 6.** Valores médios de matéria seca (g) de plantas de *Eriope blanchetii*, em função do meio de cultura.....34

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Composição da fase móvel durante os diferentes tempos de corrida. Ácido acético 2% (solvente A), metanol (solvente B) e acetonitrila (solvente C) grau HPLC.....45
- Tabela 2.** Valores médios de nº de raízes, comprimento da raiz (mm), nº de brotos, comprimento da parte aérea (mm) e nº de folhas de *Eriope blanchetii* cultivada *in vitro* em função das diferentes concentrações dos reguladores vegetais ANA e BAP ( $\mu\text{M}$ ).....46
- Tabela 3.** Valores médios de matéria fresca (g) e matéria seca (g) de *Eriope blanchetii* em função das diferentes concentrações dos reguladores vegetais ANA e BAP ( $\mu\text{M}$ ).....49
- Tabela 4.** Valores médios, nº de raízes, nº de brotos, nº de folhas, comprimento da raiz (mm), comprimento da parte aérea (mm), matéria fresca (g) e matéria seca (g) de *Eriope blanchetii* cultivadas em 25 ou 30° C.....49
- Tabela 5.** Valores de matéria seca (g) e extrato (g) de *E. blanchetii* em função das diferentes condições de cultivo.....50

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	17
<b>CAPÍTULO 1: CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Eriope blanchetii</i> (Benth.) Harley, PLANTA DE IMPORTÂNCIA MEDICINAL ENDÊMICA DA RESTINGA DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL</b> .....	21
<b>1.1 Introdução</b> .....	23
<b>1.2 Material e Métodos</b> .....	25
<b>1.3 Resultados e Discussão</b> .....	29
<b>1.4 Conclusões</b> .....	34
<b>Referências</b> .....	35
<b>CAPÍTULO 2: MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Eriope blanchetii</i> (Benth.) Harley, PARA QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA</b> .....	39
<b>2.1 Introdução</b> .....	41
<b>2.2 Material e Métodos</b> .....	43
<b>2.3 Resultados e Discussão</b> .....	45
<b>2.4 Conclusões</b> .....	52
<b>Referências</b> .....	53
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	56
<b>APÊNDICES</b> .....	58
<b>ANEXOS</b> .....	73

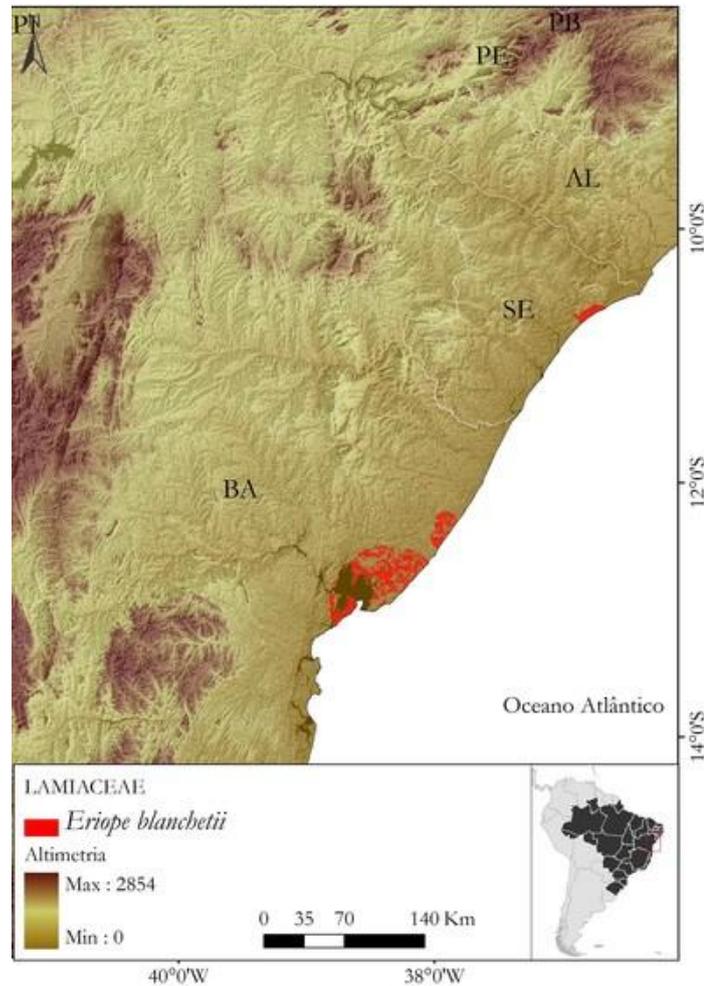
## INTRODUÇÃO GERAL

A prática de identificação e manipulação das plantas medicinais acompanhou a evolução do homem. Ao longo do tempo, os métodos de extração de compostos de interesse medicinal aumentaram e se modificaram e, cada vez mais, têm assumido um papel fundamental na descoberta de tratamentos das mais variadas doenças. Porém, somente cerca de 15% das espécies vegetais foram estudadas do ponto de vista químico, e apenas 6% do ponto de vista farmacológico (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Em meio às plantas de importância medicinal, a família Lamiaceae tem sido reconhecida pela existência de inúmeras espécies utilizadas em decorrência do seu potencial aromático e medicinal. Esse potencial é devido à presença de metabólitos secundários, produzidos densamente nos caules e folhas dos seus representantes (MATOS, 2002). Dentre os metabólitos secundários característicos dessa família, um grupo de grande significado biológico é formado pelas lignanas, com ocorrência relatada por Brandão e colaboradores (2010) nos gêneros *Phlomis* L., *Vitex* Tour. ex L., *Mosla* (Benth.) Buch.-Ham. ex Maxim., *Hyptis* Jacq. e *Eriope* Humb. & Bonpl. ex Benth., e por Meira e colaboradores (2017) no gênero *Leptohyptis* Harley & J.F.B.Pastore.

O gênero *Eriope* possui cerca de 40 espécies (SILVA-LUZ et al., 2012), sendo 28 endêmicas do Brasil (FLORA DO BRASIL 2020, 2019). Ainda de acordo com estes autores, o gênero se caracteriza por plantas do tipo arvoretas, arbustos, subarbustos ou ervas perenes, frequentemente aromáticas, presença de inflorescência com flores de corola violeta ou lilás. Com ampla distribuição, ele é encontrado nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL 2020, 2019).

Dentre as várias espécies do gênero, destaca-se *Eriope blanchetii* (Benth.) Harley, endêmica do Brasil, que ocorre nas restingas da Bahia e Sergipe (Figura 1) (HARLEY et al., 2015). *E. blanchetii* é um arbusto que varia de 0,5 a 4,3 m de altura, sendo comum na sucessão de dunas, provavelmente como resultado do seu mecanismo de dispersão de sementes, uma combinação de balística e auxílio do vento (MORAWETZ, 1983).



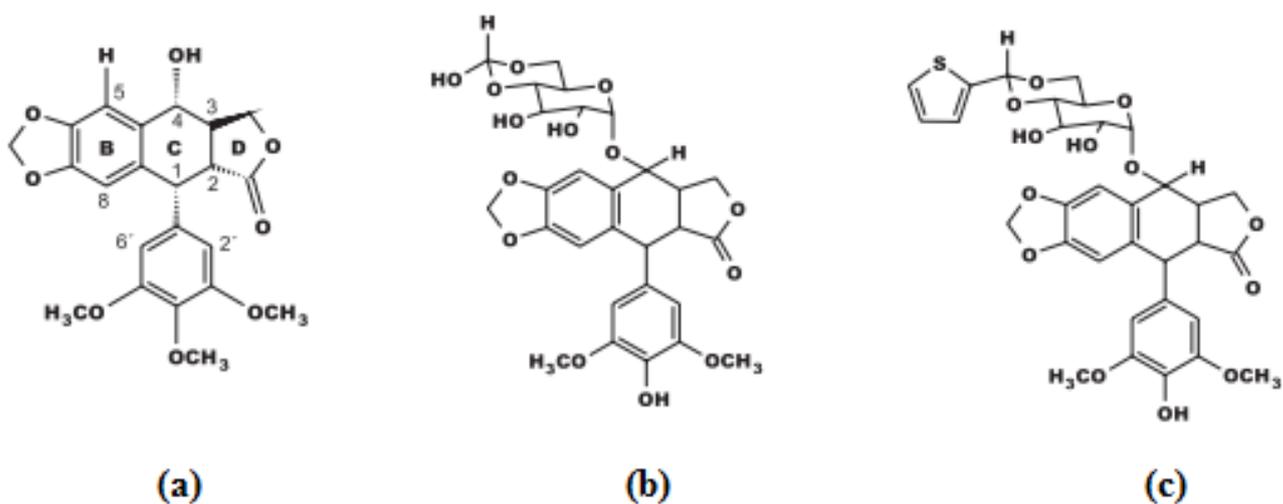
**Figura 1.** Distribuição geográfica no Brasil de *Eriope blanchetii*. Fonte: CNC FLORA, 2012.

Segundo Silva e colaboradores (2005), *E. blanchetii* (Figura 2) possui flores lilases, gamopétalas, com simetria bilateral e, além disso, apresenta um lábio inferior que, ao servir como plataforma para os visitantes florais, deixa expostas as anteras, de forma a otimizar a polinização. A floração é contínua ao longo de todo o ano, com variação de intensidade nos picos de produção de gemas (VIANA, 1999). Apesar de estar presente em uma unidade de conservação (Área de Proteção Ambiental das Lagoas e Dunas de Abaeté) e, entre as espécies arbóreas e arbustivas da restinga do Abaeté apresentar a sexta maior densidade (VIANA et al., 2006), a espécie foi categorizada como "Vulnerável" (VU) em decorrência da pequena dimensão e vulnerabilidade do ambiente de ocorrência (CNC FLORA, 2012).



**Figura 2.** Ramo de *Eriope blanchetii* com inflorescência. Parque das Dunas, Salvador – BA. A escala na figura representa 1cm. Autor: QUARESMA, L.G.P.

O potencial medicinal de *E. blanchetii* foi comprovado por David e colaboradores (2001) através de um estudo fitoquímico e de citotoxicidade do extrato clorofórmico das partes aéreas da espécie. Nesse estudo, demonstrou-se a presença de podofilotoxina (Figura 3a).



**Figura 3.** Estruturas químicas da podofilotoxina e seus derivados semissintéticos. Fonte: BRANDÃO et al., 2010.

Conforme relatado por Kitamura e colaboradores (2009), acredita-se que as lignanas, grupo ao qual pertence a podofilotoxina, desempenham atividade de defesa e regulação do crescimento nos vegetais. Os compostos desse grupo diferem entre si pela substituição nos grupos arila, e são justamente essas diferenças estereoquímicas que garantem a diversidade de atividade biológica desempenhada: antiviral, antifúngica, imunossupressora, antiasmática, antioxidante e citotóxica (KITAMURA et al., 2009). A podofilotoxina se destaca por ser uma lignana ariltetralínicas com atividade citotóxica e efeito anticâncer (MEDRADO et al., 2015).

Nas células animais, a podofilotoxina causa interrupção da mitose e consequente morte da célula, isso se dá através da forte ligação desta com a tubulina, subunidade dos microtúbulos (BRANDÃO et al., 2010). Atualmente, devido aos seus efeitos secundários sobre o sistema gastrointestinal, rins, fígado e sistema nervoso central, esse composto não é utilizado na sua forma natural (BRANDÃO et al., 2017).

Desta forma, nos estudos atuais, a podofilotoxina é utilizada como material de partida para os derivados semissintéticos: etoposido [4-dimetil -7 (4,6-O-etilideno  $\beta$ -D-glicopiranosil epipodofilotoxina)] (Figura 3b) e teniposido [4-dimetil-7-(4,6-O-tenilideno- $\beta$ -D-glicopiranosil epipodofilotoxina)] (Figura 3c), que apresentam menor toxicidade e por isso foram introduzidos no tratamento clínico do câncer (BRANDÃO et al., 2010). Da mesma maneira que a podofilotoxina, os seus derivados também desempenham efeito anticâncer; contudo, através de outro mecanismo: eles se ligam à topoisomerase II, presente no início da fase G2, impedindo que essa enzima repare a fita de DNA, atuando, assim, como um bloqueio pré-mitótico (BRANDÃO et al., 2010).

Apesar da eficácia de muitas plantas medicinais já ter sido comprovada cientificamente, a extração de seus metabólitos secundários não é eficiente; além disso, muitas dessas plantas não possuem uma forma de cultivo estabelecida (OCHOA-VILLARREAL et al., 2016) a biossíntese de metabólitos secundários *in natura* é frequentemente baixa, e sua síntese depende das condições ambientais (ESPINOSA-LEAL et al., 2018). De acordo com Paul e Ma (2011), tratos culturais como as técnicas de plantio, de adubação, a época e a forma de colheita também têm sua importância tanto na formação de biomassa como na quantidade de princípios ativos produzidos.

A fim de solucionar esses problemas, destaca-se o emprego da tecnologia de cultura de tecidos vegetais, na qual se trabalha em um ambiente estéril, com linhagens de plantas selecionadas, cujos produtos resultantes do metabolismo secundário podem ser produzidos sob

condições físicas apropriadas e padronizadas (GIACOMETTI, 1990). A propagação de plantas *in vitro* ou a cultura de partes das plantas, normalmente raízes ou calos, produz material de qualidade e capaz de expressar metabólitos secundários de importância farmacêutica (ESPINOSA-LEAL et al., 2017). É justamente por possibilitar maior controle sobre as rotas biossintéticas, permitir a seleção de variantes mais desejadas, e ser independente dos fatores ambientais, que a técnica de cultura de tecidos vem ocupando espaço no campo da manipulação e produção de metabólitos secundários (ALTPETER et al., 2016).

Em relação à obtenção de compostos de interesse farmacêutico, por meio da cultura de tecidos vegetais *in vitro* pode-se otimizar a produção de metabólitos secundários ao propiciar a superexpressão dos mesmos, em um curto período de cultivo. Isso representa uma grande vantagem em relação às plantas obtidas *in situ*, nas quais o espaço de tempo para a produção e acúmulo desses metabólitos pode variar entre espécies, dentro da espécie, de acordo com o ciclo de desenvolvimento da planta, e principalmente em resposta ao ambiente (SANTOS et al., 2007).

Entretanto, para produção *in vitro* de metabólitos de interesse é necessário levar em conta inúmeros fatores, pois estes estão diretamente ligados tanto ao sucesso da cultura quanto à expressão do metabolismo secundário da planta (ESPINOSA-LEAL et al., 2017). Por exemplo, para o crescimento da planta e acúmulo de metabólitos secundários é crucial determinar uma concentração ótima de nutrientes no meio de cultura (MONFORT et al., 2018). Para o estabelecimento de qualquer cultura deve-se levar em conta pontos chave como o tipo de meio de cultura utilizado, a composição salina deste e a fonte energética (MONFORT et al., 2018).

Dentre os diversos tipos de meio existente o Murashige & Skoog (MS) (1962) é o mais utilizado (ESPINOSA-LEAL et al., 2018). Em sua fórmula original, o meio MS possui uma alta concentração salina (RAHMAN et al., 2015), porém já foi demonstrado que diferentes concentrações salinas do meio MS influenciam o crescimento de diferentes formas, a depender da espécie em estudo (SINGH et al., 2015). De forma geral, o meio MS quando com metade da concentração de sais (MS/2), ou um quarto (MS/4), estimula a produção de raízes (SHEKHAWAT et al., 2015).

Outro elemento que pode influenciar o desenvolvimento da cultura é a concentração e o tipo de regulador vegetal (MONFORT et al., 2018). Os reguladores vegetais podem afetar a produção de metabólitos secundários, ao passo que desempenham funções promotoras no metabolismo vegetal (SILVESTRINI et al., 2002). Em uma revisão de 2018, Jamwal e colaboradores apresentaram alguns estudos sobre a produção de metabólitos secundários *in vitro*

utilizando diferentes reguladores de crescimento. Nesse trabalho, há uma extensa lista que relaciona os reguladores vegetais acrescido ao cultivo *in vitro* das plantas com os metabólitos secundários por elas expressos. Em adição, os autores salientam a necessidade de uma pesquisa intensiva para a produção dos altos rendimentos requeridos para utilização comercial dos metabólitos secundários, principalmente os relacionados com a saúde humana.

Dentre as estratégias para produção de metabólitos *in vitro* destaca-se a elicitação, que representa um dos métodos de baixo custo com maior êxito (LEE; SHULER, 2000). A técnica consiste em expor a cultura a um estresse, por meio de um indutor/elicitor químico ou físico, propiciar a produção de metabólitos secundários que não são produzidos frequentemente, ou que são produzidos apenas em baixas quantidades (DONG; ZHONG, 2001). Isso pode ser realizado através de elicitores bióticos (reguladores vegetais, micélios de fungos patogênicos, vários extratos de proteínas) ou elicitores abióticos (temperatura, luz, metais pesados, pH, etc.) (WANG; ZHONG, 2002; HU et al., 2001). Vale ressaltar que a adequada seleção do elicitor vai depender do metabólito de interesse e da planta em estudo (ESPINOSA-LEAL et al., 2018).

Desse modo, a utilização da biotecnologia em plantas, tais como o estabelecimento *in vitro*, a elicitação, a cultura de células e tecidos vegetais, pode resolver ou minimizar alguns dos problemas presentes na produção *ex vitro*, assim como as pressões geradas no ambiente. Essas 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 sintetizados artificialmente (NICOLAU et al., 1994).

Em adição, o cultivo *in vitro* evita a exploração desordenada e intensa dos recursos naturais, permitindo a preservação do meio ambiente (PETROVICK et al., 1997). Isso se faz importante uma vez que a produção e o cultivo de plantas medicinais ainda são inexpressivos para a maioria das espécies nativas, de forma que há uma prevalência do processo de coleta extrativista, o que é a causa de erosão genética para muitas espécies endêmicas (SOUZA et al., 2011). Nesse contexto, estudos e metodologias que viabilizem e otimizem a produção de plantas medicinais e de seus metabólitos em escala comercial são certamente estratégias que podem reduzir o impacto da devastação da flora nativa.

Posto isso, estudos com *E. blanchetii in vitro* se justificam pela disponibilidade limitada de fontes naturais da planta, pela possibilidade de potencializar a produção de podofilotoxina através da composição do meio nutritivo e suplementos a ele adicionados, bem como pelas condições físicas de cultivo, independência dos fatores ambientais que podem influenciar na

quantidade e qualidade da podofilotoxina, e cumprimento mais fácil das altas demandas de produção.

Por fim, estudos que visam à conservação do germoplasma de espécies medicinais nativas vêm crescendo nos últimos anos, principalmente em decorrência do grande potencial econômico destas espécies (SOUSA, 2015). O armazenamento de sementes visa prolongar a viabilidade das mesmas possibilitando sua conservação em bancos de germoplasma ou até mesmo o seu uso futuro para fins econômicos ou ambientais (SILVA; FERRAZ, 2015). Vários fatores contribuem para o aumento do período de longevidade das sementes, dentre os quais se destaca a temperatura de armazenamento (SILVA; FERRAZ, 2015). A temperatura afeta diretamente a velocidade das reações químicas, e sua redução, conforme características próprias de cada espécie, pode beneficiar a conservação das sementes (MARCOS FILHO, 2015).

Portanto, o presente trabalho tem por objetivo geral o estabelecimento *in vitro* de *Eriope blanchetii* a fim de analisar a influência de reguladores vegetais e de fatores abióticos na produção de podofilotoxina durante o cultivo *in vitro*, além da conservação de sementes visando contribuir para a conservação do germoplasma desta espécie.

## REFERÊNCIAS

- ALTPETER, F. et al.. Advancing crop transformation in the era of genome editing. **Plant Cell**, v. 28, p. 1510-1520, 2016.
- BRANDÃO, H. N. et al.. Química e farmacologia de quimioterápicos e antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRANDÃO, H. N. et al.. Determination of podophyllotoxin and related aryltetralin lignans by HPLC/DAD/MS from Lamiaceae species. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 179-184, 2017.
- CNC FLORA. ***Eriope blanchetii* in Lista Vermelha da flora brasileira**. Centro Nacional de Conservação da Flora, 2012. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Eriope blanchetii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Eriope%20blanchetii)>. Acesso em: 23/10/2016.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- DAVID, J. P. et al.. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.
- DONG, H. D.; ZHONG, J. J. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 145-150, 2001.

ESPINOSA-LEAL, C.A. et al.. **Cultivo *in vitro* como alternativa para la producción de metabolitos**. 2017. 98f. Tese de Doutorado - Editorial Académica Española, 2017.

ESPINOSA-LEAL, C. A. et al.. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, p. 1-18, 2018.

FLORA DO BRASIL 2020. **Eriope in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8138>>. Acesso em: 03/02/2019.

GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, p.19-28, 1990.

HARLEY, R. et al.. **Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8142>>. Acesso em: 19/07/2016.

HU, W. W. et al.. Improvement of *Panax notoginseng* cell cultures for production of ginseng saponin and polysaccharide by high-density cultivation of pneumatically agitated bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 838-846, 2001.

JAMWAL, K. et al.. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of applied research on medicinal and aromatic plants**, v. 9, p. 26-38, 2018.

KITAMURA, M. et al.. Asymmetric [2,3]-Wittig Rearrangement of Oxygenated Allyl Benzyl Ethers in the Presence of a Chiral di-tBu-bis(oxazoline) Ligand: A Novel Synthetic Approach to THF Lignans. **Chemistry a European Journal**, v. 15, p. 9911-9917, 2009.

LEE, C. W. T.; SHULER, M. L. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. **Biotechnology bioengineering**, v. 67, p. 61-7, 2000.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2 ed, 2015. 660 p.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais - guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Imprensa Universitária / Edições UFC, Fortaleza, 2002. 344 p.

MEDRADO, H. H. S. et al.. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015.

MEIRA, P. R. et al.. Abiotic factors influencing podophyllotoxin and yatein overproduction in *Leptohyptis macrostachys* cultivated in vitro. **Phytochemistry Letters**, v. 22, p. 287-292, 2017.

MONFORT, L. E. F. et al.. Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 231-239, 2018.

MORAWETZ, W. Dispersal and succession in an extreme tropical habitat: coastal sands and xeric woodland in Bahia (Brazil). **Sonderbd Naturwiss**, v. 7, p. 359-380, 1983.

- 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.
- NICOLAU, K. C. et al.. Total synthesis of taxol. **Nature**, v. 367, p. 630-634, 1994.
- OCHOA-VILLARREAL, M. et al.. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v. 49, p. 149-158, 2016.
- PAUL, M.; MA, J. K. C. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 58, p. 58-67, 2011.
- PETROVICK, P. R. et al.. From a medicinal plant to a hydroalcoholic dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Natural Products Research in Brazil**. v. 49, n. 5/6, p. 364-368, 1997.
- RAHMAN, Z. A. et al.. *In vitro* micropropagation of a valuable medicinal plant *Plectranthus amboinicus*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1091-1097, 2015.
- SANTOS, A. S. et al.. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Revista Brasileira Farmacologia**, v. 17, p. 538-541, 2007.
- SHEKHAWAT, M.S. et al.. *In vitro* propagation of traditional medicinal and dye yielding plant *Morinda coreia* Buch.–Ham. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 43–50, 2015.
- SILVA, A.; FERRAZ, I. D. K. Armazenamento de sementes. In: PINÃ-RODRIGUES, F. C. M. et al. **Sementes Florestais: da ecologia à produção**. Londrina: ABRATES, p. 276-307, 2015.
- SILVA, F. O. da et al.. Floral biology os *Eriope blanchetii* (Lamiaceae) in coastal sand dunes of NE Brazil. **Austral Ecology**, v. 30, p. 243-249, 2005.
- SILVA-LUZ, C. L. da et al.. Flora da Serra do Cipó. **Boletim de Botânica**, Universidade de São Paulo, v. 30, n. 2, p. 109-155, 2012.
- SILVESTRINI, A. et al.. Effect of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 749-753, 2002.
- SINGH, A. et al.. Efect of MgCl<sub>2</sub> and double con- centration of Murashige and Skoog medium on *in vitro* plantlet and root cultures generation in halophytic grasswort *Salicornia brachiata*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 129, p. 501-510, 2015.
- SOUZA, A. V. et al.. Conservação e enraizamento in vitro de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.13, p. 319 -327, 2011.
- SOUSA, F. P. **Micropropagação de Hyptis ramosa Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)**. 2015. 63f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- VIANA, B. F. **Biodiversidade da Apifauna e Flora apícola das dunas litorâneas da APA das Lagoas e Dunas de Abaeté, Salvador, Bahia: Composição, fenologia e suas interações**. 1999. 171f. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- VIANA, B. F. et al.. Flora apícola de uma área restrita de dunas litorâneas, Abaeté, Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 13-25, 2006.

WANG, Z. Y; ZHONG, J. J. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 93-97, 2002.

**CAPÍTULO 1: CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO *in vitro* DE  
*Eriope blanchetii* (Benth.) Harley, PLANTA DE IMPORTÂNCIA MEDICINAL  
ENDÊMICA DA RESTINGA DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> A ser publicado na Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - RBPM

## RESUMO

Pertencente à família Lamiaceae, *Eriope blanchetii* já teve seu potencial medicinal comprovado pela presença de podofilotoxina nos extratos de suas partes aéreas. Este metabólito secundário se destaca por ser uma lignana ariltetralínica precursora de dois derivados semissintéticos (etoposide e teniposide) que possuem efeito anticâncer. A produção e o cultivo de plantas medicinais como *Eriope blanchetii* ainda são inexpressivos para a maioria das espécies nativas, de forma que há uma prevalência do processo de coleta extrativista. Neste contexto, destaca-se a cultura de tecidos vegetais, que pode atuar visando o aumento e o direcionamento da propagação de plantas superiores, além da produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico. Em vista disto, o presente trabalho tem por objetivo obter o protocolo de estabelecimento *in vitro* da espécie *E. blanchetii* além da conservação de sementes visando contribuir para a conservação do germoplasma desta espécie. Para tanto, foram testados diferentes protocolos de desinfestação, germinação, conservação e quebra de dormência de sementes, bem como a influência da concentração de sais no meio de cultura para o estabelecimento *in vitro*. Um novo protocolo de desinfestação de sementes foi proposto para *E. blanchetii*: fase pré-germinativa, a nível de semente (álcool 70% por 2 min. + hipoclorito de sódio 2,5% por 15 min. + lavagem tripla em água destilada autoclavada); fase pós-germinativa, a nível de planta (álcool 70% por 2 min. + hipoclorito de sódio 2,5% por 10 min. + lavagem tripla em água destilada autoclavada). O protocolo mais eficiente para a superação da dormência de sementes foi a embebição em solução de giberelina 200mg.L<sup>-1</sup> por 1h. As sementes de *E. blanchetii* podem ser conservadas a -80°C por até 90 dias sem comprometer o seu potencial germinativo. A produção de maiores quantidades de matéria fresca e seca de *E. blanchetii* pode ser obtida utilizando-se o meio de cultura MS suplementado com carvão ativado 2g.L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** Conservação de Sementes. Desinfestação. Lamiaceae. Superação de dormência.



etilideno  $\beta$ -D-glicopiranosil epipodofilotoxina)] (Figura 1b) e o teniposido [4-dimetil-7-(4,6-O-tenilideno- $\beta$ -D-glicopiranosil epipodofilotoxina)] (Figura 1c), que apresentam menor toxicidade e por isso foram introduzidos no tratamento clínico do câncer (BRANDÃO et al., 2010).

A cultura de tecidos vegetais emprega a biotecnologia para diversos fins como a multiplicação e a conservação das plantas (GIACOMETTI, 1990). O cultivo *in vitro* evita a exploração desordenada e intensa dos recursos naturais, permitindo a preservação do meio ambiente (PETROVICK et al., 1997). Isto se faz importante, uma vez que a produção e o cultivo de plantas medicinais ainda são inexpressivos para a maioria das espécies nativas, de forma que há uma prevalência do processo de coleta extrativista, que tem causado erosão genética para muitas espécies endêmicas (SOUZA et al., 2011). Nesse contexto, estudos e metodologias que viabilizem e otimizem a produção de plantas medicinais em escala comercial certamente são estratégias que podem reduzir o impacto da devastação da flora nativa.

Além do mais, a cultura de tecidos vegetais pode otimizar a produção de metabólitos secundários ao propiciar a superexpressão dos mesmos, em um curto período de cultivo. Isso ocorre em virtude das diversas técnicas utilizadas, que podem elevar as taxas biossintéticas de forma a atender as demandas de produção (ESPINOSA-LEAL et al., 2017).

Para iniciar qualquer estudo que envolva a cultura de tecidos de uma espécie, é necessário o estabelecimento *in vitro* da mesma. De acordo com Chaves e colaboradores (2005), o estabelecimento *in vitro* é uma das etapas mais complicadas da cultura de tecidos vegetais, o que pode ser um obstáculo para aplicação da técnica em algumas espécies. Isto se deve, em parte, ao fato de que para se estabelecer uma espécie *in vitro* é necessário obter grande quantidade de material vegetal livre de contaminantes e com características anatômicas e fisiológicas normais, de forma a se ter material saudável para aplicar as diversas técnicas do cultivo *in vitro* (GIACOMETTI, 1990). Alguns protocolos de desinfestação já foram apresentados por diversos autores, e dentre as substâncias com ação germicida, as mais usadas são os compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) contaminações por bactérias endógenas representam um grande problema no estabelecimento das culturas, de forma que a utilização de substâncias germicidas se faz necessária.

Outra preocupação em relação ao cultivo *in vitro* é o meio nutritivo no qual o vegetal será cultivado. A escolha do meio de cultura é um dos fatores que determina o sucesso ou não do estabelecimento da cultura *in vitro* (MONFORT et al., 2018). Diversas formulações de meio de cultura podem ser usadas, as quais podem diferir entre si pelo balanço e concentração dos sais de

acordo com as necessidades de cada espécie. Mas, de forma geral, é fundamental suplementar o meio de cultura com macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, e outras substâncias que garantam o desenvolvimento da cultura (CALDAS et al., 1998).

Em vista disto, o presente trabalho tem por objetivo obter o protocolo de estabelecimento *in vitro* da espécie *E. blanchetii*, além da conservação de sementes visando contribuir para a conservação do germoplasma desta espécie.

## 1.2 Material e Métodos

Ramos com frutos maduros de *E. blanchetii* foram coletados no Parque das Dunas, Salvador – BA. Os mesmos foram levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – LCTV da Universidade Federal da Bahia e as sementes foram beneficiadas.

### 1.2.1 Teste de tetrazólio e determinação do grau de umidade das sementes de *Eriope blanchetii*

Para determinação do teor de umidade das sementes, foi utilizado o método da estufa a 105 °C durante 24h (BRASIL, 2009) em uma amostra de 200 sementes. A viabilidade das sementes de *E. blanchetii* foi determinada através do teste de tetrazólio (BRASIL, 2009) em outras 200 sementes.

### 1.2.2 Superação da dormência das sementes de *Eriope blanchetii*

Para os experimentos de quebra de dormência, as sementes recém coletadas foram submetidas a 12 tratamentos (Tabela1). Posteriormente, as sementes de *E. blanchetii* foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio tendo como substrato 10 mL de água gelificada com 0,7% de Agar. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem, e a esterilização foi feita em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com cada tratamento formado por 4 repetições, sendo cada repetição formada por 25 tubos com uma semente por tubo. Após 60 dias da inoculação, as variáveis analisadas foram: percentual de germinabilidade (G), tempo médio de germinação (Tm) e velocidade média de germinação (V) baseadas em

Ferreira e Borghetti (2004). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de significância, no programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

**Tabela 1.** Métodos de superação de dormência aplicados visando o estabelecimento *in vitro* de *E. blanchetii*.

	<b>Método de quebra de dormência</b>	<b>Duração</b>
<b>T1</b>	Imersão em ácido sulfúrico P.A. a 78,13%	2 min
<b>T2</b>	Imersão em água destilada a 90°C	2 min.
<b>T3</b>	Lavagem em água corrente	24h
<b>T4</b>	Imersão em água destilada	24h
<b>T5</b>	Imersão em água destilada	48h
<b>T6</b>	Escarificação em peneira plástica	2 min.
<b>T7</b>	Imersão em solução de giberelina 100 mg.L <sup>-1</sup>	1h
<b>T8</b>	Imersão em solução de giberelina 200 mg.L <sup>-1</sup>	1h
<b>T9</b>	Imersão em solução de giberelina 100 mg.L <sup>-1</sup>	2h
<b>T10</b>	Imersão em solução de giberelina 200 mg.L <sup>-1</sup>	2h
<b>T11</b>	Controle	-

### 1.2.3 Desinfestação e germinação *in vitro* das sementes de *Eriope blanchetii*

Em capela de fluxo laminar sementes recém coletadas, depois de serem imersas por 1h em solução de giberelina 200mg.L<sup>-1</sup>, foram submetidas a sete diferentes tratamentos de desinfestação (Tabela 2), incluindo métodos de desinfestação pré-germinativos (a nível de semente; tratamentos D1 e D2), durante a germinação (com a adição de fungicida no meio de cultura; tratamentos D3 a D6), e pós-germinativo (a nível de planta; tratamento D7).

Após a assepsia, as sementes de *E. blanchetii* foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio tendo como substrato 10 mL de água gelificada com 0,7% de Agar. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem, e a esterilização foi feita em autoclave a 121°C durante 15 minutos. A escolha do substrato teve como objetivo evitar a progressão rápida de possíveis contaminações ao ponto de matar as plantas recém germinadas, sendo considerado germinada a semente que emitiu radícula.

O experimento foi mantido por 90 dias em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas luz sob  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância. Após esse período, as plantas foram transferidas para meio Murashige e Skoog (MS) (1962), gelificado com 0,7% de ágar.

**Tabela 2.** Métodos de desinfestação aplicados visando o estabelecimento *in vitro* de *E. blanchetii*.

<b>Método de Desinfestação</b>	
<b>D1</b>	Álcool 70% (2 min.) → Hipoclorito de sódio 2,5% (15 min.) → Água destilada autoclavada (3X)
<b>D2</b>	Álcool 70% (2 min.) → Hipoclorito de sódio 2,5% (15 min.) → Água destilada autoclavada (3X) → 0,3g/L do Fungicida Carbendazim (2 min.)
<b>D3</b>	Meio de cultura (Ágar 7%) + $2,5\text{g.L}^{-1}$ do Fungicida Carbendazim
<b>D4</b>	Meio de cultura (Ágar 7%) + $5\text{g.L}^{-1}$ do Fungicida Carbendazim
<b>D5</b>	Meio de cultura (Ágar 7%) + $7,5\text{g.L}^{-1}$ do Fungicida Carbendazim
<b>D6</b>	Meio de cultura (Ágar 7%) + $10\text{g.L}^{-1}$ do Fungicida Carbendazim
<b>D7</b>	Tratamento D2 + Desinfestação das plantas com 45 dias Álcool 70% (2 min.) → Hipoclorito de sódio 2,5% (10 min.) → Água destilada autoclavada (3X)

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes por tratamento. As variáveis analisadas foram: percentual de contaminação, germinação (sendo considerada germinada as sementes que emitiram radícula) e sobrevivência. Para análise estatística, foi utilizado o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

#### 1.2.4 Conservação das sementes de *Eriope blanchetii*

O ensaio de conservação das sementes de *E. blanchetii* utilizou arranjo fatorial 3x4 (três ambientes de conservação: sílica (temperatura ambiente),  $-20^\circ\text{C}$ , e  $-80^\circ\text{C}$ , e quatro períodos de armazenamento: 30, 90, 180 e 360 dias). Totalizando 12 condições de conservação, além do controle, constituído pelas sementes germinadas no tempo zero.

Após o período de conservação, as sementes de *E. blanchetii* foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio tendo como substrato 10 mL de água gelificada com 0,7%

de Agar. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem, e a esterilização foi feita em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes por tratamento. Após 60 dias da inoculação, as variáveis analisadas foram: percentual de germinabilidade (G), tempo médio de germinação (Tm) e velocidade média de germinação (V) baseadas em Ferreira e Borghetti (2004). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de significância, no programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

#### 1.2.5 Multiplicação *in vitro* de *Eriope blanchetii*

Para o experimento de multiplicação *in vitro* foi utilizado como explante a região nodal, sem folhas, com aproximadamente 1,5 cm, de plantas com aproximadamente 90 dias de idade. Em fluxo laminar, os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10mL de meio Murashige & Skoog (1962) (MS), gelificado com ágar 0,7%, em quatro composições distintas: M1 - meio MS suplementado com 3% de sacarose; M2 - meio MS suplementado com 3% de sacarose e 0,2% carvão ativado (CA); M3 - meio MS com metade da concentração salina ( $\text{MS } \frac{1}{2}$ ) suplementado com 1,5% de sacarose; M4 - meio  $\text{MS } \frac{1}{2}$  suplementado com 1,5% de sacarose e 0,2% carvão ativado (CA).

O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas luz sob  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância. Após 90 dias, o experimento foi avaliado através das seguintes variáveis: presença (1) e ausência (0) de calos, nº de brotos, nº de folhas, nº de raízes, comprimento da parte aérea (mm), comprimento da raiz (mm), matéria fresca (g) e matéria seca (g). O comprimento foi aferido por paquímetro digital de precisão; o peso foi obtido com auxílio de balança de precisão. O material vegetal foi dessecado em estufa com ventilação forçada a  $40^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2 (concentração salina do meio x carvão ativado), com seis repetições de cinco plantas por tratamento. Para análise estatística, foi utilizado o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

### 1.3 Resultados e Discussão

Durante o estabelecimento *in vitro* as sementes de *E. blanchetii* apresentaram dormência pois, apesar de terem apresentado viabilidade de 60%, e estarem sob as condições propícias ao desenvolvimento, elas germinaram em taxas inferiores (6%) (Tabela 3). A dormência em sementes usualmente é atribuída a tegumentos impermeáveis ou à imaturidade fisiológica (AMARO et al., 2012), e geralmente requer o uso de tratamentos específicos para que ela seja quebrada.

Como resultado do experimento de quebra de dormência (Tabela 3), os tratamentos T1, T2, e T6 acabaram por inviabilizar a germinação, indicando fragilidade do tegumento à escarificações mais intensas. Os tratamentos com lavagem e imersão em água destilada em temperatura ambiente (T3, T4 e T5) foram ineficientes e obtiveram percentuais baixos de germinação. Os tratamentos com uso da giberelina (T7, T8, T9 e T10) foram os que obtiveram maiores percentuais de germinação, com o melhor resultado no tratamento no qual as sementes foram imersas por 1h em solução de giberelina 200mg.L<sup>-1</sup> (T8).

Resultados semelhantes de superação de dormência com o uso de giberelina foram observados em outras espécies da família Lamiaceae: *Lavandula angustifolia* Miller (AOYAMA et al., 1996), *Cunila galioides* Benth. (PAULETTI et al., 2007), *Hyptis pectinata* (L.) Point. (SANTOS NETO et al., 2009), *Rosmarinus officinalis* Linn. (GERONIMO, 2011) e *Rhaphiodon echinus* Shauerem (SOUZA et al., 2017). Guimarães et al. (2006) relataram que a dormência das sementes é uma adaptação às condições ambientais, sendo, portanto, benéfica ao passo que retarda a germinação até que o ambiente apresente as condições adequadas para germinação e manutenção da planta. Desta forma, a dormência em sementes pode ser considerada um mecanismo contra a extinção da espécie (GUIMARÃES et al., 2006).

Os maiores valores de tempo médio de germinação (TM) também ocorreram nos tratamentos com uso da giberelina. Esses resultados contrastam com os efeitos da giberelina sobre a germinação de sementes de *Lavandula angustifolia*, os quais evidenciaram que a exposição das sementes a este regulador vegetal diminuiu o TM (AOYAMA et al., 1996). Ainda assim, os valores de tempo médio das sementes de *E. blanchetii* na presença da giberelina foram similares ao apresentado pelo tratamento T3 e o controle (T11). Resultado semelhante foi encontrado na germinação de sementes de *Hyptis pectinata*, no qual a giberelina não interferiu no tempo médio de germinação (SANTOS NETO et al., 2009).

**Tabela 3.** Valores médios de germinabilidade (G%), tempo médio de germinação, em dias, (TM) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes *Eriope blanchetii* em função dos diferentes tratamentos para quebra de dormência.

	<b>G</b>	<b>TM</b>	<b>IVG</b>
T1 - Imersão em ácido sulfúrico (2 min.)	0 D	00,0 B	0,00 E
T2 - Imersão em água destilada a 90 °C (2 min.)	0 D	00,0 B	0,00 E
T3 - Lavagem em água corrente por 24h	3 D	19,8 A	0,03 E
T4 - Imersão em água destilada por 24h	2 D	12, 5 B	0,02 E
T5 - Imersão em água destilada por 48h	2 D	11, 5 B	0,02 E
T6 - Escarificação em peneira (10 min.)	0 D	00,0 B	0,00 E
T7 - Imersão em solução de giberelina 100mg.L <sup>-1</sup> (1h)	26 C	29,2 A	0,25 C
T8 - Imersão em solução de giberelina 200mg.L <sup>-1</sup> (1h)	60 A	29,9 A	0,56 A
T9 - Imersão em solução de giberelina 100mg.L <sup>-1</sup> (2h)	48 B	32,4 A	0,43 B
T10 - Imersão em solução de giberelina 200mg.L <sup>-1</sup> (2h)	20 C	35,7 A	0,17 D
T11- Controle	6 D	32,1 A	0,04 E

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

De forma geral, os tratamentos com uso da giberelina foram os que obtiveram os maiores índices de velocidade de germinação. Sendo que, mais uma vez o tratamento no qual as sementes foram imersas por 1h em solução de giberelina 200mg.L<sup>-1</sup> (T8) obteve o melhor resultado.

De acordo com Aragão et al. (2006) a embebição das sementes em giberelina provoca uma maior rapidez de germinação. Isso ocorre porque a giberelina aumenta a atividade da amilase, que é a principal responsável pela degradação do amido das reservas cotiledonares (VIEIRA et., 2002). Desta forma, a giberelina age tanto na superação da dormência quanto na hidrólise das reservas das sementes, o que é fundamental para o crescimento e desenvolvimento do embrião (MAYER; POLJAKOFFMAYBER, 1989).

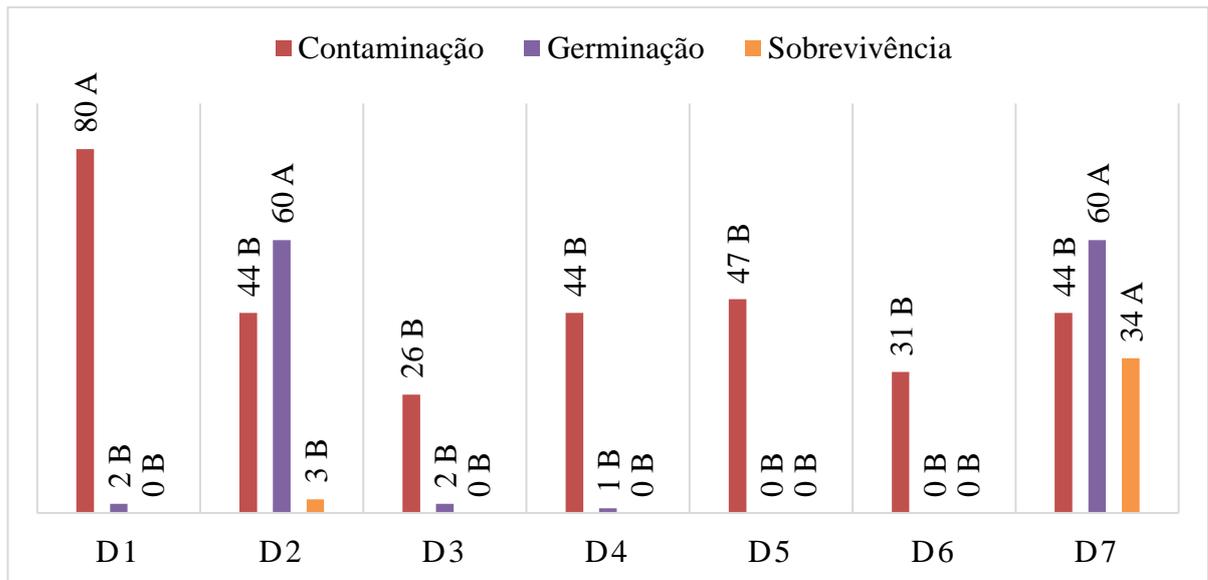
Embora Aragão e colaboradores (2006) apontem que há uma relação positiva entre o tempo de exposição das sementes à giberelina e a sua velocidade germinativa, neste trabalho não foi observada essa tendência, ocorrendo uma redução no IVG das sementes expostas a um maior tempo de imersão (2h) nas concentrações de 100 e 200 mg/L de giberelina. Estes resultados também foram observados por Afonso et al. (2018) para sementes de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC..

As sementes de *E. blanchetii* apresentam mucilagem quando hidratadas, como descrito para outras espécies de Lamiaceae: *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B.Pastore, *Gymneia platanifolia* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B.Pastore, *Hyptis lanceolata* Poir., *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth., *Hyptis velutina* Pohl ex Benth., *Martianthus leucocephalus* (Salzm. ex Benth.) J.F.B.Pastore, *Mesosphaerum pectinatum* (L.) Kuntze, *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (FERRAZ, 2016).

A mucilagem desempenha importantes funções na proteção do embrião e dispersão das sementes (NORTH et al., 2014), exercendo múltiplos papéis ecológicos (WESTERN, 2012; YANG et al., 2012; BARRIOS et al., 2015; BHATT et al., 2016), como a adesão de sementes ao solo, minimizando assim a sua remoção pela água e predadores (WESTERN, 2012; SUN et al., 2012). Embora a mucilagem desempenhe um importante papel na regulação da germinação das sementes, sua influência precisa ser estudada individualmente, uma vez que é espécie específica e depende do contexto ambiental no qual as mesmas estão inseridas (WESTERN, 2012; AGHAZADEH; BEHBOODI, 2015; BHATT et al., 2016).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a presença de mucilagem parece estar relacionada a uma redução da eficiência de desinfestação das sementes, visto o alto percentual de contaminação que foi observado na germinação *in vitro* da espécie. A influência da presença de mucilagem na incidência de contaminações também foi demonstrada na germinação de *Jatrophas curca* L.. Nesta espécie, a permanência do endosperma contendo grande quantidade de mucilagem, após a germinação, no meio de cultura, ocasionou contaminação bacteriana específica; entretanto quando a plântula emergida era transferida para um meio fresco após a remoção do endosperma, a contaminação era completamente evitada (MOHAN et al., 2011).

O primeiro tratamento de desinfestação (D1) apresentou elevada contaminação (80%), o que foi a provável causa da baixa taxa de germinação (2%). Os tratamentos nos quais as sementes foram germinadas em substrato acrescido de fungicida (D3, D4, D5 e D6), apresentaram índices de contaminação moderados de até 47%, mas também obtiveram taxas baixas ou nulas de germinação. Boyle (1973 Apud DAVIDSE, 1977) afirma que o carbendazim pode afetar a mitose em vegetais e, de acordo com Davidse (1977), a interferência do carbendazim na formação e função dos microtubulos é a provável causa desse efeito. Posto isso, uma vez que a germinação se caracteriza por intensa atividade mitótica, a causa provável da germinação baixa ou ausente foi a exposição contínua das sementes a aquele fungicida.



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada variável, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

**Figura 2.** Porcentagem de Contaminação, Germinação e Sobrevivência nos diferentes tratamentos de desinfestação de sementes de *E. blanchetii* durante o estabelecimento *in vitro*.

O protocolo de desinfestação D2, que é o primeiro protocolo (D1) acrescido da imersão das sementes em solução de 0,3g/L do Fungicida Carbendazim por 2 minutos, apresentou contaminação moderada (44%) e o maior percentual de germinação (60%). Porém, ao passo que as plantas eram transferidas para o meio MS altos níveis de contaminação eram observados, causando uma baixa taxa de sobrevivência (3%) das plantas. Desta forma, foi acrescida a esse protocolo uma etapa de desinfestação pós-germinativa, originando o tratamento D7, que obteve a melhor taxa de sobrevivência de 34%.

No experimento de conservação (Tabela 4) a sílica foi o pior ambiente, inviabilizando totalmente a germinação em todos os períodos de tempo analisados. As sementes de *E. blanchetii* apresentam elevado teor de umidade, aproximadamente 61%, o que torna a sílica, devido a sua capacidade de absorver a umidade e desidratar os materiais biológicos nela depositados, não apropriada para a conservação de sementes desta espécie. A dessecação das sementes mantidas em sílica é, portanto, a causa mais provável da morte de 100% dos embriões, que foi detectada através de teste de tetrazólio realizado nas sementes não germinadas após 60 dias de inoculação. Assim, as sementes de *E. blanchetii*, por serem muito sensíveis à dessecação, podem ser classificadas como recalcitrantes (ROBERTS, 1973). Com isso, armazenar essas sementes ainda hidratadas, em temperaturas tanto criogênicas quanto de super-congelamento, pode ser uma melhor opção para a conservação (MEDEIROS; EIRA, 2006).

**Tabela 4.** Valores médios de germinabilidade (%) de sementes *Eriope blanchetii* em função do ambiente de conservação (sílica, -20 °C, e -80 °C) e tempo de armazenagem (30, 90, 180 e 360 dias).

Tempo de armazenamento	Germinabilidade		
	Sílica	-20°C	-80 °C
30 dias	0 Ac	08 Ab	18 Aa
90 dias	0 Ac	11 Ab	21 Aa
180 dias	0 Ab	07 Aa	06 Ba
360 dias	0 Ab	01 Bb	07 Ba

Médias seguidas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Para a variável Germinabilidade, o ambiente a -80°C foi o que apresentou os melhores resultados para todos os períodos de tempo. Contudo, houve uma redução significativa da germinabilidade a partir de 180 dias. De acordo com Medeiros e Eira (2006), isso ocorre, porque, mesmo em condições favoráveis de armazenamento, as sementes recalcitrantes possuem baixa longevidade. A longevidade das sementes está intimamente ligada à características particulares de cada espécie, podendo durar desde semanas até meses (MEDEIROS; EIRA, 2006). De forma geral, o TM e o IVG não apresentaram um padrão de comportamento. Isso pode ser justificado pela baixa germinabilidade obtida, e por isso esses dados são aqui apresentados

Por fim, no experimento de multiplicação *in vitro* não houve interação significativa entre os meios de cultura e a presença ou ausência de carvão ativado para nenhuma das variáveis analisadas. Também não houve nenhuma interferência separadamente dos fatores meio de cultura e carvão ativado para as variáveis Presença de Calos, Número de Brotos, Número de Raízes, Comprimento da Parte Aérea (mm), e Comprimento da Raiz (mm) e, por isso, esses dados não foram apresentados. Já as variáveis Número de Folhas, Matéria Fresca (g) e Matéria Seca (g) (Tabela 5) apresentaram melhores resultados na presença do carvão ativado.

**Tabela 5.** Valores médios de número de folhas, matéria fresca (g) e seca (g) de plantas de *Eriope blanchetii*, em função da presença e ausência de carvão ativado no meio de cultura.

Carvão ativado (g/L)	Nº de Folhas	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)
0	29,2 B	0,12 B	0,017 B
2	36,2 A	0,19 A	0,023 A

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

Resultados similares para o número de folhas foram encontrados por Sousa e colaboradores (2017) que, em trabalho com *Anacardium othonianum* Rizz., observaram que o meio de cultivo com 30g/L de sacarose e presença de carvão ativado proporcionaram maior número de folhas. De forma contrária, para a matéria fresca, em *Solanum sessiliflorum* Dunal., os melhores resultados foram obtidos na ausência de carvão (RODRIGUES et al., 2017).

**Tabela 6.** Valores médios de matéria seca (g) de plantas de *Eriope blanchetii*, em função do meio de cultura.

Meio de Cultura	Matéria Seca (g)
MS + 3% de sacarose	0,024 A
MS/2 + 1,5% de sacarose	0,017 B

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

A única variável para a qual houve interferência do fator Tipo de Meio de Cultura foi a matéria seca (Tabela 6). Uma vez que o meio MS obteve a maior média, o meio de cultura mais adequado para obtenção de matéria seca na multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii* foi o MS acrescido de 3% de sacarose. De forma similar, para *Allium sativum* L., Longo et al. (2012) obtiveram os maiores valores de matéria em meio MS.

#### 1.4 Conclusões

O protocolo mais eficiente para a superação da dormência de sementes de *Eriope blanchetii* foi a embebição em solução de giberelina 200mg.L<sup>-1</sup> por 1h.

Para a germinação *in vitro* de *E. blanchetii*, recomenda-se o uso de substrato composto apenas por água gelificado com ágar 0,7%, a fim de diminuir a progressão da contaminação, além de uma desinfestação em duas etapas: pré-germinativa, a nível de semente, e pós-germinativa, a nível de planta.

As sementes de *E. blanchetii* podem ser conservadas a -80°C por até 90 dias sem comprometer o seu potencial germinativo.

Maiores quantidades de matéria seca de *E. blanchetii* podem ser obtidas *in vitro* utilizando-se o meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose e carvão ativado 2g/L.

## Referências

AFONSO, M. V. et al.. Germinação *in vitro* de sementes e parâmetros morfofisiológicos de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.. **Iheringia**, Série Botânica, v. 73, n. 1, p. 39-45, 2018.

AGHAZADEH, P.; BEHBOODI, B.S. Seed Germination and *in vitro* Organogenesis Optimization of *Zhumeria majdae* (Lamiaceae) from Iran. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1850-1856, 2015.

AMARO, H. T. R. et al.. Superação de dormência em sementes de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, n. especial, p. 218-223, 2012.

ARAGÃO, C.A. et al.. Germinação e vigor de sementes de melancia com diferentes ploidias submetidas a tratamentos pré-germinativos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 82-86, 2006.

AOYAMA, E. M. et al.. ESTUDO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LAVANDA (*Lavandula angustifolia* Miller). **Scientia Agrícola**, v. 53, n. 2-3, p. 267-272, 1996.

BARRIOS, D. et al.. The role of mucilage in the germination of *Leptocereus scopulophilus* (Cactaceae) seeds from Pan de Matanzas, Cuba. **Botany**, v. 93, p. 1-5, 2015.

BHATT, A. et al.. Seed mucilage effect on water uptake and germination in five species from the hyper-arid Arabian desert. **Journal of Arid Environments**, v. 128, p. 73-79, 2016.

BRANDÃO, H. N. et al.. Química e farmacologia de quimioterápicos e antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**. v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRANDÃO, H. N. et al.. Determination of podophyllotoxin and related aryltetralin lignans by HPLC/DAD/MS from Lamiaceae species. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 179-184, 2017.

BOYLE, W. S. Cytogenetic effects os Benlate fungicide on *Allium cepa* and *Secale cereale*. **Journal of Heredity**, v. 64, p. 49-50, 1973. In: DAVID, J. P. et al.. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília. p. 399, 2009.

CALDAS, L. S. et al.. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 87-132. 1998.

CHAVES, A. da C. et al.. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L.. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

CNC FLORA. *Eriope blanchetii* in **Lista Vermelha da flora brasileira**. Centro Nacional de Conservação da Flora, 2012. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Eriope blanchetii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Eriope%20blanchetii)>. Acesso em: 23/10/2016.

DAVID, J. P. et al.. Lignanais e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

DAVIDSE, L. C. Mode of action, selectivity and mutagenicity of Benzimidazole compounds. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 135-144, 1977.

ESPINOSA-LEAL, C.A. et al.. **Cultivo *in vitro* como alternativa para la producción de metabolitos**. 2017. 98f. Tese de Doutorado - Editorial Académica Española, 2017.

FERRAZ, M. **Conservação de sementes de espécies da subtribo Hyptidinae (Lamiaceae) nativas do semiárido baiano**. 2016. 88f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.

FERREIRA, A. G.; BORGETHI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GERONIMO, I. G. da G. **Influência do Ácido Giberélico e Pré-resfriamento sobre a Germinação *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae)**. 2011. 25f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – Espírito Santo, 2011.

GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p. 19-28, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI, v. 1, p. 183-260, 1998.

GUIMARÃES, R. M. et al.. Aspectos fisiológicos de sementes. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 232, p. 40, 2006.

HARLEY, R. et al.. **Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8142>>. Acesso em: 19/07/2016.

KITAMURA, M. et al.. Asymmetric [2,3]-Wittig Rearrangement of Oxygenated Allyl Benzyl Ethers in the Presence of a Chiral di-*t*Bu-bis(oxazoline) Ligand: A Novel Synthetic Approach to THF Lignans. **Chemistry a European Journal**, v. 15, p. 9911–9917, 2009.

LONGO, A. E. de O. et al.. Micropropagação e bulbificação *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 8, n. 1-2, p. 18-26, 2012.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. Pergamon Press, 4.ed. Toronto, 1989. 270 p.

- MEDEIROS, A. C. de S.; EIRA, M. T. S. da. Comportamento Fisiológico, Secagem e Armazenamento de Sementes Florestais Nativas. **Circular Técnica 127**, EMBRAPA, Colombo – PR, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2006.
- MEDRADO, H. H. S. et al.. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015.
- MOHAN, N. et al.. Studies on seed germination and embryo culture of *Jatropha curcas* L. under *in vitro* conditions. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 1, n. 2, 187-194, 2011.
- MONFORT, L. E. F. et al.. Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 231-239, 2018.
- MORAIS, T. P. et al.. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NORTH, H. M. et al.. Understanding polysaccharide production and properties using seed coat mutants: future perspectives for the exploitation of natural variants. **Annals of Botany**, v. 114, p. 1251-1263, 2014.
- PAULETTI, G. F. et al.. Estudo da germinação de sementes de (*Cunila galioides* Benth.). In: II Congresso Brasileiro de Agroecologia, Porto alegre, 2007. Resumos do II Congresso Brasileiro de Agroecologia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 2007, v. 2, n. 1, p. 1005-1008.
- PETROVICK, P. R. et al.. From a medicinal plant to a hydroalcoholic dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Natural Products Research in Brazil**. v. 49, n. 5/6, p. 364-368, 1997.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 12, p. 499-514, 1973.
- RODRIGUES, F. A. et al.. Solidifying agents and activated charcoal for *in vitro* culture of *Solanum sessiliflorum* Filipe Almendagna. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 11, p. 1123-1126, 2017.
- SANTOS NETO, A. L. et al.. Influência do peso da semente e promotores químicos na qualidade fisiológica de sementes de Sambacaitá. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 187-192, 2009.
- SOUSA, I. D. et al.. Composição do meio de cultivo para produção de microplantas de caju-de-árvore-do-Cerrado (*Anacardium othonianum* RIZZ.). **Revista científica**, v. 1, n. 5, p. 1-11, 2017.
- SOUZA, A. V. et al.. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 13, p. 319 -327, 2011.
- SOUZA, G. C. S. et al.. Germinação de sementes de *Rhaphiodon echinus* Shauerem diferentes concentrações de ácido giberélico. In: XIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido, Petrolina/Pernambuco, 2017. **Anais da XIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido**, v. 1, n. 1, p. 203-206, 2017.

SUN, Y. et al. Role of mucilage in seed dispersal and germination of the annual ephemeral *Alyssum minus* (Brassicaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 60, n. 5, p. 439-449, 2012.

VIANA, B. F. et al.. Flora apícola de uma área restrita de dunas litorâneas, Abaeté, Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 13-25, 2006.

VIEIRA, A. R. et al.. Action of gibberellic acid (GA3) on dormancy and activity of  $\alpha$ -amylase in rice seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p. 43-48, 2002.

WESTERN, T. The sticky tale of seed coat mucilages: Production, genetics, and role in seed germination and dispersal. **Seed Science Research**, v.22, n.1, p.1-25, 2012.

YANG, X. et al.. Seed Mucilage Improves Seedling Emergence of a Sand Desert Shrub. **PLOS ONE**, v. 7, n.4, p. 1-9, 2012.

**CAPÍTULO 2: MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Eriope blanchetii* (Benth.) Harley, PARA  
QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> A ser publicado na revista PHYTOCHEMISTRY LETTERS

## RESUMO

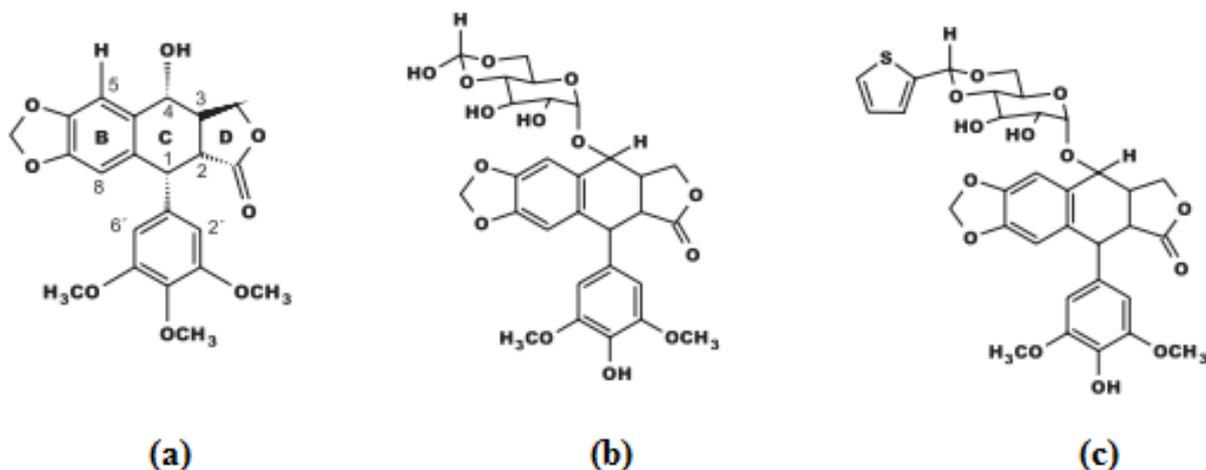
Pertencente à família Lamiaceae, *Eriope blanchetii* já teve seu potencial medicinal comprovado através de um estudo fitoquímico, que demonstrou a presença de podofilotoxina no extrato clorofórmico das partes aéreas da espécie. Com a podofilotoxina como precursora, foram obtidos os derivados semissintéticos etoposídeo e o teniposídeo e, a partir de estudos da citotoxicidade, esses compostos foram introduzidos no tratamento do câncer. Contudo, ainda não se estabeleceu uma forma de cultivo segura e eficiente para esta e muitas outras plantas medicinais, o que permitiria o uso planejado de seus metabólitos secundários. A fim de solucionar esse problema, destaca-se o emprego da tecnologia de cultura de tecidos vegetais que, em virtude das diversas técnicas utilizadas, pode elevar as taxas biossintéticas de forma a atender as demandas de produção. Em adição, o cultivo *in vitro* pode evitar a exploração desordenada dos recursos naturais, permitindo a preservação do meio ambiente. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência de fatores abióticos na expressão de podofilotoxina no cultivo *in vitro* de *E. blanchetii*. Para tanto, explantes de *E. blanchetii* foram submetidos a arranjo fatorial duplo de diferentes concentrações dos reguladores vegetais ANA (0, 5,37 ou 10,74 $\mu\text{M.L}^{-1}$ ) e BAP (0, 4,44 ou 8,88 $\mu\text{M.L}^{-1}$ ), e a diferentes temperaturas (25 °C e 30 °C) durante o cultivo. Para cada tratamento foram produzidos extratos e estes foram analisados em CLAE. Os melhores dados de enraizamento foram obtidos na ausência de reguladores. Para o desenvolvimento da parte aérea, matéria fresca e seca, recomenda-se o uso de 8,88  $\mu\text{M.L}^{-1}$  de BAP. A temperatura ideal para a multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii* foi a 25 °C. As condições de cultivo *in vitro*, assim como os fatores abióticos empregados como fonte de estresse, inviabilizaram a expressão da podofilotoxina em *E. blanchetii*.

**Palavras-chave:** CLAE, Elicitação, Lamiaceae, Metabólito secundário, Reguladores Vegetais.

## 2.1 Introdução

Os metabólitos secundários oriundos de plantas possuem grande valor agregado em decorrência da sua ampla utilidade. Plantas são uma abundante fonte de metabólitos secundários, que são usados como fármacos, aromatizantes, pigmentos, biopesticidas e suplementos alimentares (RAOA; RAVISHANKAR, 2002). Os metabólitos de maior valor agregado são aqueles que desempenham alguma função farmacológica relacionada ao combate de doenças. De acordo com Rao e Ravishankar (2002), há uma busca massiva por um sistema de produção de compostos com atividade anti-HIV e anticâncer, uma vez que esses metabólitos normalmente são encontrados em baixa concentração nos vegetais e, por isso, possuem alto custo de produção.

Estudos com o gênero botânico *Podophyllum* L. trouxeram um importante descoberta para a busca por compostos com efeito anticâncer. Duas espécies, *P. peltatum* L. e *P. emodi* Wall. ex Hook.f. & Thomson, que comumente eram usadas para o tratamento de verrugas e câncer de pele pela população nativa da Ásia e América, foram a precursoras dos estudos com a lignana ariltetrálica podofilotoxina (Figura 1a) (BRANDÃO et al., 2010). Com a podofilotoxina como precursora foram obtidos os derivados semissintéticos etoposídeo (Figura 1b) e o teniposídeo (Figura 1c) e, a partir de estudos da citotoxicidade, esses compostos foram introduzidos no tratamento do câncer (BRANDÃO et al., 2010).



**Figura 1.** Estruturas químicas da podofilotoxina e seus derivados semissintéticos. Fonte: BRANDÃO et al., 2010.

Em decorrência da sua importância econômica e farmacêutica, atualmente, se faz necessária a busca por novas espécies que expressem a podofilotoxina em seu metabolismo.

Neste sentido, a família Lamiaceae se destaca por seus inúmeros representantes com potencial medicinal (MATOS, 2002). De acordo com Brandão e colaboradores (2010), a podofilotoxina tem ocorrência relatada para gêneros *Phlomis* L., *Vitex* Tour. ex L., *Mosla* (Benth.) Buch.-Ham. ex Maxim., *Hyptis* Jacq. e *Eriope* Humb. & Bonpl. ex Benth., e no gênero *Leptohyptis* Harley & J.F.B. Pastore, de acordo com Meira e colaboradores (2017).

O gênero *Eriope*, que é de grande relevância para a flora brasileira já que, dentre as suas 40 espécies (SILVA-LUZ et al., 2012), 28 são endêmicas do Brasil (FLORA DO BRASIL 2020, 2019), ainda é pouco estudado, e pouco se sabe sobre o seu metabolismo secundário ou como induzir a superprodução de metabólitos que apresentam interesse farmacológico. Dentre as várias espécies do gênero, *Eriope blanchetii* (Benth.) Harley, espécie endêmica das restingas da Bahia e Sergipe no Brasil (HARLEY et al., 2015), já teve seu potencial medicinal comprovado por David e colaboradores (2001) através de um estudo fitoquímico dos extratos das folhas no qual demonstrou-se a presença de podofilotoxina.

Contudo, ainda não se estabeleceu uma forma de cultivo segura e eficiente para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico para esta e muitas outras plantas medicinais (OCHOA-VILLARREAL et al., 2016). A fim de solucionar esse problema, destaca-se o emprego da tecnologia de cultura de tecidos vegetal, que pode otimizar a produção de metabólitos secundários em um curto período de cultivo. Isso ocorre em virtude das diversas técnicas utilizadas, que podem elevar as taxas biossintéticas de forma a atender as demandas de produção (ALTPETER et al., 2016). Os reguladores vegetais, por exemplo, ao serem adicionados ao meio de cultura podem desempenhar funções promotoras no metabolismo vegetal interferindo na produção de alguns metabólitos secundários (SILVESTRINI et al., 2002; MONFORT et al., 2018).

Em adição, o cultivo *in vitro* pode evitar a exploração desordenada dos recursos naturais, permitindo a preservação do meio ambiente (PETROVICK et al., 1997), constituindo uma alternativa aos processos extrativistas, uma vez que a produção e o cultivo de plantas medicinais nativas ainda são insipientes, e a coleta extrativista tem causado erosão genética em diversas espécies endêmicas (SOUZA et al., 2011). Nesse contexto, estudos e metodologias que viabilizem e otimizem a produção de plantas medicinais em escala comercial são certamente estratégias que podem reduzir o impacto da devastação da flora nativa.

Posto isso, estudos com *E. blanchetii in vitro*, a fim de extrair a podofilotoxina, se justificam pela disponibilidade limitada de fontes naturais da planta, pela possibilidade de

potencializar a produção de podofilotoxina, pela independência do cultivo de fatores ambientais que podem influenciar na quantidade e qualidade dos metabólitos produzidos, e por permitir maior controle sobre as rotas biossintéticas para obtenção das variantes mais desejadas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência de fatores abióticos na expressão de podofilotoxina no cultivo *in vitro* de *E. blanchetii*.

## 2.2 Material e Métodos

O método de cultivo *in vitro* foi baseado no trabalho de Meira e colaboradores (2017). De plantas germinadas *in vitro*, com aproximadamente 90 dias de idade, foram obtidos os explantes da região do nó, com aproximadamente 1,5cm de comprimento. Cada explante foi inoculado individualmente em tubos de ensaio contendo 10mL do meio de cultura básico: Murashige & Skoog (MS) (1962), suplementado com sacarose 3% e carvão ativado 0,2% (CA) e gelificado com 0,7% de Agar (Capítulo 1). Suplementos foram adicionados ao meio a depender do tratamento. O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

### 2.2.1 Efeito dos reguladores vegetais 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA)

Os explantes foram inoculados meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose e carvão ativado 2g/L acrescido com BAP (0, 4,44 ou 8,88 $\mu\text{M}$ ) combinado com ANA (0, 5,37 ou 10,74 $\mu\text{M}$ ), formando um delineamento fatorial= 3x3, totalizando nove tratamentos distintos (T1 ao T9), sendo o T1 o controle (ausência dos regulares BAP e ANA). As culturas foram mantidas a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 30 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz sob  $25\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância.

### 2.2.2 Efeito da temperatura

Os explantes foram inoculados meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose e carvão ativado 2g/L e mantidos a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 30 dias em câmara de germinação com fotoperíodo de 16 horas/luz (controle), ou a  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 30 dias em câmara de germinação com fotoperíodo de 16 horas/luz, totalizando mais dois tratamentos (T10 e T11).

Após o período de 30 dias, no qual os explantes foram expostos ao estresse ocasionado por fatores abióticos, o desenvolvimento das plantas foi avaliado através das seguintes variáveis: calos: presença (1) e ausência (0); nº de brotos; nº de folhas; nº de raízes; comprimento da parte aérea (em milímetros - mm); comprimento da raiz (mm); matéria fresca (g); e matéria seca (g). O comprimento foi aferido por paquímetro digital de precisão, o peso foi obtido com o auxílio de balança de precisão. O material vegetal foi dessecado em estufa com ventilação forçada a 40 °C por 48 h. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com cada tratamento composto por 5 repetições de 20 explantes. Para análise estatística, foi utilizado o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

### 2.2.3 Quantificação de podofilotoxinas em *Eriope blanchetti*

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Dionex®, modelo UltiMate 3000, composto por uma bomba quaternária com degaseificador “on-line” a vácuo de quatro canais, tolerante a vazões de até 10 mL/min. Mecanismo de duplo pistão em série com deslocamento variável de 20 a 100 µL, auto-injetor e detector UV com arranjo de diodos. O equipamento foi gerenciado pelo software Chromeleon®. A separação cromatográfica foi realizada com coluna NUCLEODUR 100-5 C18ec (150 mm x 4.6 mm i.d.) (5.0 µm) (MACHEREY-NAGEL). O padrão utilizado foi podofilotoxina (Sigma-Aldrich /USA).

A produção dos extratos foi realizada conforme protocolo desenvolvido por Brandão e colaboradores (2010) para determinação das lignanas podofilotoxina,  $\alpha$ -peltatina,  $\beta$ -peltatina,  $\alpha$ -peltatina-5-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, em 38 espécimes de vegetais. As plantas cultivadas *in vitro* foram secas em estufa de circulação de ar quente a 40°C por 48h, e posteriormente foi realizada a extração. Primeiramente as amostras foram maceradas com auxílio de um almofariz e pistilo. Ao macerado, foi adicionado 15mL de etanol e a mistura foi agitada durante 2h.

O extrato etanólico foi filtrado e completamente exaurido em capela de exaustão. O extrato seco foi então ressuspenso e particionado em água e acetato de etila (1:1) e a fase acetato de etila resultante foi evaporada. O extrato semipurificado foi dissolvido em 10mL de solução aquosa de acetonitrila (8:2 H<sub>2</sub>O:ACN) e pré-concentrado usando cartucho Sep-Pak C18.

Os compostos retidos no cartucho foram eluídos em 10mL de acetonitrila em um vial mensurado e o solvente foi exaurido.

O material foi então redissolvido em metanol e filtrado em membrana de 0,22- $\mu$ m (Supelco, Pennsylvania, USA) e injetado no equipamento HPLC. Todas as amostras foram injetadas em triplicata. Para as análises foi realizada uma adaptação do método de Brandão et al. (2010), de forma que foram usados como fase móvel ácido acético 2% (solvente A), metanol (solvente B) e acetonitrila (solvente C) grau HPLC.

A mistura entre os solventes A, B e C, nos diferentes tempos de corrida, está representada na tabela 1. A corrida completa durou 66 minutos com um fluxo 0,6mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10 $\mu$ L à temperatura ambiente, antes de cada corrida a coluna foi acondicionada com o gradiente inicial por 10 minutos.

**Tabela 1.** Composição da fase móvel durante os diferentes tempos de corrida. Ácido acético 2% (solvente A), metanol (solvente B) e acetonitrila (solvente C) grau HPLC.

<b>Tempo</b>	<b>Solventes</b>		
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>T0</b>	69	11	20
<b>T1 = 24</b>	67	11	22
<b>T2 = 36</b>	60	10	30
<b>T3 = 54</b>	47	8	45
<b>T4 = 66</b>	47	8	45

A faixa de leitura do detector de arranjo de diodo foi estabelecida entre 210 a 400nm e a aquisição cromatográfica foi definida em 290nm. A identificação da podofilotoxina foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção do padrão e das amostras, bem como os espectros no ultra violeta.

### 2.3 Resultados e Discussão

Não houve formação de calos em *E. blanchetii*. Os demais resultados do comportamento

de *E. blanchetii* em função das diferentes concentrações de reguladores vegetais são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Valores médios de nº de raízes, comprimento da raiz (mm), nº de brotos, comprimento da parte aérea (mm) e nº de folhas de *Eriope blanchetii* cultivada *in vitro* em função das diferentes concentrações dos reguladores vegetais ANA e BAP ( $\mu\text{M}$ ).

NÚMERO DE RAÍZES					
		ANA			Média Geral
		0	5,37	10,74	
BAP	0	1,27 Aa	0,04 Ab	0,15 Ab	0,09 A
	4,44	0,02 Ba	0,16 Aa	0,09 Aa	0,11 A
	8,88	0,23 Ba	0,03 Aa	0,06 Aa	0,49 B
	Média Geral	0,51 a	0,08 b	0,10 b	
COMPRIMENTO DA RAÍZ					
		ANA			Média Geral
		0	5,37	10,74	
BAP	0	6,64 Aa	0,06 Ab	0,44 Ab	2,38 A
	4,44	0,10 Ba	1,54 Aa	1,12 Aa	0,92 A
	8,88	2,01 Ba	0,19 Aa	0,40 Aa	0,87 A
	Média Geral	2,91 a	0,60 b	0,66 b	
NÚMERO DE BROTOS					
		ANA			Média Geral
		0	5,37	10,74	
BAP	0	2,85 Ba	3,02 ABa	2,84 Aa	2,90 A
	4,44	1,73 Cb	3,35 Aa	2,97 Aa	2,68 A
	8,88	3,79 Aa	2,77 Bb	1,97 Bc	2,84 A
	Média Geral	2,79 ab	3,05 a	2,59 b	
COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA					
		ANA			Média Geral
		0	5,37	10,74	
BAP	0	21,15 ABa	19,34 Aa	17,28 Ab	19,26 A
	4,44	19,71 Ba	19,34 Aa	16,14 Ab	18,40 AB
	8,88	22,31 Aa	14,37 Ac	17,51 Ab	18,06 B
	Média Geral	21,05 a	17,68 b	16,98 a	
NÚMERO DE FOLHAS					
		ANA			Média Geral
		0	5,37	10,74	
BAP	0	8,87 Bb	12,83 Ba	14,59 Aa	12,10 A
	4,44	8,69 Bb	15,26 Aa	13,41 Aa	12,45 A
	8,88	14,92 Aa	13,11 ABab	10,97 Bb	13,00 A
	Média Geral	10,83 b	12,99 a	13,73 a	

Médias seguidas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Apesar de ter ocorrido interação entre os fatores para todas as variáveis dispostas na tabela 1, para a variável Número de Raízes os melhores resultados foram obtidos na ausência dos dois reguladores, para a qual foi obtido valor médio de 1,27. Também na ausência dos dois reguladores de crescimento, foi obtido o maior tamanho de comprimento das raízes, 6,64mm (Tabela 2). De forma semelhante, Reis e colaboradores (2008), em um estudo de multiplicação *in vitro* com *Melissa officinalis* L., obtiveram maior quantidade de raízes em meio MS na ausência de reguladores de crescimento. De acordo com Souza e Pereira (2007) há um delicado balanço entre as auxinas endógenas e exógenas. Dessa forma, segundo Ford et al. (2001), mesmo que primordialmente auxinas exógenas promovam o aumento súbito do nível de auxinas endógenas e a conseqüentemente a formação de raízes, para algumas espécies, o nível de auxina cresce e decresce de forma muito rápida, graças a um sistema de retroalimentação negativa, não havendo tempo suficiente para formação de raízes.

Assim como o ocorrido em *E. blanchetii*, Paranhos et al. (2017) demonstraram que na ausência de reguladores, plantas de *Casearia sylvestris* Sw., estabelecidas *in vitro*, formaram raízes. Segundo os autores, o aparecimento das raízes está intimamente ligado a auxinas endógenas produzidas pelos brotos e folhas novas. Essas auxinas são transportadas via floema, podendo agir como promotora de crescimento de outros órgãos da planta, a exemplo das raízes (PARANHOS et al., 2017). Desta forma, o processo de rizogênese não precisaria de auxinas exógenas.

Para o número de brotos, a maior taxa foi obtida na ausência de ANA e na presença de 8,88µM de BAP, apresentando média de 3,79 brotos por planta de *E. blanchetii* (Tabela 2). Para esse mesmo tratamento, apesar de não diferir estatisticamente do tratamento controle, também foi encontrado o maior comprimento da parte aérea, 22,31mm. Esses resultados estão de acordo com os apresentados para *Mentha piperita* L. (ASMAR et al., 2011), e para *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (SOUZA, 2015), que obtiveram o maior número de brotos com a mesma concentração de reguladores aqui utilizada.

O BAP é uma citocinina que tem como função principal controlar os eventos de citocinese ou divisão celular e, por conseguinte, as altas doses desse regulador resultam na formação de gemas caulinares (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PERES; KERBAUY, 2013). Isso ocorre porque a citocinina é responsável pela quebra da dominância apical, sincronizando a ativação das gemas laterais (PERES; KERBAUY, 2013), o que pode justificar o aumento da produção de brotos e do comprimento da parte aérea, observada no presente trabalho

na dose mais alta de citocinina empregada. Além disso, as auxinas podem reduzir o número de brotações produzidas por planta (GRAY; FISHER, 1986); logo, é esperado que na ausência desse regulador seja gerada maior quantidade de brotos.

Já para o número de folhas, a maior quantidade foi obtida mediante a interação de 4,44 $\mu$ M de BAP com 5,37 $\mu$ M de ANA, com média de 15,26 folhas por planta, diminuindo, apesar de não diferir estatisticamente, em maiores concentrações dos reguladores (Tabela 2). Esses resultados contrastam com os apresentados para o híbrido de manjeriço ‘Sweet Dani’ x ‘Maria Bonita’ (Lamiaceae), para o qual a ausência dos reguladores de crescimento no meio de cultura proporcionou maior número de folhas (13,74) (COSTA et al., 2015).

Tanto a matéria fresca quanto seca só sofreram interferência do regulador BAP (Tabela 3). Para a matéria fresca os maiores valores foram encontrados na ausência de BAP independente da concentração de ANA (0,049g), e na presença de 8,88 $\mu$ M de BAP independente da concentração de ANA (0,054g). Como não houve diferença entre os tratamentos, visando um caminho menos dispendioso e que apresenta menor risco de gerar material com variação somaclonal, a multiplicação na ausência dos dois reguladores é recomendada. Porém, recomenda-se o tratamento que seja condizente com outras características apresentadas previamente, como o número de brotos e o comprimento da parte aérea, no qual a utilização de meio com 8,88 $\mu$ M de BAP e ausência de ANA produziu melhores resultados. Situações semelhantes foram observadas para amoreira-preta e videira, para as quais a maior quantidade de matéria fresca foi obtida na presença de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultura (VILLA et al., 2007).

Para a matéria seca, não houve interação significativa entre os fatores BAP e ANA, sendo que, na média geral, os maiores valores foram obtidos na ausência de BAP independente da concentração de ANA (0,0083g) ou na presença de 8,88 $\mu$ M de BAP também independente da concentração de ANA (0,0084g). Em um estudo com *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, os valores de matéria seca, que representam o crescimento real da planta, também não aumentaram mediante os tratamentos com reguladores vegetal (SILVA, 2010).

**Tabela 3.** Valores médios de matéria fresca (g) e matéria seca (g) de *Eriope blanchetii* cultivada *in vitro* em função das diferentes concentrações dos reguladores vegetais ANA e BAP ( $\mu\text{M}$ ).

MATÉRIA FRESCA (g)					
ANA					
		0	5,37	10,74	Média Geral
BAP	0	0,043 Ba	0,050 Aa	0,054 Aa	0,049 AB
	4,44	0,043 Ba	0,046 Aa	0,044 Aa	0,044 B
	8,88	0,056 Aa	0,053 Aa	0,054 Aa	0,054 A
	Média Geral	0,047 a	0,049 a	0,051 a	
MATÉRIA SECA (g)					
ANA					
		0	5,37	10,74	Média Geral
BAP	0	0,0085 Aa	0,0080 Aa	0,0069 Aa	0,0083 A
	4,44	0,0064 Aa	0,0074 Aa	0,0081 Aa	0,0069 B
	8,88	0,0091 Aa	0,0080 Aa	0,0084 Aa	0,0084 A
	Média Geral	0,0080 a	0,0078 a	0,0078 a	

Médias seguidas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 4.** Valores médios, nº de raízes, nº de brotos, nº de folhas, comprimento da raiz (mm), comprimento da parte aérea (mm), matéria fresca (g) e matéria seca (g) de *Eriope blanchetii* cultivadas em 25 ou 30 °C.

	TEMPERATURA	
	25 °C	30 °C
Número de Raízes	1,27 a	0,22 b
Número de Brotos	2,85 a	1,64 b
Número de Folhas	8,87 a	3,33 b
Tamanho da Raiz	6,64 a	0,94 b
Tamanho da parte aérea	21,15 a	14,08 b
Matéria fresca	0,043 a	0,021 b
Matéria seca	0,008 a	0,004 b

Médias seguidas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quanto à influência da temperatura, para todas as variáveis aqui analisadas, a temperatura de 25 °C apresentou os melhores resultados (Tabela 4), de forma que a temperatura de 30 °C não é recomendada para a multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii*. Estes resultados indicam que o metabolismo e as atividades de tecidos em crescimento possuem alguma relação com a temperatura do ambiente. Embora seja esperado que algumas espécies tropicais exijam temperaturas mais altas durante o cultivo *in vitro*, como *Monstera deliciosa* Liebm. a 30 °C

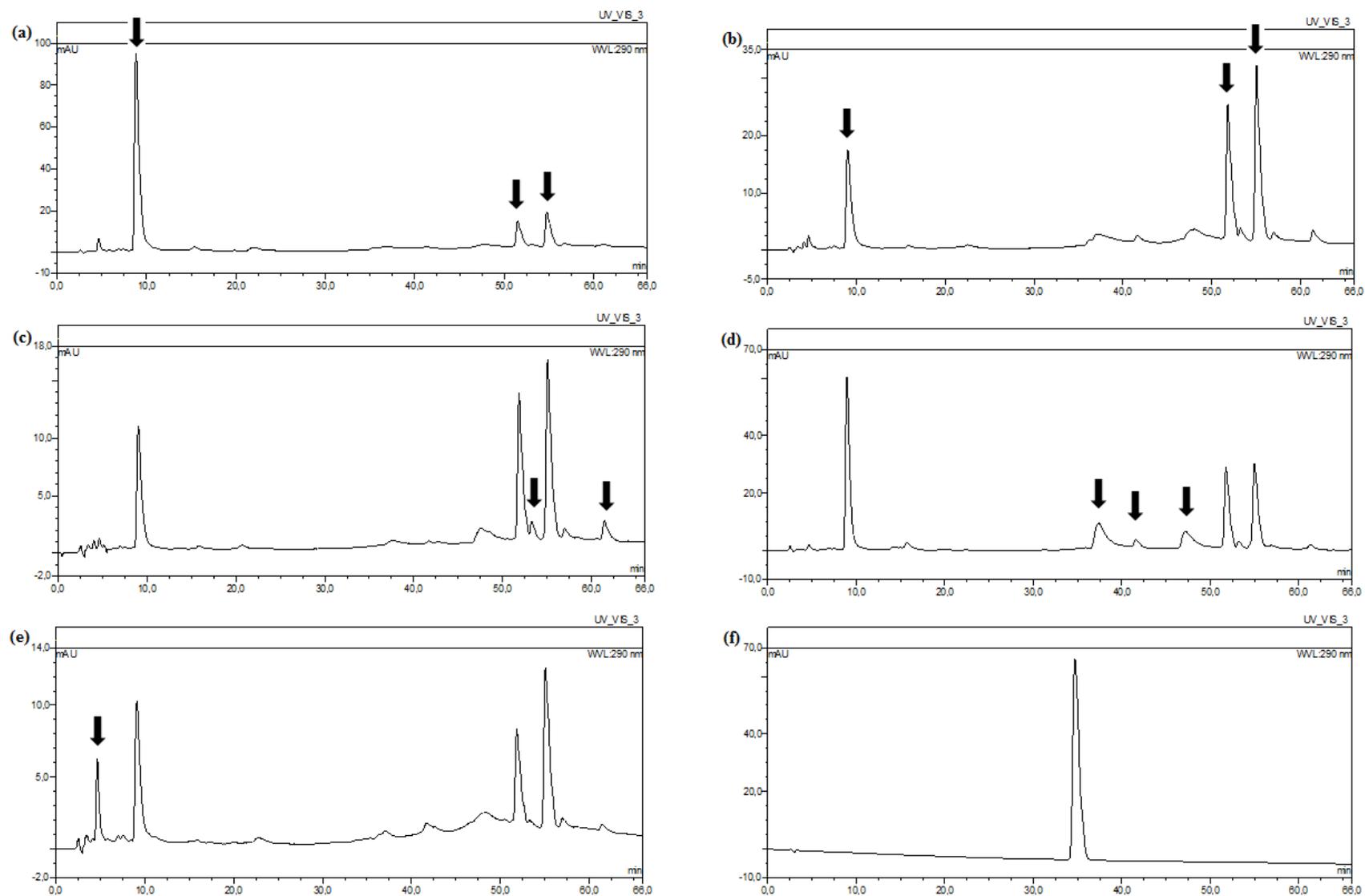
(FONNESBECH; FONNESBECH, 1980), é comum para a maioria das culturas o estabelecimento de uma temperatura ótima de  $25 \pm 2$  °C (SHARMA et al., 2016).

A Tabela 5 apresenta os valores de matéria seca (g) e extrato (g) obtidos de explantes de *E. blanchetti* submetidos a diferentes condições de cultivo. A análise desses extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelou que três picos estiveram presentes em todos os extratos (Figuras 2a e 2b) apenas variando em tamanho a depender da amostra, enquanto que para alguns extratos, novos picos foram detectados. Em plantas cultivadas com 0µM de BAP + 5.37µM de ANA, 4.44µM de BAP + 5.37µM de ANA, 0µM de BAP + 10.74µM de ANA ou 8.88µM de BAP + 10.74µM de ANA surgiram os picos destacados na Figura 2c. Para plantas cultivadas com 8.88µM de BAP + 0µM de ANA ou 4.44µM de BAP + 0µM de ANA surgiram outros picos destacados na Figura 2d. Já extratos de plantas que foram cultivadas a 30° C apresentaram de forma proeminente o pico destacado na Figura 2e.

Apesar da técnica de cromatografia ter sido eficiente na separação dos picos, no tempo de realização desta pesquisa, não foi possível a identificação das substâncias que cada um representa. Dessa forma, para trabalhos futuros, recomenda-se o uso da cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS). Essa técnica possibilita a melhoria de precisão e identificação dos resultados, ao passo que combina o poder de separação da HPLC com, a capacidade de detectar e confirmar a identidade molecular, do espectrômetro de massa.

**Tabela 5.** Valores de matéria seca (g) e extrato (g) de *E. blanchetii* em função das diferentes condições de cultivo.

Condições de cultivo	Matéria seca (g)	Extrato (g)
Controle	0,0428	0,0116
Temperatura de 30 °C	0,0200	0,0054
0µM BAP + 5.37µM ANA	0,0402	0,0078
0µM BAP + 10.74µM ANA	0,0422	0,0144
4.44µM BAP + 0µM ANA	0,0320	0,0101
4.44µM BAP + 5.37µM ANA	0,0372	0,0081
4.44µM BAP + 10.74µM ANA	0,0344	0,0107
8.88µM BAP + 0µM ANA	0,0460	0,0172
8.88µM BAP + 5.37µM ANA	0,0398	0,0132
8.88µM BAP + 10.74µM ANA	0,0406	0,0102



**Figura 2.** Cromatogramas de alguns extratos de *E. blanchetii* (a, b, c, d, e) e padrão da podofilotoxina (f).

A podofilotoxina que, de acordo com o padrão (Figura 2f) apareceria aos 34 minutos e 42 segundos de corrida, não foi detectada em nenhum dos extratos de *E. blanchetii* cultivada *in vitro*. Esses resultados são opostos aos encontrados por Meira e colaboradores (2017), que aplicaram os mesmos tratamentos em *Leptohyptis macrostachys* (Benth.) Harley & JFB Pastore cultivadas *in vitro* e obtiveram concentrações de podofilotoxina, e seu precursor yateína, superiores às encontradas na planta *in natura*. Porém, na literatura, há relatos de outros casos em que o cultivo *in vitro* impediu a expressão do metabólito secundário, como observado em *Atropa belladonna* para a qual a produção de atropina foi nula (BHANDARY et al., 1969).

Apesar de segundo Lourenço (2003), em geral a produção de metabólitos secundários ser baixa em cultura de células vegetais, inúmeros trabalhos de revisão, como aqueles de Rout et al. (2000), Namdeo (2007), Matkowski (2008), e Espinosa-Leal et al. (2018) demonstraram o uso bem sucedido da tecnologia de cultura de tecidos vegetais como uma ferramenta para produção e superexpressão de metabólitos secundários de importância econômica e medicinal. Dessa forma, a baixa produção desses compostos bioativos, assim como presenciado nesse estudo, pode ser explicada pela breve fase estacionária das culturas, que não permitiu a síntese das enzimas necessárias para acúmulo dos compostos (AMARAL; SILVA, 2003).

Diante da complexidade da cascata de expressão dos metabólitos secundários, nem sempre há um caminho lógico, ou protocolo padrão para obtenção dos mesmos (ESPINOSA-LEAL et al., 2018). Existem especificidades tanto a nível de metabólitos quanto a nível de espécie, e estas nem sempre estão claras, o que gera enormes oportunidades para estudos continuados neste campo. De acordo com Matkowski (2008) inúmeras técnicas podem ser aplicadas para superexpressar um metabólito, como a elicitação ou estresse induzido, que faz uso, por exemplo, de radiação UV, xenobióticos, metais pesados, e danos mecânicos como uma forma de induzir a produção de metabólitos secundários em plantas. Estas técnicas ainda não foram testadas em *E. blanchetii* e poderão ser utilizadas futuramente para indução da produção de podofilotoxinas.

## 2.4 Conclusões

Para *E. blanchetii*, os melhores resultados de enraizamento foram obtidos em meio MS com carvão ativado e na ausência de reguladores de crescimento.

Para o desenvolvimento da parte aérea (tamanho e número de brotos) os melhores dados foram obtidos na presença de 8,88 $\mu$ M de BAP. Já para o número de folhas, recomenda-se a combinação dos dois reguladores, 5,37 $\mu$ M de ANA associado a 4,44 $\mu$ M de BAP.

Apesar de não ter sido observada diferença na produção de matéria seca para os tratamentos avaliados, sugere-se a utilização de meio suplementado com 8,88 $\mu$ M de BAP para a multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii* já que esse tratamento foi melhor para outras variáveis relacionadas ao desenvolvimento da planta.

A temperatura ideal para a multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii* é 25 °C.

Apesar dos fatores abióticos empregados durante o cultivo *in vitro*, como fonte de estresse, não foi possível detectar a expressão da podofilotoxina em *E. blanchetii*. Porém, diferenças na composição dos cromatogramas foram detectadas. Assim sendo, para trabalhos futuros, recomenda-se o uso da cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS) como ferramenta para qualificação e quantificação dos picos não identificados.

Novos estudos podem ser realizados no sentido de superexpressar a podofilotoxina em *E. blanchetii in vitro*, visto o potencial da técnica e a importância farmacêutica desse metabólito.

## Referências

- ALTPETER, F. et al.. Advancing crop transformation in the era of genome editing. **Plant Cell**, v. 28, p. 1510-1520, 2016.
- AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. DA. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 55–59, 2003.
- ASMAR, S. A. et al.. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. especial, p. 533- 538, 2011.
- BHANDARY, S. B. R. et al.. Root, callus, and cell suspension cultures, from *Atropa belladonna*, L. and *Atropa belladonna*, Cultivar lutea Döll. **Annals of Botany**, v. 33, n. 4, p. 647–656, 1969.
- BRANDÃO, H. N. et al.. Química e farmacologia de quimioterápicos e antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- COSTA, A. S. da et al.. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço. **Scientia Plena**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2015.
- DAVID, J. P. et al.. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

- ESPINOSA-LEAL, C. A. et al.. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, p. 1-18, 2018.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FLORA DO BRASIL 2020. *Eriope* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8138>>. Acesso em: 03/02/2019.
- FONNESBECH, A.; FONNESBECH, M. *In vitro* propagation of *Monstera deliciosa*. **Horticultural Science**. V. 15, p. 740-741, 1980.
- FORD, Y.Y. et al.. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, v.10, p.1-11, 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p. 183-260, 1998.
- GRAY, D. J.; FISHER, L. C. 1986. *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. In: **Annual Meeting of the Florida State Horticultural Society**. Gainesville: Florida State Horticultural Society. p. 172-174, 1986.
- HARLEY, R. et al.. **Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8142>>. Acesso em: 19/07/2016.
- LOURENÇO, M. V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **Biológico**, v. 65, n. 1, p. 63–65, 2003.
- MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais - guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Imprensa Universitária / Edições UFC, Fortaleza, 2002. 344 p.
- MATKOWSKI, A. Plant in vitro for the production of antioxidants – A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 548-560, 2008.
- MEIRA, P. R. et al.. Abiotic factors influencing podophyllotoxin and yatein overproduction in *Leptohyptis macrostachys* cultivated in vitro. **Phytochemistry Letters**, v. 22, p. 287-292, 2017.
- MONFORT, L. E. F. et al.. Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 231-239, 2018.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NAMDEO, A. G. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. **Pharmacognosy Reviews**, v, 1, p. 69-79, 2007.
- OCHOA-VILLARREAL, M. et al.. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v. 49, p. 149-158, 2016.

- PARANHOS, J. T. et al.. *In vitro* propagation of *Casearia sylvestris* Swaetz (Salicaceae). **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1191-1199, 2017.
- PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. (Ed.) **Fisiologia Vegetal**. 2<sup>ed</sup>. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 213-234, 2013.
- PETROVICK, P. R. et al.. From a medicinal plant to a hydroalcoholic dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Natural Products Research in Brazil**. v. 49, n. 5/6, p. 364-368, 1997.
- RAOA, S. R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**,v. 20, p. 101-153, 2002.
- REIS, E. S. et al.. 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.
- ROUT, G. R. et al.. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 91-120, 2000.
- SHARMA, M. K. et al.. Optimization of culture conditions for high frequency *in vitro* shoot multiplication in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Applied and Natural Science**, v. 8, n. 3, p. 1565-1569, 2016.
- SILVESTRINI, A. et. al.. Effect of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 749-753, 2002.
- SILVA-LUZ, C. L. da et al.. Flora da Serra do Cipó. **Boletim de Botânica**, Universidade de São Paulo, v. 30, n. 2, p. 109-155, 2012.
- SILVA, S.M.G. **Reguladores vegetais no crescimento *in vitro* de bromélia (*Aechmea blanchetiana*)**. 2010. 58f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) Faculdade de Ciência Agrônômicas da UNESP. Botucatu, 2010.
- SOUZA, A. V. et al.. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.13, p. 319 -327, 2011.
- SOUZA, A. V., PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.
- SOUZA, F. P. de. **Micropropagação de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae)**. 2015. 63f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- VILLA, F. et al.. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Revista Ceres**, v. 54, n. 312, p. 118-124, 2007.

## CONCLUSÕES GERAIS

Sementes de *Eriope blanchetii* apresentam viabilidade moderada de 60% e teor de umidade de 61%. Além disso, *E. blanchetii* apresenta dormência em suas sementes. Essas características representam um desafio tanto para o estabelecimento *in vitro* quanto para a conservação das sementes.

Para a germinação *in vitro* de *Eriope blanchetii*, recomenda-se o uso de substrato composto apenas por água gelificado com ágar 0,7%, a fim de diminuir a progressão da contaminação, além de uma desinfestação em duas etapas: pré-germinativa, a nível de semente, e pós-germinativa, a nível de planta. Para conservação, as sementes podem ser mantidas a -80°C por até 90 dias sem comprometer o seu potencial germinativo. Já para a superação da dormência, o protocolo mais eficiente foi a embebição das sementes em solução de giberelina 200mg/L por 1h.

Em adição, para o estabelecimento *in vitro* de *E. blanchetii*, o melhor meio de cultura foi o Murashige & Skoog (MS) (1962), suplementado com sacarose 3% e carvão ativado 0,2%. Nessas condições foram obtidos maiores quantidades de matéria fresca e seca, e de número de folhas.

A temperatura ideal para a multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii* é 25 °C. Dentre os tratamentos na presença de reguladores de crescimento, o meio MS na ausência de BAP e ANA obteve os melhores resultados de enraizamento (número de raízes e comprimento da raiz). Já para o desenvolvimento da parte aérea (número de brotos e tamanho da parte aérea) os melhores dados foram obtidos na presença de 8.88µM de BAP.

Apesar do maior valor de matéria fresca ter sido obtido na presença de 8,88µM de BAP, para ganho de matéria seca, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos. Porém, uma vez que para outras variáveis, como número de brotos, tamanho da parte aérea e matéria fresca, os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura suplementado com 8,88µM de BAP e ausência de ANA, e que a presença deste regulador não interferiu na produção de matéria seca, essa é a melhor condição para a multiplicação *in vitro* de *E. blanchetii*.

Os fatores abióticos empregados, durante o cultivo *in vitro*, como fonte de estresse (temperatura e balanço entre BAP e ANA), não contribuíram para detecção da podofilotoxina em *E. blanchetii*, através da técnica de HPLC. Porém, novos estudos podem ser realizados no

sentido de superexpressar a podofilotoxina em *E. blanchetii* cultivada *in vitro*, visto o potencial da técnica e a importância farmacêutica desse metabólito.

## **APÊNDICES**

**Resumo das análises de variância**

**Cromatogramas e espectro UV**

## ANÁLISES DE VARIÂNCIA REFERENTES AO CAPÍTULO 1

**Apêndice A.** Resumo das análises de variância para germinabilidade (%), tempo médio de germinação (dias), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes *Eriope blanchetii* em função dos diferentes tratamentos para quebra de dormência.

Causas de variação	GL	Quadrados médios		
		G (%)	Tm (dias)	IVG
Tratamentos	11	1702,55**	774,36**	0,15**
<b>Resíduo</b>	36	29,11	115,77	0,00
<b>CV (%)</b>		38,54	61,08	50,88

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

**Apêndice B.** Resumo das análises de variância para contaminação (%), germinação (%) e sobrevivência (%) durante o estabelecimento *in vitro* de *Eriope blanchetii* em função dos diferentes tratamentos de desinfestação.

Causas de variação	GL	Quadrados médios		
		Contaminação	Germinação	Sobrevivência
Tratamentos	6	1192,57**	3262,29**	646,29**
<b>Resíduo</b>	21	213,71	112,38	19,62
<b>CV (%)</b>		32,38	59,84	83,8

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

**Apêndice C.** Resumo das análises de variância para germinabilidade (%), tempo médio de germinação (dias) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes *Eriope blanchetii* em função do ambiente de conservação (sílica, -20 °C, e -80 °C) e tempo de armazenagem (30, 90, 180 e 360 dias).

Causas de variação	GL	Quadrados médios		
		Germinabilidade	Tempo Médio	IVG
Ambiente	2	453,0**	4207,25**	0,042**
Tempo	3	143,4**	190,24 <sup>ns</sup>	0,013**
Ambiente x Tempo	6	62,8**	497,38**	0,004*
<b>Resíduo</b>	36	15,4	66,82	0,002
<b>CV (%)</b>		68,35	44,03	77,34

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

**Apêndice D.** Resumo das análises de variância para número de raízes, números de brotos e número de folhas, de plantas de *Eriope blanchetii*, em função da concentração de sais e da presença e ausência de carvão ativado no meio de cultura.

<b>Causas de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados médios</b>		
		<b>Nº de Raízes</b>	<b>Nº de Brotos</b>	<b>Nº de Folhas</b>
Concentração de sais	1	0,015 <sup>ns</sup>	0,006 <sup>ns</sup>	138,24 <sup>ns</sup>
Carvão	1	0,002 <sup>ns</sup>	1,927 <sup>ns</sup>	296,81*
Concentração de sais x Carvão	1	0,735**	0,327 <sup>ns</sup>	37,50 <sup>ns</sup>
<b>Resíduos</b>	20	0,090	0,879	67,96
<b>CV (%)</b>		92,14	21,88	25,21

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

**Apêndice E.** Resumo das análises de variância para tamanho da raiz, tamanho da parte aérea, matéria fresca (g) e seca (g), de plantas de *Eriope blanchetii*, em função da concentração de sais e da presença e ausência de carvão ativado no meio de cultura.

Causas de variação	GL	Quadrados médios			
		Tamanho da Raiz	Tamanho da parte aérea	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)
Concentração de sais		18,45 <sup>ns</sup>	1,06 <sup>ns</sup>	0,006 <sup>ns</sup>	0,000316**
Carvão		42,88 <sup>ns</sup>	3,65 <sup>ns</sup>	0,025**	0,000204**
Concentração de sais x Carvão		52,45 <sup>ns</sup>	12,44 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	0,000007 <sup>ns</sup>
<b>Resíduos</b>		26,85	11,46	0,001	0,000019
<b>CV (%)</b>		180,88	12,83	25,59	21,06

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

## ANÁLISES DE VARIÂNCIA REFERENTES AO CAPÍTULO 2

**Apêndice F.** Resumo das análises de variância para presença e ausência de calo, número de raízes, números de brotos e número de folhas, de plantas de *Eriope blanchetii*, em função da concentração dos reguladores vegetais BAP e ANA ( $\mu\text{M}$ ) no meio de cultura.

Causas de variação	GL	Quadrados médios			
		Calo	Nº de Raízes	Nº de Brotos	Nº de Folhas
BAP	2	0,0002 <sup>ns</sup>	0,76**	0,19 <sup>ns</sup>	3,11 <sup>ns</sup>
ANA	2	0,0020 <sup>ns</sup>	0,88**	0,77**	34,20**
BAP x ANA	4	0,0019 <sup>ns</sup>	0,76**	3,51**	42,82**
<b>Resíduos</b>	36	0,0016	0,05	0,14	2,40
<b>CV (%)</b>		169,03	101,26	13,32	

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

**Apêndice G.** Resumo das análises de variância para tamanho da raiz, tamanho da parte aérea, matéria fresca (g) e seca (g), de plantas de *Eriope blanchetii*, em função da concentração dos reguladores vegetais BAP e ANA ( $\mu\text{M}$ ) no meio de cultura.

Causas de variação	GL	Quadrados médios			
		Tamanho da Raíz	Tamanho da parte aérea	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)
BAP	2	11,04 <sup>ns</sup>	5,72 <sup>ns</sup>	0,000386**	0,000011**
ANA	2	26,26**	71,30**	0,000057 <sup>ns</sup>	0,000007 <sup>ns</sup>
BAP x ANA	4	24,81**	23,28**	0,000064 <sup>ns</sup>	0,000002 <sup>ns</sup>
<b>Resíduos</b>	36	3,61	1,55	0,000063	0,000001
<b>CV (%)</b>		136,94	6,69	16,17	13,88

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

**Apêndice H.** Resumo das análises de variância para presença e ausência de calo, número de raízes, números de brotos e número de folhas, de plantas de *Eriope blanchetii*, em função da temperatura de cultivo *in vitro*.

Causas de variação	GL	Quadrados médios			
		Calo	Nº de Raízes	Nº de Brotos	Nº de Folhas
Temperatura	1	0,0003 <sup>ns</sup>	2,76**	3,66**	76,73**
<b>Resíduos</b>	2	0,0003	0,14	0,07	1,06
<b>CV (%)</b>		316,23	50,47	4,24	16,88

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

**Apêndice I.** Resumo das análises de variância para tamanho da raiz, tamanho da parte aérea, matéria fresca (g) e seca (g), de plantas de *Eriope blanchetii*, em função da temperatura de cultivo *in vitro*.

Causas de variação	GL	Quadrados médios			
		Tamanho da Raíz	Tamanho da parte aérea	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)
Temperatura	1	81,25*	124,93**	0,001232**	0,000048**
<b>Resíduos</b>	2	9,50	2,44	0,000028	0,000002
<b>CV (%)</b>		81,38	8,87	19,38	

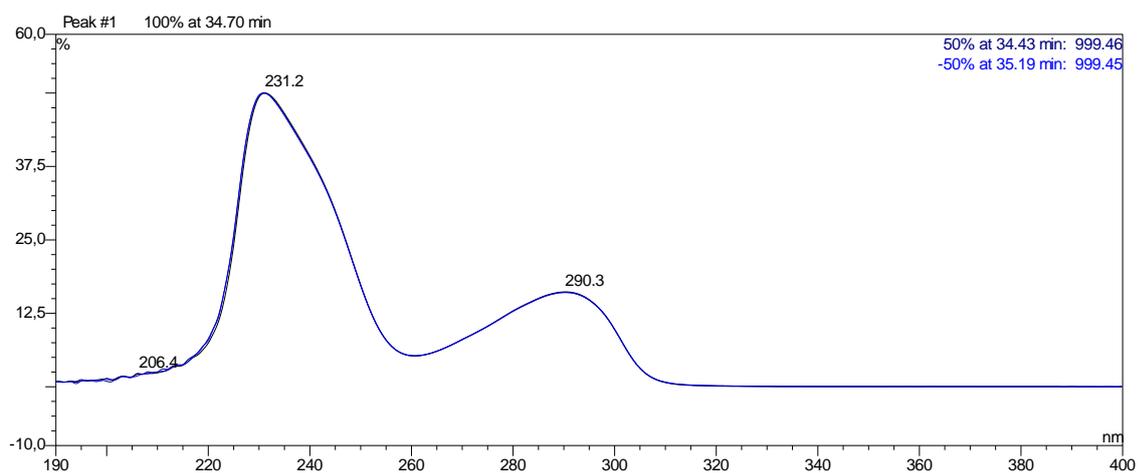
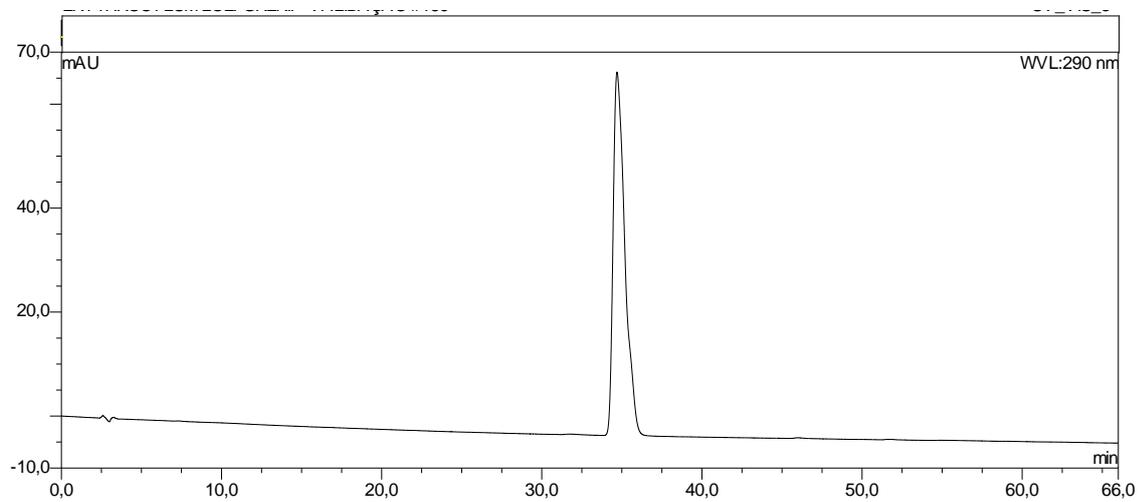
\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

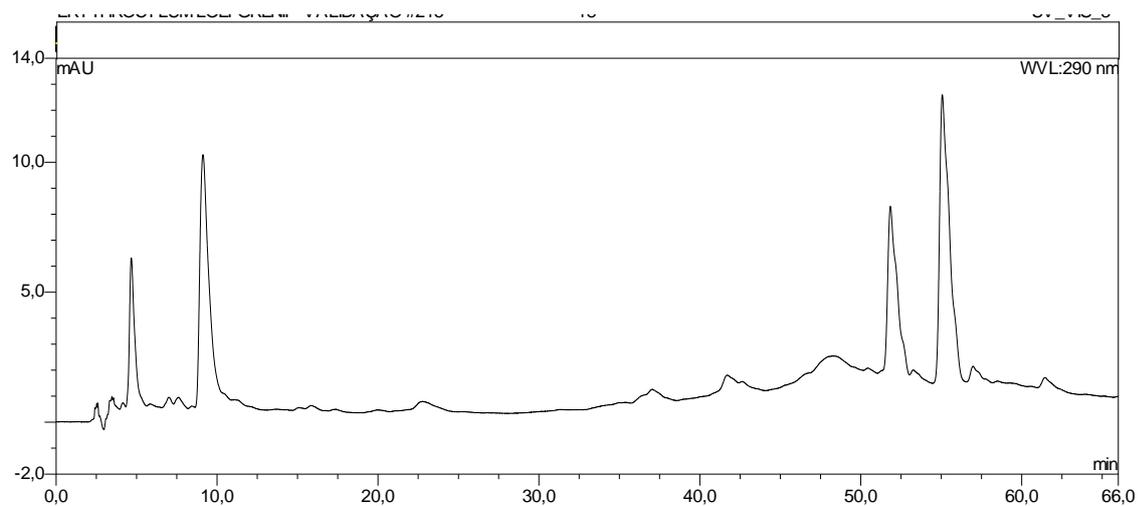
<sup>ns</sup> - não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

## CROMATOGRAMAS E ESPECTRO UV DO CAPÍTULO 2

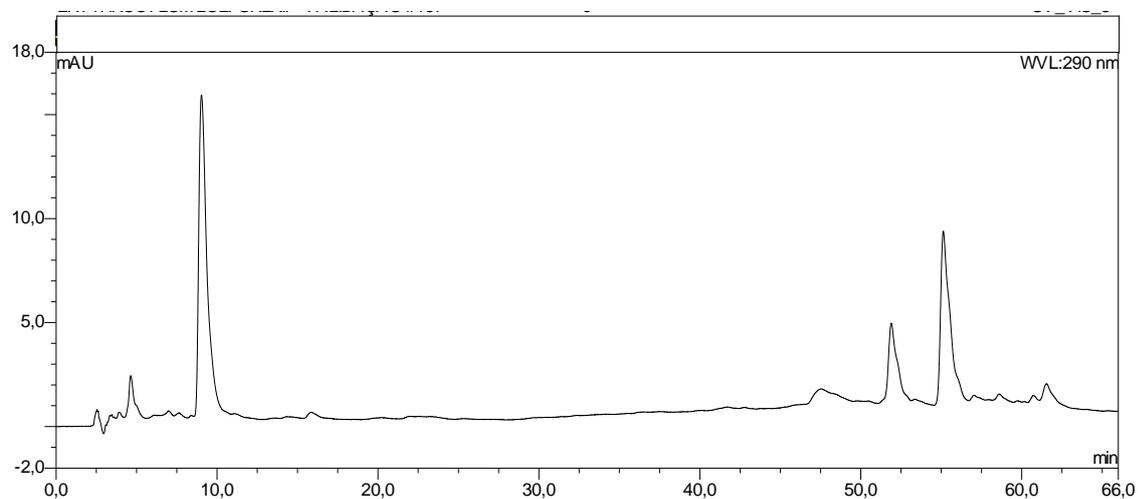
### Apêndice J. Cromatograma e espectro UV do padrão de podofilotoxina.



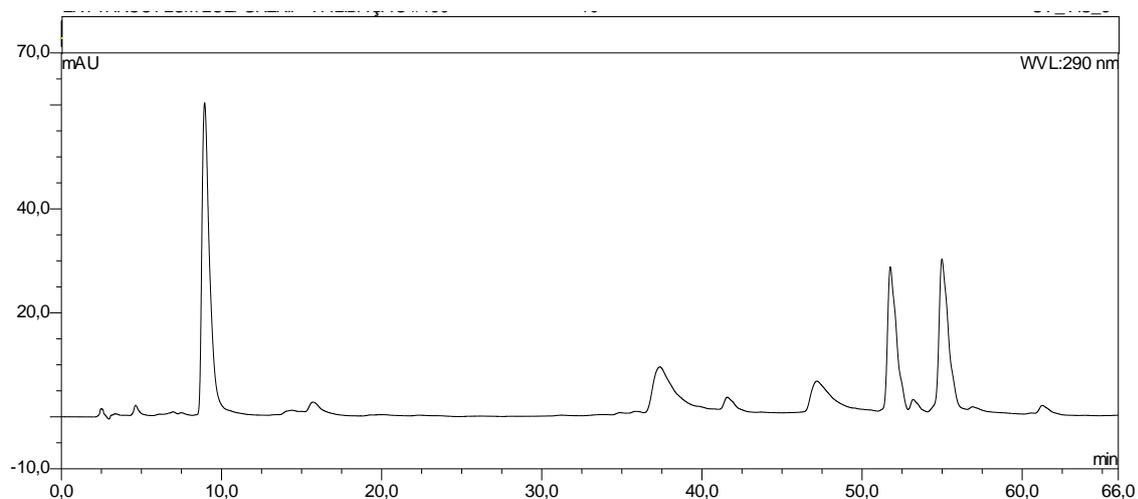
**Apêndice K.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 30 °C.



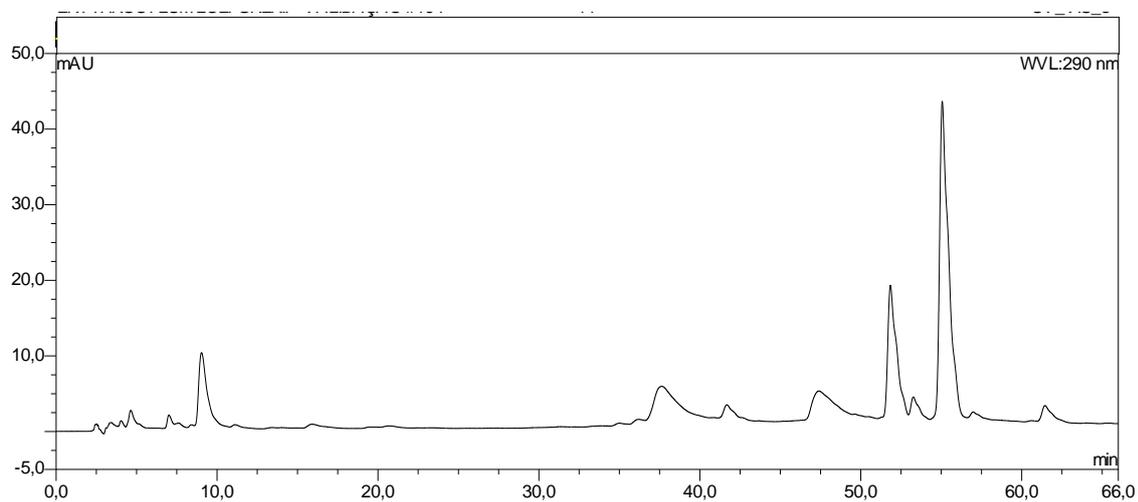
**Apêndice L.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C (controle).



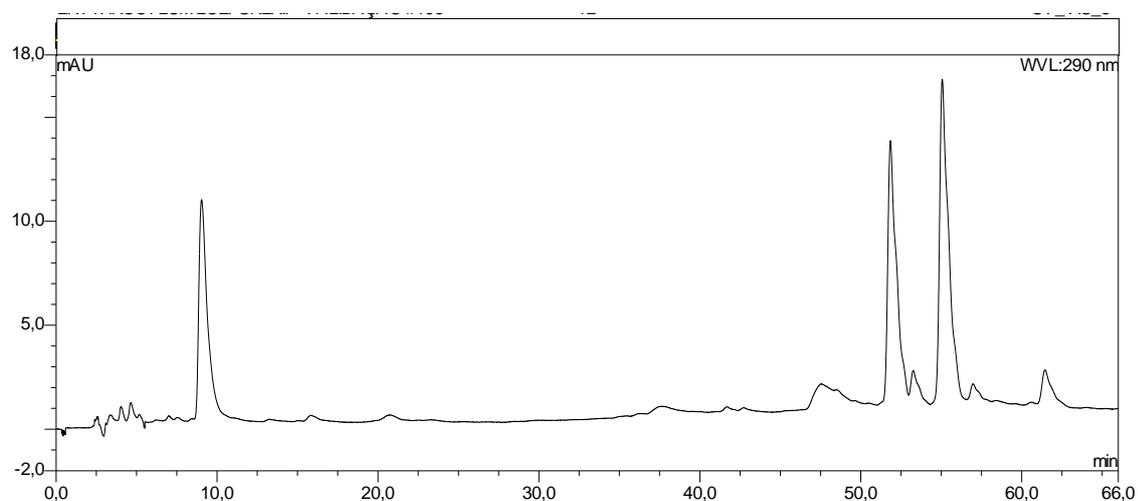
**Apêndice M.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C, acrescido com 4,44 $\mu$ M de BAP.



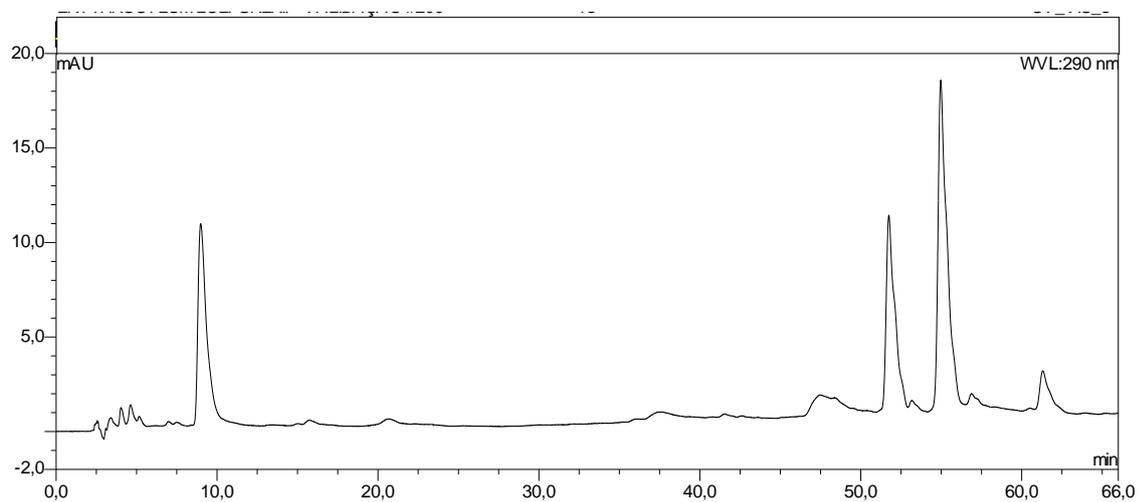
**Apêndice N.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C, acrescido com 8,88 $\mu$ M de BAP.



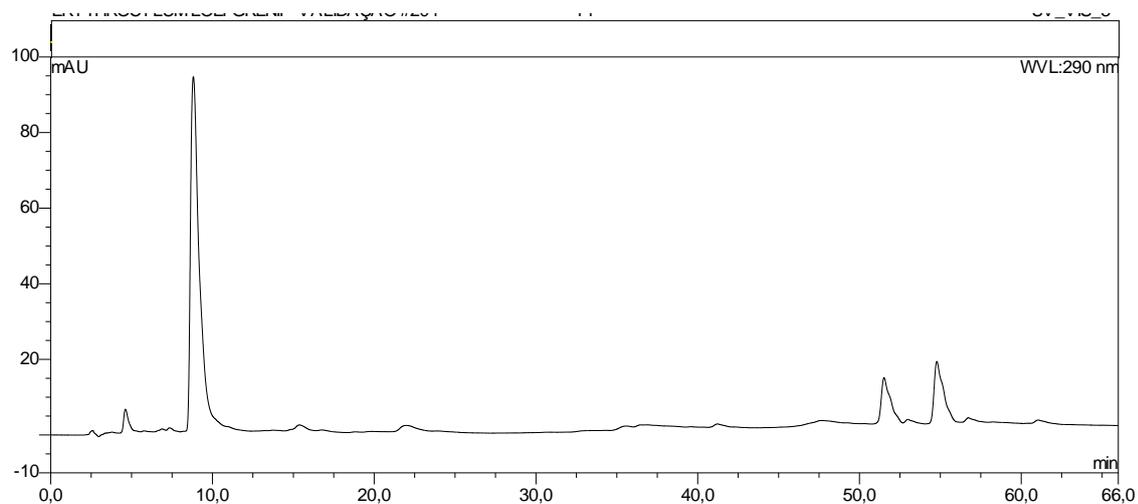
**Apêndice O.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C, acrescido com 5,37 $\mu$ M de ANA.



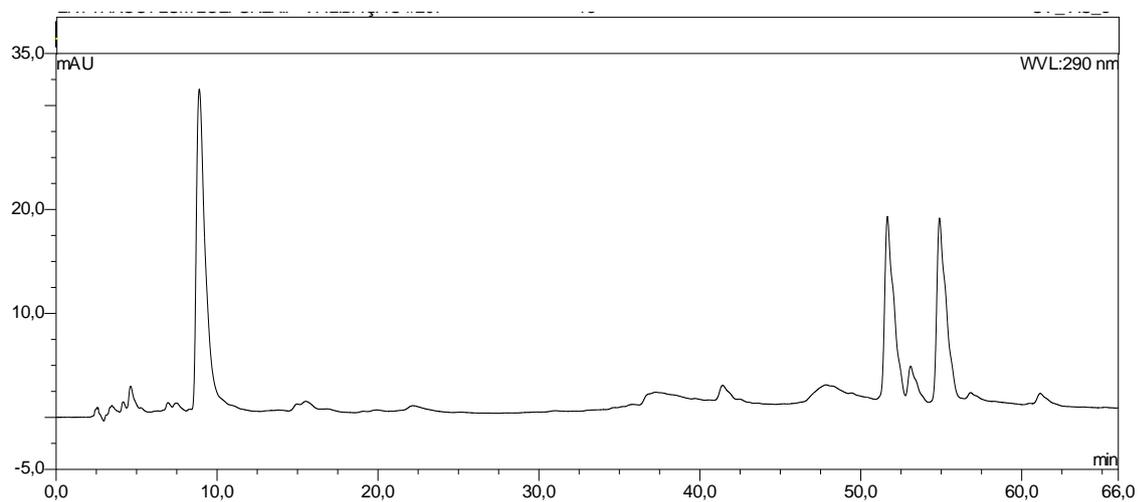
**Apêndice P.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C, acrescido com 4,44 $\mu$ M de BAP e 5,37 $\mu$ M de ANA.



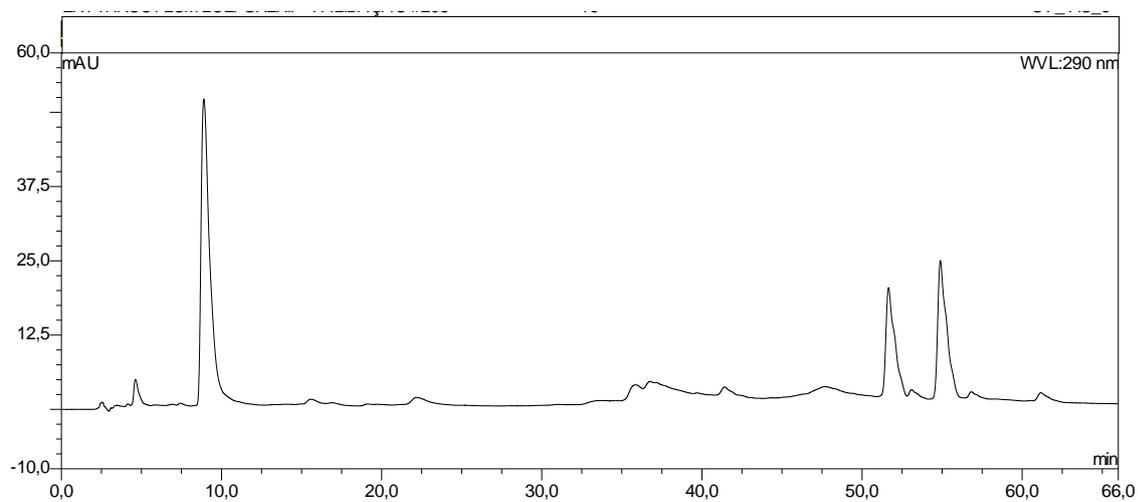
**Apêndice Q.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C, acrescido com 8,88 $\mu$ M de BAP e 5,37 $\mu$ M de ANA.



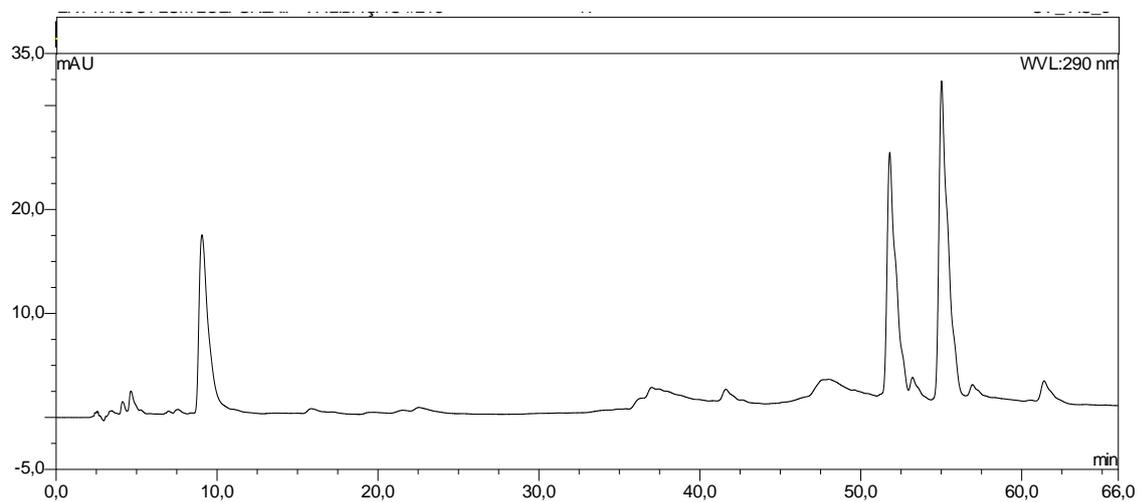
**Apêndice R.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C, acrescido com 10,74 $\mu$ M de ANA.



**Apêndice S.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C, acrescido com 4,44 $\mu$ M de BAP e 10,74 $\mu$ M de ANA.



**Apêndice T.** Cromatograma do extrato de plantas de *Eriope blanchetii* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose e 0,2% de carvão ativado, a 25 °C, acrescido com 8,88 $\mu$ M de BAP e 10,74 $\mu$ M de ANA.



## ANEXOS

**Anexo A.** Constituintes do meio Murashige & Skoog - MS (1962)

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRAÇÃO (mgL<sup>-1</sup>)</b>
<b>MACRONUTRIENTES</b>	
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
<b>MICRONUTRIENTES</b>	
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
<b>VITAMINAS</b>	
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