



FACULDADE MARIA MILZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO PROFISSIONAL EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL  
E MEIO AMBIENTE

MARCELO DA SILVA PASSOS

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen E  
*Melissa officinalis* L.

GOVERNADOR MANGABEIRA/BA  
2015

**MARCELO DA SILVA PASSOS**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen E  
*Melissa officinalis* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade Maria Milza, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Prof. Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida

**CRUZ DAS ALMAS/BA  
2015**

### Dados Internacionais de Catalogação

Passos, Marcelo da Silva

S289m Multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Melissa Officinalis* L. / Marcelo da Silva Passos. – 2015

76 f.

Orientador: Prof. Weliton Antonio Bastos de Almeida

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Maria Milza, 2015.

1. Cultivo *in vitro*. 2. Plantas medicinais 3. *Pfaffia glomerata*. 4. *Melissa Officinalis* L. I. Almeida, Weliton Antonio Bastos de. II. Título.

CDD 633.88

MARCELO DA SILVA PASSOS

MULTIPLICAÇÃO "IN VITRO" DE PFAFFIA GLOMERATA (SPRENG.) PEDERSEN  
E MELISSA OFFICINALIS L.

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Desenvolvimento Regional e  
Meio Ambiente da Faculdade Maria Milza  
(FAMAM), como requisito parcial para obtenção  
do título de Mestre.

**Área de Concentração:** Dinâmica Regional e  
Desenvolvimento Sustentável

**Orientador:** Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos  
de Almeida

Aprovado em: 26 / fevereiro / 2015

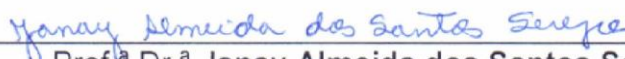
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. ~~Weliton Antônio Bastos de Almeida~~  
Faculdade Maria Milza (FAMAM)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ~~Maria Angélica P. de Carvalho Costa~~  
Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ~~Janay Almeida dos Santos Serejo~~  
Faculdade Maria Milza (FAMAM)

GOVERNADOR MANGABEIRA - BA  
2015

A minha esposa  
Mercia da Silva Pinheiro Passos.

**DEDICO**

Aos meus pais Edmundo Ney e Laurenice;

Aos meus queridos filhos:

Murilo, Marcela, e Maurício.

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS pela oportunidade de existir e pela sua infinita misericórdia.

A minha esposa e meus filhos motivo de minha inspiração e força de vontade.

Aos meus pais Ney e Lena, que sempre acreditaram no meu potencial e acreditaram em mim desde o ensino médio.

Ao Prof<sup>o</sup>. Weliton Antonio Bastos de Almeida pela amizade, a quem demonstro admiração e respeito pela orientação e incentivo nas horas mais difíceis, e pelos ensinamentos e confiança a mim transferidos.

A Prof<sup>a</sup>. Maria Angélica pelo apoio e amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Vânia pelas infindáveis tardes de trabalho no laboratório e pelos ensinamentos passados com muita sabedoria e paciência.

A Dr<sup>a</sup> Fabíola Rebouças pelos auxílio e experiência no ensino da prática laboratorial.

Aos colegas de laboratório Tiana Cerqueira (também colega de mestrado), Magno Andrade dos Santos e Fernando Chagas (alunos da graduação) pelo apoio e auxílio nas intermináveis tardes de experimentação.

Ao Centro Educacional Maria Milza por ter flexibilizado meus horários e incentivo, na pessoa da sua Coordenadora Alina Silva Souza Rebouças, sem o qual não seria possível a realização desta tarefa.

A todos os colegas de mestrado. E em especial à Endrigo Sampaio, Nubia Passos, Ana Teixeira, Jailson Brandão, Patricia Katiana, Paulo Sergio (Gil), Roque Sergio, Romilsom Calixto, Suzane Casas e outros da minha turma que tanto me incentivaram.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

## RESUMO

### **MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen E *Melissa officinalis* L.**

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente de micropropagação e indução de brotos *in vitro*, para *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Melissa officinalis* L., respectivamente, visando melhor eficiência para estudos farmacológicos, bem como o incentivo a preservação destas espécies de plantas medicinais, tão comumente utilizados no extrativismo humano. Para isto, dois capítulos foram desenvolvidos. No primeiro, utilizou-se segmentos nodais de plantas de *P. glomerata* cultivadas em campo que foram devidamente desinfestados e em seguida introduzidos em meio de cultura de estabelecimento (MS), suplementado com BAP (Benzilaminopurina-6) - 0,0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, experimentos 1 e 2 respectivamente. Após os 60 dias as plantas obtidas foram seccionadas em 5 partes de 1,0 cm (explantes), contendo segmentos nodais, que foram introduzidas em meios de cultura de multiplicação *in vitro*, variando-se concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 ou 4,0 mg L<sup>-1</sup>). Posteriormente, as brotações enraizadas (microplantas) foram transferidas para o processo de aclimação, utilizando-se, como recipientes, garrafas de refrigerante do tipo PET. Avaliou-se o número médio de brotos por explante que revelou melhores resultados na combinação que utilizou 1,0 mg L<sup>-1</sup> na fase do estabelecimento, com 3,0 mg L<sup>-1</sup> na fase de multiplicação com uma média de 7,7 brotos/explantes. Com isso, foi possível estimar a obtenção de 57.000 plantas ao final de 6 meses com 3 subcultivos, demonstrando, assim, elevada produtividade. Além disso, constatou-se eficiência e viabilidade econômica quanto ao uso das garrafas PET para aclimação. No segundo capítulo, estudou-se a indução de brotações a partir de segmentos nodais de plantas cultivadas *in vitro* de *M. officinalis*. Os segmentos nodais (explantes), na fase de estabelecimento, foram submetidos a desinfestação em solução de álcool etílico na concentração de 70%, durante 1 minuto, e em solução de hipoclorito de sódio (NaOH), nas proporções de 3 : 1 e 4 : 1, durante 15 minutos. Após isto, foram introduzidos em placas de Petri contendo meio de cultura MS adicionado com 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, acrescido do fungicida (Carbomax<sup>®</sup>) na concentração de 1mg L<sup>-1</sup>, onde permaneceram em sala de crescimento, por 30 dias, sob fotoperíodo, temperatura e intensidade luminosa controladas. Após este período foram transferidos para frascos de 200 ml, contendo 20 mL do mesmo meio de cultura MS para assegurar o desenvolvimento das brotações, durante 30 dias. Em seguida as brotações foram transferidas para frascos de 200 ml, contendo 20 mL de meio MS com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, visando promover o alongamento das brotações, onde permaneceram por mais 30 dias. A concentração 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentou maior número de brotos, com média de 4,0 brotos/explante e a utilização do regulador GA<sub>3</sub> não induziu alongamento caulinar satisfatório.

**Palavras-Chave:** Cultivo *in vitro*. Plantas medicinais. Preservação de espécies.



## ABSTRACT

### **MULTIPLICATION *IN VITRO* *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen AND *Melissa officinalis* L.**

This study aimed to establish an efficient protocol for micropropagation and *in vitro* buds induction, to *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen and *Melissa officinalis* L., respectively, to better efficiency for pharmacological studies, and encouraging the preservation of these species of medicinal plants, as commonly used in human extraction. For this, two chapters have been developed. At first, we used nodal *P. glomerata* plants grown in the field which have been properly decontaminated and then introduced into a means of establishing (MS) culture medium supplemented with BAP (6-benzylaminopurine) - 0.0 to 1, 0 mg L<sup>-1</sup>, experiments 1 and 2 respectively. After 60 days the plants obtained were cut into 5 pieces 1.0 cm (explants) containing nodal segments, which were introduced *in vitro* proliferation culture media, varying concentrations of BAP (0.0, 1, 0, 2.0, 3.0 or 4.0 mg L<sup>-1</sup>). Subsequently, the rooted shoots (microplants) were transferred to the acclimatization process, using as containers, soda bottles PET type. We evaluated the average number of shoots per explant which showed better results in the combination that used 1.0 mg L<sup>-1</sup> at the stage of establishment, with 3.0 mg L<sup>-1</sup> in the multiplication phase with a 7.7 sprouts / explants. Thus, it was possible to estimate the achievement of 57,000 plants at the end of 6 months with three subcultures, thus showing high productivity. In addition, it was found efficiency and economic viability in the use of PET bottles for acclimatization. In the second chapter, we studied the induction of shoots from nodal segments of *in vitro* plants of *M. officinalis*. The nodal segments (explants) in the establishment phase, underwent disinfection solution in ethyl alcohol at a concentration of 70% for 1 minute, and sodium hypochlorite solution (NaOH) in the proportions of 3 : 1 and 4 : 1, for 15 minutes. After this, they were placed in Petri dishes containing MS medium added with 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP plus fungicide (Carbomax<sup>®</sup>) at a concentration of 1 mg L<sup>-1</sup>, where they remained in room growth, for 30 days, photoperiod, temperature and light intensity controlled. After they were transferred to 200 ml flasks containing 20 ml of the same medium MS to ensure the development of shoots for 30 days. Then shoots were transferred to 200 ml flasks containing 20 ml of MS medium with 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, to promote the elongation of shoots, where they remained for more 30 days. The concentration 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP presented the highest number of shoots with an average of 4.0 shoots / explant and the use of GA<sub>3</sub> regulator did not induce shoot elongation satisfactory.

**Key-words:** *In vitro* culture. Medicinal plants. Species preservation.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
1.1.1	ASPECTOS HISTÓRICOS E USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	11
1.1.2	ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA MEDICINAL DE <i>Pfaffia glomerata</i> (Pedersen.) Spreng.....	15
1.1.3	ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS, DE CULTIVO COMERCIAL E IMPORTÂNCIA MEDICINAL DE <i>Melissa Officinalis</i> L. ....	17
1.1.4	A MICROPROPAGAÇÃO E SUA IMPORTÂNCIA PARA PLANTAS MEDICINAIS.....	21
2	Micropropagação de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen (Ginseng-brasileiro).....	26
3	Indução de brotações a partir de segmentos nodais de plantas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>Melissa officinalis</i> L. ....	44
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
	REFERÊNCIAS .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

A medicina alternativa baseada na utilização de plantas medicinais vem sendo utilizada ao longo de toda a história da humanidade para o tratamento de diversas enfermidades, e muitas espécies de vegetais com propriedades fitoterápicas vem sendo cultivadas e melhoradas geneticamente pelo homem ao longo de sua existência.

É comum encontrarmos relatos históricos e descrições da utilização de plantas medicinais em livros sagrados, pinturas rupestres e registros arqueológicos ligados a antropologia. O consumo e os benefícios de drogas extraídas de vegetais ao longo da história da humanidade já são conhecidos há milênios. Muitas substâncias já foram identificadas e apresentam efeito terapêutico comprovado.

Quando, a milhares de anos, o homem começou a usar ervas e temperos na alimentação, subjetivamente e inconscientemente passou a ingerir ao mesmo tempo substâncias que interferiam positivamente no seu metabolismo, e rapidamente passou a relacionar a sensação de bem-estar ao consumo dessas plantas. O uso de ervas e especiarias na gastronomia estabeleceu-se em parte como uma resposta à ameaça de microrganismos de origem alimentar capazes de causar doenças, ou seja, como conservantes e até como flavorizantes – substâncias capazes de acentuar o sabor dos alimentos.

A *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, também conhecida como 'ginseng brasileiro' apresenta, segundo a literatura científica, reconhecida propriedade tônica, revigorante, afrodisíaca e anti-diabética, sendo utilizada em chás e infusões como estimulante pelo homem do campo praticamente em todo o país, sendo encontrada nos cerrados, chapadões e florestas. Apresenta compostos químicos denominados ginsenosídeos, com reconhecidas propriedades medicinais.

A *Melissa officinalis* L., (Erva-Cidreira) que é originária da Ásia e Europa meridional, adaptou-se bem ao clima brasileiro e é plantada em hortas, fazendas e quintais. Tem sido bastante utilizada, de acordo com a literatura, no combate a problemas digestivos, cólicas intestinais, como calmante e indutora do sono. Apresenta ainda outras inúmeras propriedades medicinais.

A cultura de tecidos, especialmente através da técnica da micropropagação, tem contribuído para a multiplicação de diversas espécies. Assim, poderá ser uma ferramenta importante no cultivo de *P. glomerata* e *M. officinalis*. Entretanto, para obtenção de protocolos eficientes torna-se necessário superar algumas etapas: a) estabelecimento dos explantes. Nesta fase, problemas como contaminação e oxidação são grandes entraves. A *M. officinalis* tem se mostrado altamente susceptível a contaminação por fungos e bactérias, que tem dificultado o estabelecimento *in vitro* desta planta; b) multiplicação *in vitro*. Nesta etapa o uso de reguladores vegetais, especialmente do grupo das citocininas, é fundamental para induzir a máxima proliferação de brotos; c) enraizamento *in vitro*. Nesta fase é fundamental o uso de meio de cultura adequado, que favoreça a indução de raízes nas brotações e d) aclimação das plantas. Nesta etapa o uso de substrato adequado e o tipo de recipiente utilizados são importantes no sucesso da adaptação das plantas ao novo ambiente. A utilização de garrafas PET (politereftalato de etileno – um polímero sintético termoplástico) de refrigerantes, como recipientes, vem se mostrando muito eficiente neste processo. Além disso, poderá contribuir na redução dos custos de produção das mudas *in vitro* e, ao mesmo tempo, desempenhar grande importância ecológica ao permitir o reaproveitamento de materiais plásticos, inibindo seus efeitos devastadores no meio ambiente.

O fato da espécie *M. officinalis* ser muito susceptível a contaminação por fungos e bactérias quando propagada *in vitro*, justifica seu estudo na tentativa de preservar suas características genéticas quando estabelecida em protocolos de cultura de tecidos. O estudo também tem por mérito permitir o acesso de comunidades carentes às duas espécies estudadas e tornar possível sua utilização na atenção primária de inúmeras enfermidades.

Portanto, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente de micropropagação e indução de brotos *in vitro*, para *P. glomerata* e *M. officinalis*, respectivamente, visando futuros estudos farmacológicos, bem como preservar estas duas importantes espécies de plantas medicinais, do extrativismo humano.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E USO DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são largamente utilizadas desde os primórdios da civilização por vários povos e de diversas maneiras. O uso terapêutico das plantas medicinais, com a finalidade de prevenção e cura de muitas enfermidades constituiu-se como uma prática milenar, historicamente construída em torno da sabedoria popular, senso comum, reúne cultura e saúde (LORENZI, 2002).

Segundo Argenta et al. (2011) os primeiros registros sobre plantas medicinais foram realizados no período Egípcio, Dinastia XVIII de Ramsés II. Tal documento que foi traduzido em 1890 escreve aproximadamente 100 doenças, listando um quantitativo de drogas naturais utilizadas como tratamento. De acordo com Viegas (2006), esse material talvez tenha sido uma das primeiras exposições sobre o uso de produtos naturais na cura de moléstias.

A arqueologia já comprovou que drogas de origem vegetal já eram utilizadas em grande escala em diversas culturas antigas. Marinibettolo (1974, *apud* Argenta et al., 2011, p. 53) descreve,

Nozes de bétele, uma planta aromática que contém substâncias psicoativas, eram mascadas há 13 mil anos no Timor; artefatos descobertos no Equador estendem o uso das folhas de coca a 5000 anos atrás; a civilização árabe, no século VII, descreveu o emprego dos purgativos e cardiotônicos de origem vegetal; as culturas americana, especialmente a Inca, Asteca, Maia, Olmeca e Tolteca consignaram a civilização moderna a quina, a ipecacuanha, a coca e muitas outras drogas vegetais de valor terapêutico, até hoje indispensável a medicina moderna.

No Brasil, o uso de plantas no tratamento de doenças foi relatado em 1587, no documento intitulado Tratado Descritivo do Brasil. Todos os insumos medicinais utilizados pelos índios foram então registrados. No desenvolver das civilizações, plantas medicinais sempre foram utilizadas para tratamento e cura de doenças (CUNHA, 2004).

Plantas são usadas como o único recurso terapêutico de uma parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população do planeta. Os principais fatores que influenciam na manutenção desta prática são o baixo nível de vida da população e o alto custo dos medicamentos (AENTA et al., 2011, p. 52).

Dados da Organização Mundial de Saúde – OMS comprovam que até 80% da população de países em desenvolvimento ainda dependem de plantas medicinais como forma única de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR, 2005).

Já em países industrializados, como os Estados Unidos, cerca de vinte e cinco por cento de todos os medicamentos prescritos, dispensados por farmácias comunitárias, entre 1959 e 1980, continham substâncias ativas oriundas de plantas superiores (FARNSWORTH; SOEJARTO, 1985, *apud* SCHEFFER 1998, p. 19).

O comportamento baseado na utilização das plantas medicinais apenas como recurso popular pode ser explicado baseado na historicidade de cada povo. A função de estabelecer a relação entre cura e natureza cabia aos curandeiros, feiticeiros, magos, dentre outras denominações atribuídas aos homens que aqui na terra estabeleciam a conexão com o divino. A tarefa de realizar a cura dos enfermos envolvia magia e religião associadas com o conhecimento empírico da utilização das plantas medicinais com fins curativos. Esse quadro começa a sofrer mudanças na era Antiga que inaugurou outro enfoque, quando, a partir do pensamento hipocrático, é estabelecida relação entre ambiente e estilo de vida das pessoas. Assim, os processos de cura deixaram de ser vistos apenas com enfoque espiritual e místico (CAPRA 1993, *apud* ALVIM et al. 2006, p. 18).

A ciência começa a ser ponto de partida para o estudo das doenças, dentro da visão holística, tanto na cultura ocidental quanto oriental, apenas no final da Idade Média. O mundo material passa a ser destaque, o homem começa a ser visto como o centro do universo e a figura do divino e sobrenatural passa a ser contestada. Sequencialmente a essa fase vem a revolução intelectual, momento que as conquistas no campo da ciência e filosofia são amplas e definitivas (COIMBRA, 1994).

A Revolução Científica traz a concepção de novos paradigmas, fenômenos matemáticos e quantificáveis passam a ser a premissa para as explicações na ciência, o que acaba por determinar um novo olhar para as questões de saúde. A visão holística vigente até então é substituída por uma visão de mundo máquina. O que muda com isso é a necessidade de manter uma mão de obra ativa nas fábricas com o advento da Revolução Industrial século XVIII (CORREA JR., 2001).

O século XX chega trazendo com ele a consolidação do positivismo, tal afirmação significa dizer que materializa-se a ruptura com o conhecimento metafísico

solidificando-se a pesquisa experimental. É um momento em que todo meio científico está direcionado para uma visão cartesiana, preocupada em atender a interesses do modo de produção capitalista. É nesse cenário que as plantas medicinais e terapias de ordem popular perdem força, pois a base científica tende a marginalizar tais práticas (MATOS, 2000).

Em se tratando de Brasil, essas transformações no mundo da ciência e da economia ocorreram mais tardiamente, o que colaborou para que as práticas de saúde populares permanecessem hegemônicas até o início do século XX, ocasião em que tal hegemonia começou a ser rompida com a institucionalização dos serviços de saúde e o advento da alopatia, considerados imprescindíveis para o modo de produção emergente (SINGER et al., 1988, *apud* ALVIM 2006, p.20).

O que explica tal posicionamento do Brasil, em uso de plantas medicinais como cultura predominante ainda na Idade Contemporânea, é a posição que o país ocupava em sua economia tipicamente rural, com sua população fixada em grande maioria no início do século XX, no campo, além de ser a única via de tratamento, as políticas públicas de saúde ainda não faziam parte da realidade da população. O resgate histórico do uso das plantas medicinais em grande escala pelo meio científico acontece a partir da década de 80, justificada por uma série de mudanças de ordem política, econômica e social. Nesse momento aqui não afirma-se que a alopatia perde força, mas sim, destaca-se a utilização das plantas medicinais como uma forma de complemento ao tratamento de uma série de doenças, levando principalmente em consideração o respeito e a valorização dos aspectos culturais de tais práticas (PANIZZA, 1982).

O Brasil possui a mais diversificada flora do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores. Esse número considerável de espécies, é favorecido por inúmeros fatores, grande extensão do território, a variabilidade das ocorrências climáticas e dos solos (PRANCE, 1977 *apud* SCHEFFER 1998, p. 10).

Após a recomendação da Organização Mundial da Saúde, na 31ª Assembleia, para que os países desenvolvessem pesquisas, visando a utilização da flora com propósito terapêutico, o Brasil, por meio do Ministério da Saúde, inclui o estudo de plantas medicinais como uma das prioridades de investigação em saúde (BRASIL, 2004). Muitas já são as espécies pesquisadas e utilizadas para fins fitoterápicos, destacando:

Camomila (*Matriaria recutita*), algumas Hortelãs (*Mentha sp.*), o Manjeriço (*Ocimum basilicum*), Erva-cidreira (*Melissa officinalis L.*), o Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), Mentrasto (*Ageratum conyzoides*), o Rubim (*Leonurus sibiricus*), Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia*), Tanchagem (*Plantago major L.*), o Fedegoso ou Manjirioba (*Senna occidentalis*), o Gervão Roxo ou Rinchão (*Stachytarpheta cayennensis*), a Erva-de-jaboti (*Peperomia pellucida*), a Guanxuma ou Relógio (*Sida rhombifolia*), os Quebra-pedras (*Phyllanthus spp.*), o Mastruz (*Chenopodium ambrosioides*), o Dente-de-leão (*Taraxacum officinale*) (SCHEFFER 1998, p. 23).

É preciso que uma conciliação multidisciplinar e profissional seja concretizada no que diz respeito ao trabalho com plantas medicinais. Apesar do avanço ao nível de legislação, o Brasil precisa avançar no estabelecimento de objetivar estratégias para o cultivo de plantas medicinais, bem como a regulamentação da produção, extração e comercialização de tais insumos (MATOS, 2000).

A intensificação do uso correto da fitoterapia é necessária, como uma forma de atender às recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), relativas ao aproveitamento das plantas medicinais nos programas da saúde pública, feitas com o objetivo de se alcançar saúde para todos como a grande meta das nações dos países emergentes (LORENZI, 2002). Segundo Vieira (2002), a tendência global sobre o tema biodiversidade juntamente com as ideias de desenvolvimento sustentável introduzem novos comportamentos em relação aos estudos das plantas medicinais.

O Brasil é privilegiado neste aspecto, possui aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas. Destas, 30 mil podem ser medicinais, aromáticas e úteis, tendo no mercado mundial de produtos farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos, perspectivas de ganhos em torno de centenas de bilhões de dólares ao ano (BARATA, 1995). Inventariar o potencial medicinal da flora do país para sua preservação e uso sustentável é essencial, ressaltando ser indispensável a busca pela conservação da espécie medicinal ameaçada (OLIVEIRA; SILVA, 2005).

Nas últimas duas décadas registra-se o crescimento do mercado de fitoterápicos com o uso indiscriminado, baseado na crença da ausência de efeitos colaterais. Esse comportamento tem gerado preocupação entre os cientistas, que alertam sobre o grande número de plantas medicinais e chás não licenciados vendidos no mundo (MILLER, 1998). A educação da população, sobre o uso adequado das plantas e medicamentos ditos naturais é muito importante para que seu uso possa ser eficiente (CARLINI, 2007).



O mercado brasileiro é paradoxal em relação a comercialização de plantas medicinais, essas, sendo consideradas como altamente promissoras, mas ainda são pouco conhecidas sob qualquer ponto de vista. Está se consumindo, no Brasil, muito fitoterápicos desenvolvidos na Europa e América do Norte (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância tanto para a obtenção de fármacos como coadjuvantes, ou medicamentos elaborados exclusivamente a base de extratos vegetais, os fitoterápicos (SCHENKEL et. al., 2003).

### **1.1.2 ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA MEDICINAL DE *Pfaffia glomerata* (Pedersen.) Spreng**

A família Amaranthaceae Juss. é predominantemente tropical e subtropical. Segundo as características morfológicas (JUDD et al., 2002) e moleculares (APG II 2003) pertence à ordem Caryophyllales. Judd et al. (2002) incluem na família as espécies anteriormente pertencentes a Chenopodiaceae sendo citados 169 gêneros e 2.360 espécies.

De acordo com Müller e Borsch (2005), as famílias Amaranthaceae e Chenopodiaceae representam um grupo monofilético, com o maior número de espécies dentro da ordem Caryophyllales. Souza e Lorenzi (2005) relataram que as Amaranthaceae apresentam 170 gêneros e 2000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 20 gêneros e, aproximadamente, 100 espécies.

As espécies de *Pfaffia* são encontradas principalmente nas seguintes formações vegetacionais: cerrados, campos rupestres, campos limpos, orla de matas, borda de rios e capoeiras (MARCHIORETTO et al., 2010). Atualmente, o gênero *Pfaffia* compreende algumas espécies conhecidas como ginseng brasileiro devido ao uso popular de suas raízes como tônico, afrodisíaco e estimulante; além do fato de suas raízes serem morfológicamente semelhantes às do ginseng coreano *Panax ginseng* (C. A. Meyer) (MAGALHÃES, 2002).

A propagação de plantas homogêneas de *P. glomerata* via estaquia, em condições de viveiro e hidroponia, embora sendo viável, produz um número de mudas pouco expressivo (NICOLOSO et al., 1999). De fato, várias pesquisas conduzidas com *P. glomerata* têm relatado a viabilidade de produzir plantas

homogêneas e de qualidade através da microrpopagação (NICOLOSO et al., 2001; SKREBSKY et al., 2004).

A partir dos vários estudos sobre as atividades farmacológicas dos compostos presentes nas raízes de *P. glomerata* e de outras espécies do gênero, houve grande interesse comercial. Assim, intensificou-se a exploração predatória das populações naturais da espécie, justificando as pesquisas para viabilizar planos de manejo sustentável nas áreas de ocorrência, projetos visando a produção comercial e o estabelecimento de bancos e coleções de germoplasma, fundamentais para amenizar a pressão ecológica sobre a espécie (MONTANARI JUNIOR et al., 1999).

O princípio ativo da *P. glomerata* é o ácido pfáico (noriterpenoide) e seus constituintes químicos são: saponinas: pfaosídeos A, B, C, D, E e F; alantoína; fitosteróis: sitosterol e estigmasterol; sais naturais: fósforo, cálcio, ferro e potássio; aminoácidos; mucilagens (RATES; GOSMANN, 2002). Além disso, estudos farmacológicos demonstraram que extratos de raízes de *P. glomerata* favoreceram a aprendizagem e a memória (MARQUES et al., 2004), apresentaram efeitos antiinflamatórios, analgésicos (NETO et al., 2005) e antioxidantes (DANIEL et al., 2005).

Esta espécie, conhecida popularmente como ginseng brasileiro, apresenta várias propriedades medicinais, destacando-se os efeitos antidepressivos, tônicos e afrodisíacos, além de ser utilizada para o tratamento de diabetes, reumatismo, esgotamento físico e mental, falta de memória e estresse (MAGALHÃES, 2000; ZIMMER et al., 2006).

O uso de fitoterápicos na cicatrização de feridas cirúrgicas tem sido incrementado nos últimos anos da nossa era com a busca de princípios ativos que desempenhem efetivo papel neste processo acelerando a recuperação tecidual. Não há na literatura muitos artigos que estudam a ação da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen no processo de cicatrização (SILVA et al., 2010).

A *P. glomerata* tem a capacidade de estimular e tonificar o organismo, eliminando a fadiga física e mental, aliviando estados de estresse e depressão, estabilizando o sistema cardiovascular, estimulando o processo circulatório e aumentando o número de glóbulos vermelhos, conseqüentemente aumentando a taxa de hemoglobina. Possui também ação hipoglicêmica, além de potencializar a ação da insulina e do estrogênio (TESKE, 2001).

Neto et al. (2005), estudaram os efeitos do extrato de *Pfaffia glomerata* em diferentes animais e obtiveram efeitos anti-inflamatórios e analgésicos semelhantes aos que eles puderam observar com drogas não esteróides como a indometacina. Declararam também estes autores que isto sugere um mecanismo de ação desta planta associado com a inibição da síntese de prostaglandina, como é observado em muitas drogas AINES (anti-inflamatórios não esteroides).

### **1.1.3 ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS, DE CULTIVO COMERCIAL E IMPORTÂNCIA MEDICINAL DE *Melissa Officinalis* L.**

A erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) é uma planta medicinal também conhecida como melissa, melissa-romana, melissa-verdadeira, salva-do-Brasil, salva-brasileira, bálsamo-de-abelha, bálsamo-doce, bálsamo-de-limão, dentre outros nomes populares. Pertence à família Lamiaceae e possui flores de cor branca ou amarela, podendo se tornar rosadas com o passar do tempo, reunidas em fascículos de duas a seis unidades com florescimento de outubro a março na Europa, não florescendo no Brasil devido às condições climáticas (LORENZI; MATOS, 2002; BLANK et al., 2005). E mais, “em regiões de altitude do Sul, as flores possuem coloração creme. Toda a planta é melífera, exala um odor semelhante ao do limão, que se torna mais intenso depois que a planta seca” (IMIG; ZANCO, 2008; MARTINS et al., 2000).

A grande demanda pela melissa tem exigido desta planta, certas formas de adaptações climáticas; por isso no Brasil, esta planta, em especial, não produz sementes, apesar da boa disponibilidade de luz, mesmo sendo uma planta fotoblástica positiva, é sensível a altas temperaturas (WANDERER et al., 2007), sendo também sensíveis a invernos e geadas (CORREA JÚNIOR et al., 1991).

Ressalta-se que por ser uma planta de clima frio, em função do valor comercial agregado à espécie, as mudas quase sempre são produzidas por sementes importadas. Os plantios são favorecidos no mês de outubro em solos férteis nas quais a germinação varia de sete a 21 dias de acordo com as condições climáticas e disponibilidade de nutrientes. O ciclo após o semeio, varia de 90 dias no verão a 120 dias no inverno. Também pode ser propagada por estacas ou por divisão de rizomas, embora com baixa eficiência no número de mudas, sendo,

nestes casos, melhores propagadas no mês de setembro (FIALHO AFONSO, 1998; LORENZI; MATOS, 2002; COUTO, 2006).

É importante se pensar que o cultivo comercial de melissa é feito agregando replantio à cultura após o primeiro corte, tendo em vista à alta taxa de mortalidade de plantas nas condições climáticas do nordeste brasileiro. Devido a essas variáveis, a produção de matéria-prima fitoterápica exige um acompanhamento biológico e agrônômico constante (BLANK et al., 2005; MAY et al., 2008).

E esse acompanhamento é imprescindível uma vez que o ser humano está diante do uso da melissa, e, sobretudo, análise da cultura para obtenção de biomassa deve ser realizada para evitar o prejuízo consecutivo no teor de fitofármacos (CORREA JÚNIOR et al., 1991; BLANK et al., 2006). Porém, o aumento da biomassa depende da análise econômica, de acordo a demanda etnofarmacológica na qual o material será destinado (CORREA JÚNIOR et al., 1991; MAIA et al., 2008).

Fatos estes que de acordo com Ramalho (1996) os adubos minerais em sua maioria são empregados apenas como fonte de nitrogênio devido à sua importância na produção de biomassa. Além desses, os fertilizantes minerais, tendem a acrescentar cádmio (Cd) ao solo, elemento de alta mobilidade e alto potencial de toxicidade à biota, mesmo em baixas concentrações. Estudos assinalam que o uso dos adubos químicos em um padrão limite não causa prejuízo às plantas, porém, alteram a qualidade química dos compostos secundários (CORREA JÚNIOR et al., 1994; NORONHA, 2000; HOFFMANN et al., 2001; MAIA et al., 2008).

Considerando o cultivo da *Melissa officinalis*, é importante saber que as suas folhas são muito sensíveis à perda de água e este processo é irreversível. Assim, é necessário proporcionar um ambiente de alta umidade durante o primeiro período de adaptação ao local de plantio (BLANK et al., 2005; MAY et al., 2008). Estudo recente, também, afirma que a melissa é sensível a intensidades elevadas de luz e o fóton de luz vermelho interfere negativamente na produção de óleo essencial. Entretanto, forte radiação favorece na produção de matéria seca e conteúdo energético. Obedecer aos critérios de procedimentos para cultivos de plantas medicinais garante a produção de uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos, ausência de patógenos e aumento na produção (BRANT et al., 2009).

As plantas medicinais, como a melissa, têm sua importância definida. Hoje se contempla uma sociedade em que a busca alternativa da cura está em crescimento constante. Acredita-se que durante o crescimento de uma planta como a melissa, seja preciso a observação das condições morfofisiológicas em diferentes intervalos de tempo, acompanhando e avaliando os índices fisiológicos, bioquímicos e a determinação da área foliar diante da sua função de captar energia solar, incidência luminosa e produção de matéria orgânica, através da fotossíntese (MAGALHÃES, 1986).

De acordo com Ming (2001) a inter-relação do homem com as plantas e seu ambiente é de grande utilidade para a medicina moderna ocidental. Esta sabedoria está cada vez mais aprofundada pelo homem e em constante modificação pela cultura moderna (SILVA et al., 2004; SANTOS et al., 2008). No Brasil, em 20 de abril de 2010 foi instituída a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde através da Portaria 886. As Farmácias Vivas, no contexto da Política Nacional de Assistência Farmacêutica, deverá realizar todas as etapas, desde o cultivo, a coleta, o processamento e o armazenamento de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2010). Já Araújo (2006) e Silva et al., (2004) relatam que cerca de 80% de toda população mundial dependem das plantas para as necessidades básicas e um dos motivos é a busca de uma forma de vida mais natural.

Santos (2008) relata que o chá da erva-cidreira relaxa o sistema nervoso, induzindo a pessoa ao sono. Também é usado para epilepsia, perturbações nervosas, insônia, desmaios, histeria, enxaqueca, hipocondria e vertigem. É importante ressaltar que a erva-cidreira possui um efeito tônico sobre o coração e o sistema circulatório, causando uma leve vasodilatação dos vasos periféricos, auxiliando a reduzir a pressão sanguínea.

Já para Lorenzi e Matos (2002) o chá de erva-cidreira, ao mesmo tempo que traz benefícios para o sistema nervoso, também possui propriedades medicinais carminativas que beneficiam o sistema digestivo, combatendo vários distúrbios intestinais, como flatulência (gases intestinais) e cólicas. Ainda nesse sentido, acredita-se que os taninos e outros extratos fitoquímicos da erva-cidreira são recomendados para combater os vírus da caxumba e herpes.

Diante da sua utilidade e perfil, a melissa encontra-se numa posição de destaque no rol das plantas medicinais devido à sua importância fitoterapêutica (SANGUINETTI, 1989). É utilizada popularmente para controlar as emoções (crises

nervosas, taquicardia, melancolia, histerismo e ansiedade). Também é considerada indutora do sono devido ao citral, seu constituinte majoritário que é responsável pela ação relaxante (SADRAEI et al., 2003; BLANK et al., 2005).

Suas folhas e inflorescência frescas são empregadas na forma de chás, que por infusão, tomado pela manhã ou à noite, combate dores de cabeça, problemas digestivos e cólicas intestinais, também são utilizadas as folhas maceradas no combate aos ferimentos (FIALHO; ALFONSO 1998; LORENZI; MATOS, 2002; HABER et al., 2005).

É importante ressaltar que além dessas propriedades, o óleo essencial extraído de matéria fresca ou seca da planta é muito utilizado pelas indústrias farmacêuticas devido à sua atividade antioxidativa, antimicótica, sedativa, antivirótico, principalmente sobre o Vírus Herpes Simplex causador do herpes labial e caxumba, antibiótica, antibacteriana, antifúngica, analgésica, relaxante, expectorante, antialérgica, adstringente, antiséptica, antiinflamatória, antidiarreica, diurética antiespasmótico e até mesmo tônico revigorante da pele (TESKE et al., 1997).

Nesse sentido é importante ressaltar que o óleo é também utilizado na produção de licores e como aromatizante pelas indústrias de produtos de limpeza. Por outro lado, os óleos essenciais da melissa estão presentes nos tricomas secretores das folhas e flores, apresentando os compostos citral  $\alpha$  e  $\beta$  como majoritários. Em qualquer horário, a planta produz óleos contendo outros compostos em menor quantidade como o citronelal, metilcitronelal, citronelol, pineno, limoneno e linalol. Também possui taninos, succínico, ácidos triterpenóides: (ursólico e oleânico), sesquiterpenos: (cariofileno), ácido caféico, ácidos rosmarínico, ácido clorogênico, flavonóides e substâncias amargas bem como glicosídeos flavônicos, mucilagens, alcalóides e resinas (LORENZI et al., 2002).

Afirma Correa Júnior (1994) que:

Diante da contínua inflação dos medicamentos sintéticos e seus efeitos colaterais, as plantas medicinais estão sendo cada vez mais procuradas. A demanda por produtos mais saudáveis tem proporcionado à ascensão das plantas dentro da área agrônômica. Por esse motivo, trabalhos com plantas medicinais enfocam a questão do cultivo e a produção de mudas. Sendo estas coletadas na mata ou em ambiente nas quais foram introduzidas e

selecionadas pela eficiência terapêutica e pela adaptabilidade do cultivo nas diferentes regiões.

#### **1.1.4 A MICROPROPAGAÇÃO E SUA IMPORTÂNCIA PARA PLANTAS MEDICINAIS**

A cultura de células e tecidos vegetais vem, desde o início da década de 70, constituindo uma estratégia de interesse, em função de suas potencialidades e de resultados apresentados para um grande número de espécies vegetais. Tal abordagem tem permitido a clonagem e a multiplicação em larga escala de espécies vegetais, os quais, quando multiplicados por processos convencionais (estaquia, enxertia, sementes, alporquia, etc.), apresentam baixos valores de rendimento. Nos últimos anos, a superação dessa dificuldade tem sido conseguida, em diversos casos, com a utilização de técnicas de produção de mudas *in vitro* (NOLETO; SILVEIRA, 2004).

Conforme Barrueto (1999) a micropropagação é uma técnica para multiplicar e cultivar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro (por isso, o termo *in vitro*), sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

Dentre as aplicações da cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a técnica de maior impacto e de resultados mais concretos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007).

Essa técnica exige condições assépticas de manuseio, que muitas vezes são alcançadas com o uso de substâncias germicidas aplicadas nas plantas doadoras de explantes ou nos próprios explantes. Ainda, a escolha de uma planta matriz de boa qualidade sanitária pode reduzir a contaminação (SHARP et al., 1979). Quando se utiliza material vegetativo diretamente do campo, os tratamentos desinfetantes são mais criteriosos, em virtude de os explantes apresentarem maiores níveis de contaminação, e geralmente as concentrações e tempos de exposições aos agentes desinfetantes são maiores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Várias são as modalidades de padrão morfogenético *in vitro*, podendo ser por via direta, com desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante ou

indireta, como a cultura de calos. Estes calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem direcioná-los para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese (CALDAS, 1996).

Na propagação *in vitro*, os reguladores de crescimento têm importância fundamental, visto que a resposta das plantas à morfogênese é dependente da interação auxinas / citocininas e do tipo de tecido utilizado (PIERIK, 1997). As citocininas, especialmente o BAP (benzilaminopurina), têm se mostrado fundamentais para indução de brotações adventícias, aumentando significativamente o número de mudas obtidas *in vitro*. Entretanto, tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existentes, como os segmentos nodais e apicais, uma vez que, não sendo necessária a desdiferenciação celular, há uma menor probabilidade de regeneração de plantas com variação somaclonal (DEBERGH; READ, 1991).

Em geral, sob condições ideais, esses explantes regeneram plantas por longos períodos de tempo; porém, em algumas espécies, há uma redução na organogênese ao longo dos subcultivos (HUSSEY, 1986; MANTELL et al., 1994). Além disso, a determinação da duração da cultura e do intervalo entre os subcultivos são aspectos essenciais para evitar a regeneração de plantas com alterações genéticas e/ou epigenéticas (KLERK, 1990). Conforme Grattapaglia e Machado (1998), o ideal é que um novo subcultivo seja realizado antes do início da fase de senescência. Em função disso, 30 dias foi determinado como sendo o tempo médio ideal de intervalo entre os subcultivos.

Os brotos desenvolvidos em um meio são transferidos a outro meio para formação de raízes, obtendo-se, assim, plantas inteiras. A adição de sacarose ao meio de cultura pode atuar como substrato para o processo de respiração celular, fornecendo energia para o processo de rizogênese, condição essa de vital importância (PIO et al., 2002).

Na maioria das vezes, os explantes não iniciam o processo de enraizamento em meios com concentrações altas de sais, apesar das auxinas presentes. Altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente o crescimento de raízes. Concentrações de sais no meio diminuídas para 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitam melhor enraizamento (HU; WANG, 1983).



Segundo Fráguas (2003), uma etapa importante da micropropagação que inspira cuidado é a aclimatação, devido à dificuldade de transferir com sucesso plantas da condição *in vitro* para a casa de vegetação e posteriormente para o campo. A aclimatação é constituída de duas etapas: enraizamento (*in vitro* e *ex vitro*) e transferência para condições não estéreis com temperatura e umidade controladas (DUNSTAN; TURNER, 1984).

Na fase de aclimatação, as plantas obtidas no cultivo *in vitro*, aqui denominadas de microplantas, são expostas à redução de umidade do ar e temperatura instável, a fim de que possam suportar a transferência para novo substrato e, posteriormente, sobreviverem e se desenvolverem sem complicações em condições naturais de campo (SILVA et al., 1995). A passagem das plantas do ambiente *in vitro*, que apresenta alta umidade relativa do ar, completa assepsia, iluminação, temperatura e fotoperíodo controlados, para o *ex vitro* deve ser gradual (BRITO, 2007).

A micropropagação de plantas medicinais tem se difundido devido à possibilidade de produzir um grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade sanitária, à possibilidade de conservar o germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade, além de auxiliar no melhoramento genético. Dentre os fatores biológicos que afetam a propagação clonal *in vitro*, destacam-se o genótipo, o tipo de explante e as condições fisiológicas e sanitárias dos mesmos, a manutenção da totipotência e a estabilidade genética (HUSSEY, 1986).

A micropropagação de plantas tem sido uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido. Em que pese o fato desta técnica ter como desvantagem o custo elevado, a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, por meio do melhoramento genético, justificam a sua utilização (LIMA et al., 2007).

No nordeste, a crescente utilização de plantas medicinais, pelas propriedades terapêuticas, justifica a necessidade de medidas que minimizem o impacto de sua exploração nas reservas naturais. Portanto, a micropropagação parece ser uma alternativa viável, pois permite a obtenção de um grande número de plantas com autenticidade varietal em qualquer época do ano (NICOLOSO et al., 2001).

Arikat et al. (2004, p. 30), diz que:

[...] o cultivo de plantas medicinais com a finalidade de extração de componentes ativos podem enfrentar certas limitações tais como clima, sazonalidade, disponibilidade de água, doenças e pragas. Tais limitações conduziram à utilização de técnicas de cultura de tecidos para a produção de todos os componentes ativos. A cultura de tecidos fornece meios de propagação rápida de um grande número de plantas uniformes, mantendo o seu genótipo. Utilizações benéficas de cultura de tecidos para o propósito de extração de metabólitos secundários incluem preservar a coleção de espécies selvagens ameaçadas de extinção, devido ao rápido crescimento de culturas *in vitro*.

No caso específico de *P. glomerata* e *M. officinalis*, alguns estudos sobre cultivo *in vitro* já têm sido realizados. Em *P. glomerata* bons resultados, com relação à indução de brotos, foram obtidos utilizando-se concentrações diferentes de BAP (NICOLOSO et al., 2001). As auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações axilares, podem incrementar o crescimento das brotações (GRIMALDI et al., 2008). Nicoloso et al. (2001), trabalhando com *P. glomerata*, sugerem que em virtude da alta taxa de crescimento das brotações *in vitro*, o uso de variações crescentes dos macronutrientes do meio MS, pode ser uma alternativa viável para o cultivo *in vitro* desta espécie. Contrariando esta sugestão, Maldaner et al. (2006), ao reduzirem a concentração de N para 50% daquele padrão do meio MS, associada a um incremento na dose de sacarose até 45g L<sup>-1</sup>, constataram o favorecimento no crescimento em altura, número de segmentos nodais e brotações, bem como na produção de biomassa de *P. glomerata* cultivada *in vitro*.

Skrebsky et al. (2006), estudando *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro*, concluíram que a sacarose nas doses de 45 a 60g L<sup>-1</sup> promove maior índice de aclimatização das plantas. Além disso, constataram que o substrato Plantmax<sup>®</sup> usado isoladamente proporcionou o maior índice de sobrevivência das plantas cultivadas a campo.

Com relação à *M. officinalis*, são raros os trabalhos envolvendo cultivo *in vitro*. O principal fator apontando como limitante tem sido o elevado índice de contaminação dos explantes, por fungos e bactérias. Neste sentido, salienta-se que estudos de superação dos índices de contaminação em *M. officinalis* se fazem necessários, para o estabelecimento *in vitro* (MORAES et al., 2007). Costa et al. (2007), relatam que o período de coleta do explante tem sido um dos principais fatores limitantes para o sucesso no estabelecimento *in vitro*, sendo que a época

chuvosa proporciona elevada incidência de microorganismos. Portanto, estudos que visem superar as limitações para o estabelecimento *in vitro* dessa cultura, serão de grande importância agrônômica e farmacológica.

## **CAPÍTULO I**

### **Micropropagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Ginseng-brasileiro)<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Trabalho encaminhado para publicação na Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.

## MICROPROPAGAÇÃO DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

Autor: Marcelo da Silva Passos

Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida

**RESUMO:** A *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen é uma erva com origem nas regiões de clima tropical e subtropical do Brasil e sua ocorrência pode ser vista em todo o país e é uma planta medicinal bastante utilizada em chás e infusões. As técnicas de cultura *in vitro* permitem propagar rapidamente espécies de plantas medicinais, além de possibilitar a limpeza de patógenos e a produção de plantas com qualidade genética e sanitária comprovada. Neste sentido, a utilização de citocininas, com destaque para o BAP, tem demonstrado resultados excelentes na regeneração *in vitro* de plantas, a partir de gemas axilares. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação de *P. glomerata*, utilizando diferentes concentrações de BAP. Segmentos nodais retirados de plantas cultivadas em campo foram devidamente desinfestados e em seguida introduzidos em meio de cultura de estabelecimento (MS suplementado com BAP - 0,0; 1,0 mg L<sup>-1</sup>). Após 60 dias as plantas obtidas foram seccionadas em cinco partes de 1,0 cm (explantes), contendo um segmento nodal, e introduzidas em meio de cultura de multiplicação *in vitro*. Nesta fase foram montados dois experimentos (1 e 2), com 5 tratamentos (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 ou 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) e com 7 repetições (cada uma contendo 5 explantes). Os experimentos 1 e 2 foram montados com as plantas oriundas das concentrações 0,0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP da fase de estabelecimento, respectivamente. Foram avaliados o número médio de brotos por explante, altura da parte aérea dos brotos e o número médio de folhas. Os brotos obtidos foram transferidos para meio MS e M/2 e, após 30 dias, analisado o percentual de enraizamento, número de raízes e comprimento da raiz principal. Posteriormente, as microplantas foram transferidas para aclimação, utilizando-se garrafas do tipo PET, contendo terra vegetal autoclavada, por 30 dias. Os resultados demonstraram que as maiores taxas para o número médio de brotos foram obtidas na concentração de 3,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP com 5,0 e 7,7 brotos/explante, nos respectivos experimentos; na análise para o número de folhas, o melhor resultado foi obtido com 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP, em ambos os experimentos, e o comprimento da parte aérea foi maior na ausência de BAP nos experimentos avaliados. Os dois meios de enraizamento, MS e MS/2, obtiveram 100% de brotos enraizados, embora o segundo tenha apresentado melhores resultados para número de raízes e comprimento da raiz principal. A aclimação resultou em sobrevivência de 87,5% de plantas. Os resultados permitiram concluir, nas condições deste trabalho, que o protocolo de micropropagação, utilizando 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na fase de estabelecimento, combinado com 3,0 mg L<sup>-1</sup> na fase de multiplicação, foi altamente proveitoso e possibilita obter 57.000 plantas ao final de seis meses. A utilização das garrafas PET como recipiente para aclimação, mostrou-se eficiente e viável.

**Palavras-Chave:** plantas medicinais, cultivo *in vitro*, ginseng brasileiro, sustentabilidade.

**ABSTRACT:** The *Pfafia glomerata* (Spreng.) Pederson is a herb originated in the tropical and sub-tropical climate regions of Brazil, and this occurrence can be seen across the country, also it is widely used in teas and infusions. The *in vitro* culture techniques is allowed to quickly propagate species of medicinal plants, in addition it is possible to clean of pathogens and the production of plants with genetic and proven sanitary quality. In this sense, the use of cytokines, especially the BAP, has shown excellent results *in vitro* regeneration of plants from axillary buds. The objective of this study was to establish a micropropagation protocol of *P. glomerata*, using different concentrations of BAP. Nodal segments was taken from plants grown in the field and were properly disinfected and then introduced in the midst of establishing culture (MS supplemented with BAP – 0.0, 1.0 mg L<sup>-1</sup>). After 60 days the plants obtained were cut into five pieces of 1.0 cm each (explants) containing a nodal segment and introduced in the middle of *in vitro* multiplication culture. At this stage were mounted two experiments (1 and 2) with 5 treatments (0.0; 1.0; 2.0; 3.0 or 4.0 mg L<sup>-1</sup> BAP) with 7 repetitions (each one containing 5 explants). The experiments 1 and 2 were assembled with the plants from the contracentrations 0.0 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP establishment phase, respectively. Were analyzed the average number of shoots per explant, shoot height of seedlings and the number of leaves were evaluated. The shoots obtained were transferred to MS medium and M/2 and, after 30 days were analyzed the percentage of rooting, the root number and length of the main root. Subsequently, the microplants were transferred to acclimatization, using the type of plastic bottles (PET), containing topsoil autoclaved for 30 days. The results showed that the highest rates for the average number of shoots were obtained at a concentration of 3.0 mg L<sup>-1</sup> BAP and 7.7 to 5.0 shoots / explant in their respectively experiments; in the analysis for the number of leaves, the best result was obtained with 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP, in both experiments, and the shoot length was greater in the absence of BAP in the evaluated experiments. The two means of rooting, MS and MS/2, obtained 100% of rooted shoots, although the second has shown better results for the number of roots and length of the main root. The acclimation resulted in survival of 87.5% of plants. The results showed, in the conditions of this study, the micropropagation protocol, using 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP in the establishment phase, combined with 3.0 mg L<sup>-1</sup> in the multiplication phase, was highly reproductive, enabling 57,000 plants obtained after six months. The use of plastic bottles (PET) as a container for acclimatization proved efficient and feasible.

**Keywords:** medicinal plants, *in vitro* cultivation, brazilian ginseng, sustainability.

## INTRODUÇÃO

*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, conhecida como ginseng brasileiro, é uma das espécies da família Amaranthaceae de grande interesse comercial na forma de fitomedicamentos e suplementos alimentares. A intensa exploração predatória das reservas naturais justifica a elaboração de planos de manejo ou projetos de cultivo para *P. glomerata* (Montanari Júnior, 1999).

Em virtude das propriedades medicinais, tem havido intensa exploração das reservas naturais de *P. glomerata*, pondo em risco a variabilidade genética das populações naturais, uma vez que existem poucas áreas de cultivo comercial. Conforme Figueiredo et al. (2004), *P. glomerata* é uma espécie de grande importância medicinal e comercial, cujas raízes são utilizadas como matéria prima para a produção de fitoterápicos e suplementos alimentares (Figueiredo et al., 2004; Zimmer et al., 2006).

Para o gênero *Pfaffia* não existe uma revisão taxonômica atualizada, nem tampouco foram levantados os aspectos fitogeográficos, importantes para o melhor conhecimento da distribuição das espécies no Brasil. Alguns trabalhos com o gênero foram realizados por Stützer (1935), Siqueira & Grandi (1986), Vasconcellos (1986), Borsch & Pedersen (1997), Pedersen (1997 e 2000), entre outros e são atualmente referências fundamentais, porém, apresentam limitações em alguns aspectos, tais como informações sobre distribuição geográfica, morfologia e posição taxonômica das espécies, além de considerações filogenéticas.

O gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) engloba cerca de 90 espécies naturais da América Central e América do Sul, incluindo vários estados do Brasil. Várias espécies desse gênero são conhecidas como ginseng brasileiro, pois as raízes têm sido utilizadas como adaptógenas e afrodisíacas, bem como para o tratamento de diabetes, reumatismo, esgotamento físico e mental, falta de memória e estresse (Rates & Gosmann, 2002).

Em plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos, permitindo a conservação do germoplasma; a obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células; na engenharia genética e na otimização da produção de metabólitos (Pletsh, 1998; Botta et al., 2001; Rao & Ravishankar, 2002; Arikat et al., 2004).

Desde algum tempo, as técnicas de cultivo *in vitro* para conservação em banco de germoplasma vem sendo amplamente desenvolvidas e aplicadas em mais de mil espécies, muitas das quais são de regiões tropicais (Lata, 1991). Para as espécies ameaçadas de extinção e cuja conservação por sementes não é possível, este é um método considerado altamente promissor (Hoyt, 1992).

Tendo em vista a conservação do germoplasma existente bem como o fornecimento de matéria-prima homogênea e de qualidade para a indústria de fitoterápicos, torna-se fundamental o desenvolvimento de técnicas de propagação dessas espécies. Neste sentido, clones e acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen vêm sendo propagados através de estacas, entretanto este tipo de propagação produz um baixo número de mudas (Nicoloso et al., 1999).

O crescimento das culturas de células e tecidos vegetais *in vitro* depende em parte da otimização da concentração de três grupos de componentes do meio de cultura, a saber: os fitoreguladores, as substâncias orgânicas e os nutrientes minerais. Para Morard & Henry (1998) e Morard et al. (1999), em alguns casos, a alteração da composição mineral parece ser a que mais traz benefícios.

A indução da rota embriogenética ou organogenética é influenciada e determinada pelo tipo de explante, genótipo, fitoreguladores, meio de cultura e condições de cultivo (Hou & Jia, 2004). A análise criteriosa da literatura científica revela que o estudo da morfogênese *in vitro* é fundamental para caracterizar a rota do processo da micropropagação (Almeida, 2002).

Em *P. glomerata*, Nicoloso et al. (2001) observaram que a concentração padrão dos macronutrientes do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e a ausência de carvão ativado favoreceram ao crescimento das brotações *in vitro*. Entretanto, não promoveu aumento significativo no número de brotos por explantes, embora estes autores relatam a possibilidade de obter 15.000 plantas *in vitro*, partindo de um único segmento nodal. De forma semelhante, Russovski & Nicolosso (2003), variando as concentrações dos sais do MS, também não obtiveram resultados favoráveis para o número de brotos por explantes, em *P. glomerata*. Na micropropagação de *P. glomerata*, Flores et al. (2006) obtiveram bons resultados no crescimento das brotações, enraizamento e aclimatação, quando utilizaram o meio MS na ausência de reguladores vegetais, com formação de plântulas em 90 dias. Contudo, o número médio de brotações também foi relativamente baixo (1,7 brotos/explantes). Ressalte-se que, em muitas culturas, o crescimento e a proliferação de brotos *in vitro* a partir



de gemas axilares é maximizado pela incorporação de citocininas ao meio nutritivo (George, 1996).

A conservação *in vitro* surge como uma alternativa de conservação de germoplasma, que deve ser considerada pelas vantagens que apresenta, como por exemplo, a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que existem no campo. Esta estratégia, quando bem conduzida, reduz os custos e garante a fidelidade genética dos acessos conservados, facilitando a disponibilidade dos mesmos para o melhoramento genético e o próprio intercâmbio de germoplasma (Almeida et al., 2009).

Para o sucesso de métodos de micropropagação é necessária a seleção dos explantes adequados, estabelecendo-se condições de desinfestação e cultura; o estabelecimento das condições físicas e fisiológicas de desenvolvimento dos explantes e o enraizamento das partes aéreas formadas após subcultivos sucessivos (Grattapaglia & Machado, 1998). Além disso, um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa de vegetação ou campo (Hararika, 2003).

A maioria das espécies cultivadas *in vitro* requer um processo de aclimatização, o qual consiste de modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas necessárias às plantas para que possam sobreviver e crescer vigorosamente em um novo ambiente (Grattapaglia & Machado, 1998; Carvalho et al., 1999; Hararika, 2003).

Com isso objetivou-se no presente trabalho estabelecer um protocolo de micropropagação para *P. glomerata*, buscando induzir a máxima proliferação de brotos e assegurar o seu crescimento e enraizamento. Além disso, utilizou-se garrafas de refrigerante do tipo PET (politereftalato de etileno – um polímero sintético termoplástico), visando garantir uma boa taxa de sobrevivência das plantas, durante o processo de aclimatação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da FAMAM – Faculdade Maria Milza, em parceria com a UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

**Estabelecimento *in vitro*:** Foram utilizadas como fonte de explantes, plantas cultivadas em campo na cidade de Cruz das Almas (12° 40' 12" S - 39° 06' 07" W), localizada na Região do Recôncavo baiano. Os explantes consistiram de segmentos nodais, que foram lavados em água corrente e desinfestados em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 2 minutos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOH) com 2% de cloro ativo, diluída em água destilada, na proporção 3 : 1, durante 15 minutos. Após o que foram lavados por 3 vezes com água esterilizada, em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, foram introduzidos em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com Ágar (0,7%), pH entre 5,7 e 5,8, fungicida (Carbomax<sup>®</sup>) na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, acrescentado de BAP (6-Benzilaminopurina), nas concentrações 0,0 ou 1,0 mg L<sup>-1</sup> e autoclavado a 120° C por 20 minutos.

As placas foram mantidas, durante 30 dias, em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 25° ± 2°C e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após este período, as brotações foram transferidas para frascos contendo 20 mL do mesmo meio de cultura anteriormente citado, contendo as mesmas concentrações de BAP e mantidos nas mesmas condições de sala de crescimento, por mais 30 dias.

**Multiplificação *in vitro*:** Plantas assépticas, advindas da cultura de segmentos nodais, obtidas na fase anterior, com 60 dias de idade e possuindo cinco segmentos nodais, foram utilizadas como fonte de explantes. Segmentos nodais de 1,0 cm de comprimento contendo duas gemas e duas folhas no nó, consistiram de explantes (excluindo-se segmentos apicais).

Nessa fase foram realizados dois experimentos visando induzir a máxima proliferação de brotos. Os experimentos foram montados com as plantas obtidas a partir do meio de cultura da fase de estabelecimento na ausência de BAP (experimento 1) e daquele com 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP (experimento 2), com a finalidade de avaliar o efeito residual do BAP da fase de estabelecimento *in vitro*. Em ambos

os experimentos, os explantes foram introduzidos em frascos contendo 20 mL do meio de cultura MS, adicionados com 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 ou 4,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP e mantidos sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25° ± 2° C e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, durante 30 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) e sete repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo cinco explantes. Ao final dos 30 dias, foram avaliados os seguintes parâmetros: a) número de brotos/explante; b) número de folhas/broto e c) altura da parte aérea de brotos. Na análise estatística foi feita análise de regressão.

**Enraizamento *in vitro*:** Brotações oriundas do tratamento que proporcionou o maior número de brotos foram individualizadas e utilizadas no experimento de enraizamento. As brotações foram introduzidas em frascos contendo 20 mL do meio de cultura contendo 100% dos sais do MS (MS) e em meio de cultura contendo 50% dos sais do MS (MS/2), visando induzir o enraizamento dos brotos. Os frascos foram mantidos, durante 30 dias, em sala de crescimento nas mesmas condições de fotoperíodo, temperatura e luminosidade, anteriormente citadas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos (meios de cultura MS e MS/2) e vinte repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco com uma brotação. Ao final dos 30 dias foram avaliados o número médio de raízes, com análise de teste de média (mensurado pela contagem das raízes individualmente, desconsiderando-se aquelas menores que 1 mm) e o comprimento médio da maior raiz.

**Aclimação:** As microplantas (brotos enraizados) foram retiradas dos frascos e lavadas com água corrente com o objetivo de remover o excesso do meio de cultura. Estas foram acondicionadas em garrafas plásticas transparentes de refrigerante, do tipo PET, de 600 mL, com quatro pequenos furos na base para drenagem do excesso de água. As garrafas foram cortadas na metade de sua altura para facilitar a adição do substrato (terra vegetal autoclavada) e transplante da muda, após o que foram novamente fechadas por sobreposição das metades. No primeiro dia, no período matutino, retirou-se a cápsula (tampinha) da garrafa por 10 minutos, no segundo dia por 20 minutos e foi-se aumentando o tempo gradativamente até a retirada permanente da tampinha, quando as mudas já estavam adaptadas ao meio ambiente. Após trinta dias as mudas encontravam-se

totalmente aclimatadas. Durante o período de aclimação, as microplantas foram irrigadas com auxílio de um borrifador, de forma a manter a umidade relativa do ar elevada. Esta exposição progressiva das microplantas às condições ambientais teve o objetivo de reduzir o estresse. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada ao final da aclimação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram na Figura 1 (A e D), que a concentração de 3,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP foi aquela que proporcionou o maior número de brotos, nos experimentos 1 e 2 realizados na fase de multiplicação *in vitro*, com 5,0 e 7,7 brotos, respectivamente

Em relação ao número de brotos/explante, tanto no experimento 1 (oriundo de plantas na ausência de BAP (Figura 2a) da fase de estabelecimento), quanto no experimento 2 (oriundo de plantas com adição de 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP (Figura 2b), da fase de estabelecimento) observou-se efeito significativo do BAP. A Figura 2d evidencia a presença de múltiplas brotações que foram oriundas dos explantes (segmentos nodais), observados na Figura 2c. No experimento 1, na concentração de 4,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP também se obteve 5,0 brotos/explante. Neste experimento, a equação de regressão estima que a concentração de 3,5 mgL<sup>-1</sup> seria aquela que induziria o máximo número de brotos. Já no experimento 2, estimada pela equação de regressão, concentração próxima de 3,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP proporciona o máximo número de brotos. É provável que o BAP utilizado na fase de estabelecimento (1,0 mgL<sup>-1</sup>) tenha exercido um efeito residual, influenciando na obtenção de maior número de brotos, na fase de multiplicação *in vitro*.

Constatou-se também que houve uma tendência de decréscimo, em ambos os experimentos, no número de brotos para concentrações superiores a 3,0 mgL<sup>-1</sup>, conforme Figura 1 (A e D). Alguns autores, estudando plantas medicinais, corroboram com o resultado deste trabalho, relatando efeito fitotóxico do BAP, onde elevadas concentrações reduzem a formação de brotos adventícios: Rathore et al. (1992), em *Maytenus emarginata*; Pereira et al. (1993), em *Maytenus ilicifolia*; Diniz et al. (2006), em *Mikania glomerata* Spreng; Vicente et al. (2009), em *Vernonia condensata*; Rodrigues et al. (2010), em *Alternanthera brasiliana*; dentre outros.

Nicoloso et al. (1999) e Nicoloso et al. (2001), trabalhando com micropropagação de *P. glomerata*, relatam o desenvolvimento de um protocolo altamente reprodutível, admitindo a possibilidade de se obter 15.000 plantas a partir de um único segmento nodal, em período de seis meses. Entretanto, estes autores não avaliaram o efeito de reguladores vegetais na proliferação de brotos, embora este número de plantas seja extremamente expressivo, quando comparado com os métodos convencionais de multiplicação desta espécie (por semente ou estaquia). A

produção de segmentos nodais é um parâmetro importante na propagação *in vitro* de *P. glomerata*, pois reflete a produção de novas plantas a cada subcultivo e, de acordo com Zaerr & Mapes (1985), o BAP é a citocinina mais eficaz para a multiplicação de partes aéreas da maioria das espécies.

No trabalho aqui realizado com a utilização de BAP, na concentração de 3,0 mgL<sup>-1</sup>, na fase de multiplicação *in vitro* e com explantes (segmentos nodais) oriundos de plantas estabelecidas com 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP, é possível estimar a obtenção de aproximadamente 57.000 plantas a partir de um único segmento nodal, levando-se em consideração a realização de três subcultivos na fase de multiplicação *in vitro* e que cada placa de Petri com 5 explantes tenha uma produtividade média de 7,7 brotações por explantes, no período de seis meses (Figura 4). Portanto, trata-se de um protocolo muito eficiente na produção de mudas micropropagadas de *P. glomerata*. Não obstante, será necessário avaliar o índice de variação somaclonal, visando assegurar a fidelidade genética da espécie.

A análise do número de folhas/brotações demonstrou também efeito significativo para as concentrações de BAP, em ambos os experimentos. A concentração de 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP foi aquela que assegurou o maior número de folhas/brotações, nos dois experimentos, com 22,0 e 15,4 folhas/brotos, respectivamente (Figura 1B e E). Constatou-se em ambos os experimentos, conforme as equações de regressões, que a partir da concentração em torno de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu uma diminuição no número de folhas por brotos.

Além disso, verificou-se que no experimento 1 houve, de modo geral, maior número de folhas por brotos. Isto pode corroborar com o efeito residual do BAP utilizado na fase de estabelecimento, em virtude do experimento 2 (na presença de BAP) ter apresentado maior número de brotos/explantes e conseqüentemente reduzindo o número de folhas. Villa et al. (2005), trabalhando com amoreira-preta, observaram que o aumento da concentração de BAP, promoveu decréscimo na quantidade de folhas formadas. Isso pode ser atribuído ao fato deste regulador de crescimento estimular a formação de maior número de brotos, porém, de tamanho reduzido, apresentando menor número de folhas. Já Blank et al. (2008), micropropagando a espécie alecrim-pimenta *Lippia sidoides* (Cham.), demonstraram que a concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentou maior número de folhas/explante. Contrastando com estas respostas, Nascimento et al. (2008), trabalhando com a espécie lenhosa de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess), não

observaram diferenças significativas no número de gemas, comprimento de brotações e número de folhas, sendo que a concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP apresentou os maiores valores: 7,0 gemas por explante, 1,14 cm de comprimento para a maior brotação e 13,7 folhas por explante. Esses resultados corroboram que a resposta morfogenética *in vitro* é genótipo/dependente.

Com relação à altura (comprimento da parte aérea) das brotações, houve efeito significativo entre as concentrações de BAP. Constatou-se que o BAP influenciou de forma negativa, onde os meios de cultura com ausência do regulador vegetal apresentaram as melhores médias para este parâmetro, conforme Figura 1 (C e F), com 6,6 cm e 4,8 cm de altura, nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Este resultado evidenciou que o BAP induziu maior proliferação de brotos/explante, mas reduziu o crescimento vegetal. É possível que esta redução não seja um efeito inibidor do BAP, como afirmam outros autores, mas deva-se, provavelmente, à maior competição entre as múltiplas brotações, pelos nutrientes do meio de cultura. Grattapaglia & Machado (1998), por exemplo, afirmam que as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações até uma determinada concentração, a partir da qual ocorre diminuição da altura em virtude de um possível efeito fitotóxico da citocinina. Trabalho realizado por Vicente et al. (2009), estudando a multiplicação *in vitro* da planta medicinal *Vernonia condensata* L. Becker, não apresentou diferenças significativas para a altura de brotos, nas diferentes concentrações de BAP avaliadas, o que também não reforça a afirmação dos autores anteriores.

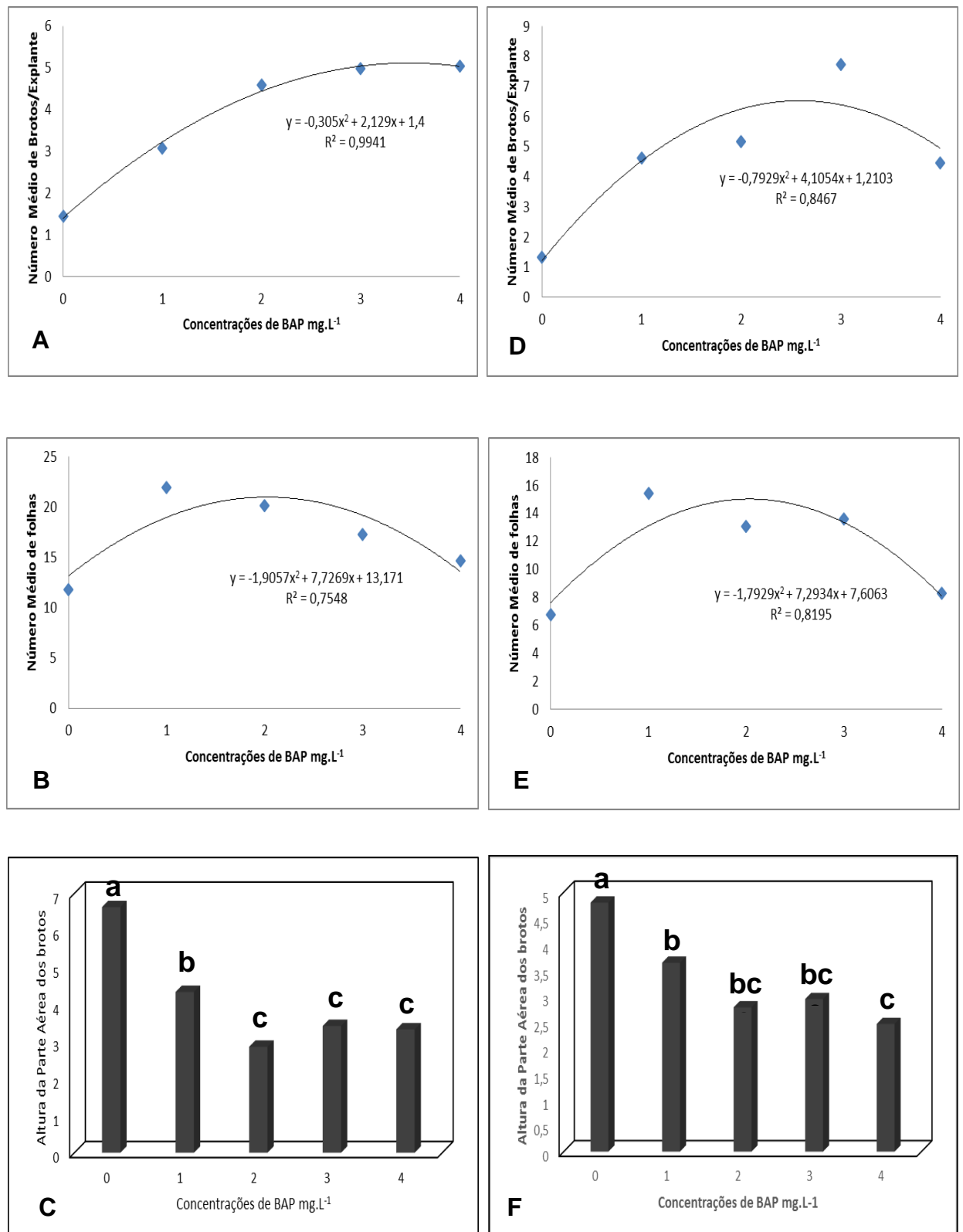
O enraizamento *in vitro* em função dos meios de cultura utilizados nesta fase, mostrou diferença significativa apenas para o número de raízes (Figura 3A), o que não foi constatado no comprimento da maior raiz (Figura 3B). Entretanto, houve formação de raízes em 100% dos brotos avaliados (Figura 2e). O meio de cultura com metade dos sais do MS (1/2 MS) apresentou um maior número de raízes por brotos, diferindo significativamente daquele meio com 100% dos sais do MS (MS). Já para o comprimento da raiz principal, apesar da maior média ocorrer no meio de cultura 1/2 MS, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Trabalhos realizados com cultivo *in vitro* de *P. glomerata* já haviam demonstrado que esta espécie não necessita do adicionamento de reguladores vegetais, especialmente auxina, para promover o enraizamento dos brotos (Nicoloso et al., 1999 & Nicoloso et al., 2001). Tem sido usual, em trabalhos de cultura de tecidos, a utilização de

diferentes concentrações de sais, em meios de cultura, para favorecer o enraizamento dos brotos. Neste sentido, Centellas et al. (1999), trabalhando com macieiras em um experimento de enraizamento *in vitro*, também encontraram diferença significativa nos meios MS e MS/2, sendo que, de maneira geral, o meio MS/2 favoreceu melhor enraizamento que o MS.

Os meios das formulações básicas diluídas para 50%, têm possibilitado melhor enraizamento em diversas culturas (Skriskandarajah & Mullins, 1981; Zimmerman & Broome, 1981; Zimmerman & Fordham, 1985; Damiano et al., 1991). Esse percentual de enraizamento em meio MS/2 pode ser justificado, provavelmente, pelo acúmulo da síntese de auxinas endógenas em virtude da baixa disponibilidade de sais no meio de cultura, aumentando a atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente, a formação de raízes (Wareing & Phillips, 1981).

Na fase de aclimação observou-se que houve sobrevivência de 87,5% das microplantas. De um total de 24 plantas submetidas a aclimação, apenas 3 não sobreviveram após 30 dias do processo (Figura 2f). Esta taxa mostra-se satisfatória, especialmente devido à utilização de garrafas de refrigerante do tipo PET, como recipientes para as plantas. Esse processo de aclimação, com utilização de garrafas PET, acaba sendo mais econômico e de excelente contribuição para a sustentabilidade ambiental. O primeiro relato da utilização de garrafas PET, como recipiente para aclimação de plantas *in vitro*, foi citado por Vicente et al., (2009), que obtiveram 100% na aclimação de plantas *in vitro* de *Vernonia consensata* L. Becker. Araújo et al. (2002) relataram que mudas de *Aloe vera* enraizadas *in vitro* apresentam 80 a 95% de sobrevivência na aclimatização, mas não utilizaram garrafas PET. Estes autores também relataram que naqueles brotos desprovidos de sistema radicular a taxa de sobrevivência cai para 30%. Portanto, a formação de um sistema radicular bem desenvolvido é fundamental para o sucesso na aclimação das plantas *in vitro*. Além disso, as características físicas, químicas e biológicas do substrato utilizado também pode influenciar no crescimento das mudas e na taxa de sobrevivência (Gonçalves, 1995).

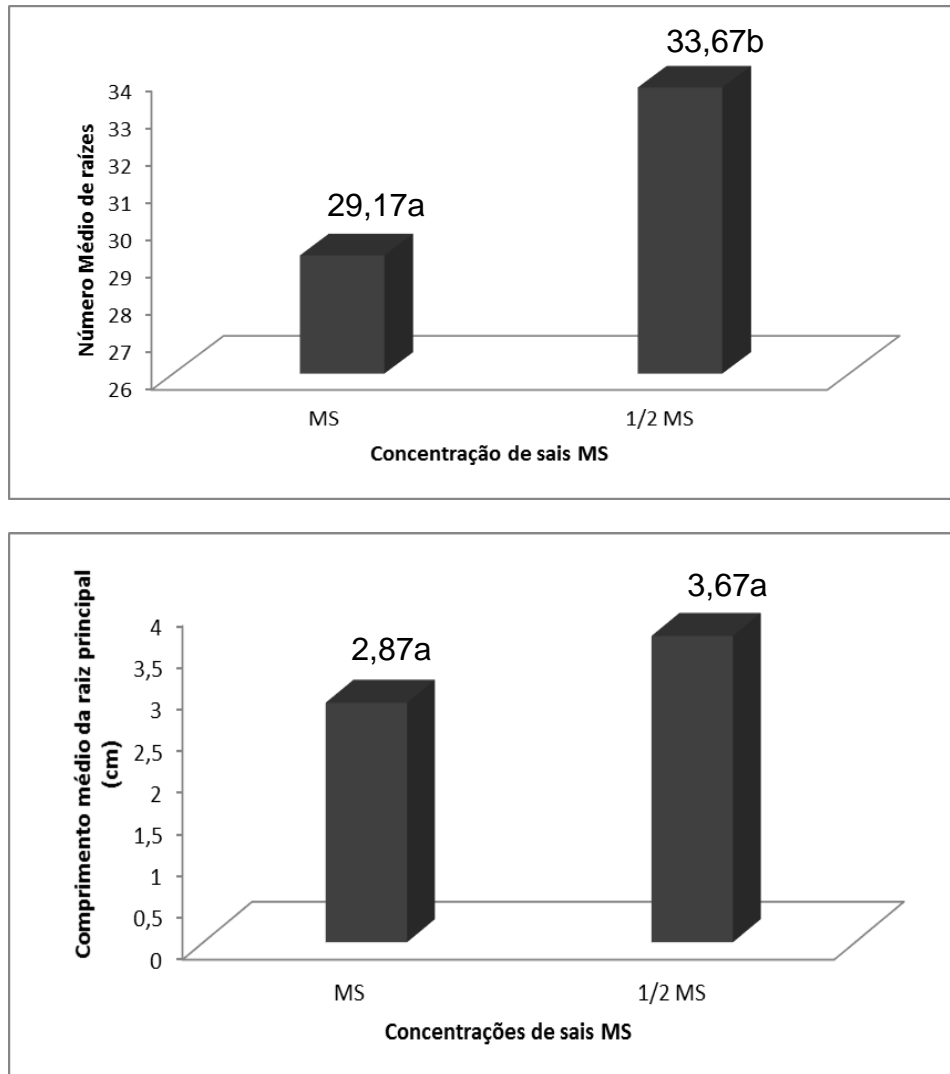




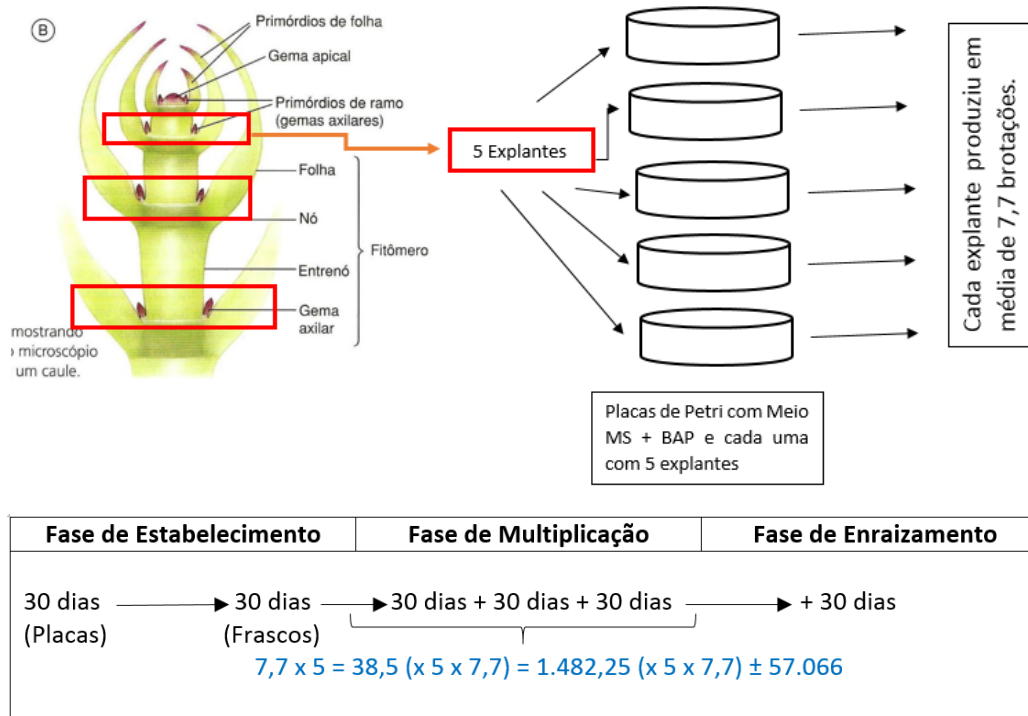
**Figura 1.** Número de brotos, de folhas e altura de brotos em função de concentrações de BAP. **A, B e C)** Resultados referentes ao experimento oriundo do estabelecimento dos explantes com 0,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP (experimento 1); **D, E, e F)** Resultados referentes ao experimento oriundo do estabelecimento dos explantes com 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP (experimento 2). Gráfico de barras seguidas com a mesma letra não diferem significativamente (Tukey 0,01).



**Figura 2.** Micropropagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **a e b)** Plantas estabelecidas *in vitro*, em meio de cultura MS com 0,0 e 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente; **c)** segmentos nodais, contendo folhas, oriundos de plantas estabelecidas *in vitro* e introduzidos em meio de multiplicação, adicionado de BAP; **d)** múltiplas brotações obtidas no experimento 2, na concentração de 3,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP, realizado na fase de multiplicação *in vitro*; **e)** brotações enraizadas em meio de enraizamento MS/2 e **f)** plantas na fase de aclimação, acondicionadas em garrafas de refrigerante do tipo PET e contendo terra vegetal.



**Figura 3.** Número de raízes e comprimento da raiz principal em função da concentração de sais no meio de cultura. A) número de raízes e B) Comprimento da raiz principal. MS (meio de cultura com 100% dos sais do MS), 1/2 MS (meio de cultura com 50% dos sais do MS). Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente (Tukey 0,01).



**Figura 4.** Representação da multiplicação *in vitro*. Quantidade de plantas obtidas após 6 meses de micropropagação durante as fases de estabelecimento, multiplicação e enraizamento.

## CONCLUSÃO

- A concentração de 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na fase de multiplicação, utilizando explantes oriundos das plantas estabelecidas em meio de cultura MS com 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP, foi aquela que proporcionou a máxima proliferação de brotos.
- O número de folhas e a altura não influenciaram no enraizamento das brotações, nas condições avaliadas neste trabalho.
- Nas condições avaliadas neste trabalho, o meio de cultura 1/2 MS mostrou-se mais eficiente para induzir o número de raízes além de influenciar no comprimento da raiz principal.
- A aclimação de plantas *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, utilizando garrafas de refrigerante do tipo PET, constitui-se em um processo possível e viável nas condições avaliadas.

## CAPÍTULO II

**Indução de brotações a partir de segmentos nodais de plantas cultivadas *in vitro* de *Melissa officinalis* L.<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Trabalho encaminhado para publicação na Revista Textura.

## INDUÇÃO DE BROTAÇÕES APARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO* DE *Melissa officinalis* L.

Autor: Marcelo da Silva Passos

Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida

**RESUMO:** *Melissa officinalis* L. (melissa) apresenta elevados níveis de compostos fenólicos com reconhecida ação biológica, sendo utilizada na prevenção de várias doenças, como asma brônquica, úlcera, inflamações, viroses e arteriosclerose. A síntese de compostos com atividade biológica depende da qualidade da planta, sua origem geográfica, condições climáticas, período de colheita e métodos de estocagem. O processo de multiplicação *in vitro* normalmente utiliza reguladores de crescimento como auxinas e citocininas. O efeito das citocininas é principalmente induzir a divisão celular e a diferenciação de gemas adventícias, sendo o BAP (6-Belzilaminopurina) a mais eficiente entre elas. Neste sentido, objetivou-se avaliar o potencial de indução de gemas adventícias, através de organogênese, na multiplicação *in vitro* de *M. officinalis*, sob diferentes concentrações de BAP. Foram utilizados segmentos nodais (explantes), que após desinfestados em solução de álcool etílico na concentração de 70%, durante 1 minuto, e em soluções de hipoclorito de sódio (NaOH), diluída em água destilada na proporção 3:1 e 4:1, durante 15 minutos, foram estabelecidos em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido do fungicida (Carbomax®) na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>. As placas foram mantidas, durante 30 dias, em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25° ± 2°C e intensidade luminosa de 40 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Após esse período foram transferidos para frascos com 20 mL do mesmo meio de cultura e nas mesmas condições de sala de crescimento, durante mais 30 dias, para assegurar o desenvolvimento das plantas. Destas, foram utilizados segmentos nodais (explantes) para experimento de multiplicação *in vitro*. Os segmentos foram introduzidos em placas de Petri contendo meio de cultura MS adicionado com 1,0 ou 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, onde permaneceram nas mesmas condições de sala de crescimento, por 30 dias. Após este período, as brotações foram transferidas para frascos contendo 20 mL do meio de cultura MS com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, visando promover o alongamento das brotações. Os resultados permitiram concluir que a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP promoveu a melhor resposta no número de brotos, com média de 4,0 brotos/explante. As brotações foram obtidas através da organogênese indireta e a utilização do GA<sub>3</sub> não induziu alongamento caulinar satisfatório.

**Palavras-Chave:** cultivo *in vitro*, organogênese indireta, plantas medicinais, sustentabilidade ambiental.

**ABSTRACT:** *Melissa officinalis* L. (melissa) has high levels of phenolic compounds with known biological activity, and it is used for the prevention of various diseases such as bronchial asthma, ulcer, inflammation, viral disease and arteriosclerosis. The synthesis of compounds with biological activity depends on the quality of the plant, its geographical origin, climatic conditions, harvest and storage methods. The process of multiplication *in vitro* is normally used to growth regulators such as auxin and cytokines. The effect of cytokines is primarily to induce the cell division and the differentiation of adventitious buds, which the BAP (6-Benzilaminopurina) is the most efficient between them. In this sense, the objective was to evaluate the potential of induction of adventitious buds through organogenesis *in vitro* multiplication of *M. officinalis* under different concentrations of BAP. Nodal segments were used (explants) that, after surface sterilized in alcohol solution at a concentration of 70% for 1 minute, and sodium hypochlorite solution (NaOH), diluted in distilled water in the ratio 3 : 1 and 4 : 1 for 15 minutes, were established in Petri dishes (100 x 15 mm) containing 20 mL of MS culture medium (Murashige, Skoog, 1962) supplemented fungicide (Carbomax®) at a concentration of 1.0 mg L<sup>-1</sup>. The plates were maintained for 30 days in a growth chamber under 16 hour photoperiod, with a temperature 25 ± 2°C and light intensity of 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. After this period were transferred to flasks with 20 mL of the same medium and under the same conditions in a growth chamber for another 30 days to ensure the development of the plants. Of these nodal segments were used (explants) for *in vitro* multiplication experiment. The segments were introduced into Petri dishes containing MS medium culture added with 1.0 or 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP, where they remained under the same conditions of growth chamber for 30 days. After this period, the shoots were transferred to vials containing 20 mL of MS medium with 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, to promote the elongation of shoots. The results showed that the concentration of 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP was promoted the best answer in the number of shoots with an average of 4.0 shoots / explant. The shoots were obtained through indirect organogenesis and the use of GA<sub>3</sub> didn't induce satisfactory shoot elongation.

**Keywords:** *in vitro* cultivation, indirect organogenesis, medicinal plants, environmental sustainability.



## INTRODUÇÃO

Caracterizando-se por ser uma planta herbácea perene, ramificada desde a base e ereta, a *Melissa officinalis* (L.) pode atingir de 30-60 cm de altura. É uma planta nativa da Europa que é atualmente cultivada em vários países. As folhas são membranáceas e rugosas com aproximadamente 4 cm de comprimento, e suas flores apresentam coloração levemente esbranquiçada, sendo que a sua multiplicação é realizada por sementes ou por estaquia (LORENZI; MATOS 2002).

*Melissa officinalis* é pertencente à família Lamiaceae; apresenta agradável aroma de limão, é de uso bastante frequente na medicina popular, além de ser utilizada na culinária e na ornamentação. Suas folhas, normalmente glabras e verde-brilhantes são utilizadas sob a forma de chá, indicado como digestivo, calmante, e também no combate a dores de cabeça, enxaquecas, gases e cólicas intestinais, infecções virais (gripe, herpes, caxumba, varicela), além de facilitar a menstruação e estimular a produção da bile. Para uso externo, é aplicada como pasta ou creme como repelente de insetos (RIGUEIRO, 1992).

Seus principais constituintes de interesse medicinal e condimentar, como citral, citronelal e geraniol, entre outros, encontram-se em seu óleo essencial obtido principalmente das folhas, as quais proporcionam rendimentos de 0,02 a 0,37%. Outros constituintes na planta são os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido rosmarínico, e os flavonóides e os taninos (SORENSEN 2000; WHO, 2002; MORADKHANI et al., 2010).

Segundo Gbolade (1992), a maior parte dos óleos essenciais está localizada no terço superior da planta (0,39%). Seus principais componentes são citral (neral + geranial) que representa 48% do óleo essencial, seguido por citronelal com 39,47% e  $\beta$ -caryophyllene com 2,37% Tavares et al.(1996). Os óleos essenciais de erva-cidreira são usados como agente anti-tumoral sendo um remédio potencial na prevenção do câncer. Os óleos voláteis de erva-cidreira podem também ser usados como um agente anti-viral e contém substâncias que combatem o vírus tipo 2 do herpes (HSV-2) (TURHAN, 2006).

O cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos voláteis têm grande importância econômica devido seu crescente uso nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Avalia-se que há mais de 500 mil hectares com cultivos

de plantas de espécies da família Lamiaceae objetivando a extração de seus óleos essenciais (SIMÕES; SPITZER, 2005).

No Brasil, a melissa não produz sementes, portanto, as mudas são produzidas por estacas ou por sementes importadas. No processo por estacas, no entanto, o enraizamento é baixo, sendo recomendada a importação de sementes. As sementes disponíveis no mercado, no Rio Grande do Sul, são provenientes da França e da Holanda, as quais foram submetidas a teste de germinação e aumentam o custo do plantio comercial (WANDERER et al., 2007).

Neste sentido, Gomes (1983); Barretet al. (2000); Assis (1992), explicam que a propagação assexuada consiste na reprodução de indivíduos a partir de porções vegetativas das plantas e é possível porque muitos destes órgãos vegetativos têm a capacidade de regeneração. Pode-se obter plantas novas partindo de uma só célula, mas lamentavelmente estes indivíduos são geneticamente idênticos e portanto igualmente susceptíveis a intempéries.

Devido à importância desta planta para múltiplos propósitos e às limitações apresentadas nos métodos convencionais de produção de mudas (GBOLADE, 1989), justifica-se, então, a aplicação de metodologias que forneçam grande número de plantas de *Melissa officinalis* L. clonadas, visando selecionar linhagens de alta qualidade para plantio extensivo e extração de fitofármacos.

A micropropagação caracteriza-se por ser uma técnica que não necessita de muita tecnologia e pertence a uma categoria de técnicas de baixo custo (PUCHOOA 2004). Através desta técnica, obtém-se um grande número de clones de plantas com alta qualidade, podendo-se propagar, rapidamente e em larga escala, novos genótipos a partir de uma pequena amostra de germoplasma (ALTMAM 1999).

Na cultura de tecidos, a composição e concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no padrão de desenvolvimento, sendo as auxinas e as citocininas as classes de fitorreguladores mais utilizadas neste sistema de cultivo (CHEEMA, 1983). As citocininas são substâncias que apresentam a função de induzir a expansão celular por meio da multiplicação de células vegetais. Dentre estas, as mais conhecidas são a 6-Benzilaminopurina (BAP) e a Cinetina (KIN). O BAP é forte indutor de brotação, enquanto a KIN geralmente possibilita apenas o crescimento celular sem brotação (FREITAS, 2009; ASMAR, 2011).

Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que o tipo e a concentração de citocinina no meio de cultura são os fatores que mais influem no sucesso da multiplicação *in vitro*, e o excesso pode ser tóxico e comprometer o desenvolvimento das culturas.

Os tecidos vegetais podem ser induzidos a formar novos órgão como brotos, raízes ou embriões necessitando ou não de meristemas pré-existentes. Estes órgãos recém-formados são chamados adventícios. Em teoria, os meristemas adventícios podem ocorrer através de dois caminhos: I) diretamente via células diferenciadas, sem proliferação de tecido indiferenciado; ou II) indiretamente através de células desdiferenciadas e não-especializadas de tecidos de calos ou suspensões celulares. Estes métodos de regeneração são denominados de organogênese direta e indireta, respectivamente (GAHAN; GEORGE, 2008).

Seguindo a linha de Grattapaglia e Machado (1988), a organogênese direta refere-se ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos (câmbio vascular, base do pecíolo em eudicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas, segmentos de raízes, entre outros) que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que em geral não se expressam. É muito comum em cultura de tecidos utilizando BAP.

No processo de estabelecimento da cultura de células em suspensão de *M. officinalis*, a escolha do explante adequado e meios de culturas, que são selecionados, para indução de calos a partir desses explantes é de fundamental importância. A organogênese indireta ocorre a partir da formação de gemas adventícias em tecidos que não as apresentam em condições normais (MEFTAHIZADE et al.). Para tanto, o explante utilizado deve ser submetido à desdiferenciação celular, formando uma estrutura denominada calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MORAIS, 2012).

Qualquer tecido de origem vegetal pode ser utilizado como explante para a formação de calos, entretanto, aqueles que apresentam maiores quantidades de células meristemáticas, menores quantidades de lignina e apresentam-se em estágios juvenis de desenvolvimento, são os mais indicados para este procedimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de indução de gemas adventícias, através de organogênese, na multiplicação *in vitro* de *Melissa officinalis* L. (Erva-Cidreira), sob diferentes concentrações de BAP.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da FAMAM – Faculdade Maria Milza, em parceria com a UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

**Estabelecimento *in vitro*:** foram utilizadas, como fonte de explantes, plantas cultivadas em campo na cidade de Cruz das Almas (12° 40' 12"S - 39° 06' 07" W), localizada na Região do Recôncavo baiano. Os explantes consistiram de segmentos nodais, que foram lavados em água corrente e desinfestados em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio (NaOH), diluída em água destilada na proporção 3 : 1 e 4 : 1, durante 15 minutos. Após o que foram lavados por 3 vezes com água esterilizada, em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, foram introduzidos em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG,1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com Ágar (0,7%), pH entre 5,7 e 5,8, fungicida (Carbomax<sup>®</sup>) na concentração de 1mg L<sup>-1</sup> e autoclavado a 120° C por 20 minutos.

As placas foram mantidas, durante 30 dias, em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 25° ± 2°C e intensidade luminosa de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após este período, as brotações foram transferidas para frascos contendo 20 mL do mesmo meio de cultura anteriormente citado e mantidos nas mesmas condições de sala de crescimento, por mais 30 dias.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos e oito repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri com 04 explantes. Após 08 dias de cultivo foi avaliada a taxa de sobrevivência dos explantes.

**Multiplicação (indução de brotações) e alongamento *in vitro*:** Plantas assépticas, advindas da cultura de segmentos nodais, obtidas na fase anterior, com 60 dias de idade, foram utilizadas como fonte de explantes. Segmentos nodais foram seccionados (explantes) e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura MS adicionado com 1,0 ou 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e permaneceram nas mesmas condições de sala de crescimento por mais 30 dias para induzir a formação de brotos onde continuaram em sala de crescimento nas mesmas condições anteriores. Após este período, as brotações desenvolvidas foram transferidas para frascos

contendo 20 mL do meio de cultura MS adicionado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, visando promover o alongamento das brotações durante

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos (1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa contendo três explantes. Ao final dos 30 dias, foi avaliado o número de brotos/explante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o melhor índice de desinfestação foi obtido na proporção 4 : 1 (Hipoclorito de sódio : água), utilizando-se produto comercial a 2% de NaOH, com 45,0% de desinfestação. Entretanto, este tratamento não foi diferente significativamente daquele que constou da proporção 3 : 1 (Hipoclorito de sódio : água), que obteve 37,5% de taxa de descontaminação (Tabela 1), apresentando pouca relevância na variação dos tratamentos. Um dos maiores fatores limitantes, que tem sido citado, no cultivo *in vitro* de *M. officinalis* é a contaminação dos explantes. Este fato corrobora com o baixo índice, de explantes sobreviventes, obtido neste trabalho, sendo que parte daqueles que sobreviveram não responderam morfogeneticamente, contaminaram após a realização da avaliação (Figura 1a, b e c).

Sabe-se que a contaminação é muito dependente do material vegetal utilizado para isolamento *in vitro*. Neste trabalho, o material vegetal utilizado foi retirado de plantas do campo contendo elevada concentração de microrganismos. Ressalte-se que uma maior destreza no isolamento dos explantes e a adoção de uma assepsia superficial mais efetiva, com emprego de uma maior concentração do agente esterilizante, maior período de tratamento ou utilização de outro(s) composto(s) desinfestante(s) podem reduzir para níveis mais baixos as perdas aqui ocorridas (TAVARES et al., 1992).

Segundo Pereira et al. (2003), mesmo que se utilizem antibióticos de amplo espectro e fungicidas no meio de cultura, o controle da desinfestação na cultura de tecidos de algumas espécies tem sido problemático. De acordo com estes autores, na maioria dos trabalhos, a frequência de descontaminação não é total, pois os tecidos vegetais podem interferir no controle, por meio da destoxificação destas substâncias ou servindo como habitat para os contaminantes que se translocam por seus tecidos. Este parece ser um dos fatores que explica a elevada contaminação

em *M. officinalis* L., pois além da utilização do hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes, também foi acrescentado ao meio de cultura o fungicida Carbomax®. Mesmo assim, constatou-se contaminação endógena após 30 dias de cultivo, conforme observa-se na Figura 1c.

**Tabela 1.** Desinfestação de explantes de *Melissa officinalis* L. em função da imersão, sob agitação, em solução de hipoclorito de sódio (2%) e água, durante 15 minutos.

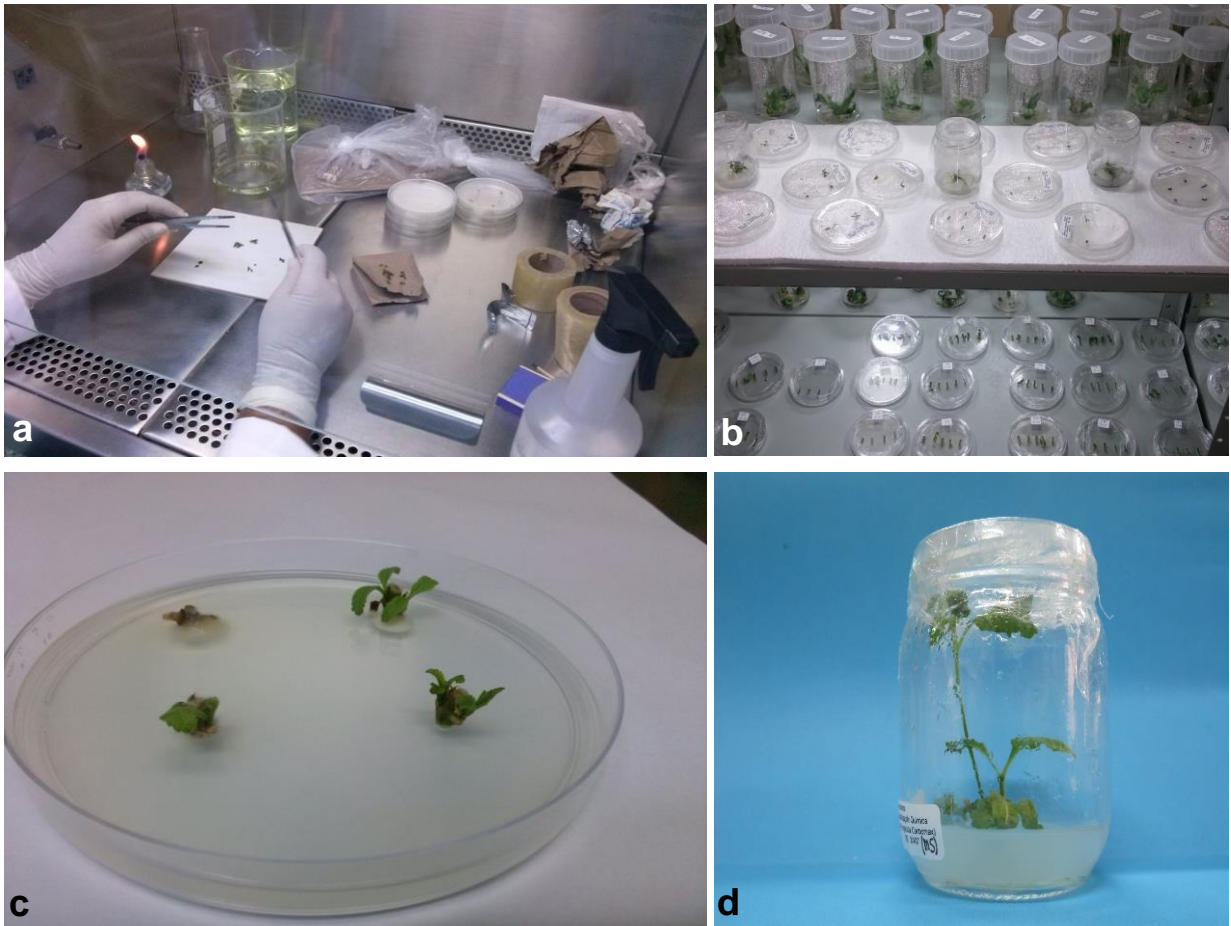
Solução de hipoclorito de sódio e água (Proporção)	Taxa de desinfestação (%)
3 : 1	37,5a
4 : 1	45,0a

Os resultados da multiplicação *in vitro* demonstraram que a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi aquela que apresentou o melhor resultado para o número de brotos/explante (4,0 brotos/explante), sendo diferente significativamente daquela com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (2,9 brotos/explante), conforme Figura 2. Em virtude do elevado índice de contaminação, ocorrido neste trabalho, então não foi possível testar maior variação nas concentrações de BAP. As plantas *in vitro*, sobreviventes na fase de estabelecimento (Figura 1d), não foram suficientes para fornecer explantes (segmentos nodais), para testar outras concentrações de BAP. Entretanto, verificou-se que houve decréscimo no número de brotos, quando se utilizou a concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, em relação à concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Nesta última, houve formação de gemas adventícias por organogênese indireta (Figura 3a, b e c) e boa formação de brotos (Figura 3d). Isto sugere que se deve testar, em *M. officinalis* L., concentrações de BAP em intervalos menores, entre 0,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Algumas espécies medicinais e outras culturas têm apresentado bons resultados, para o número de brotos, em concentrações em torno de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Pasqual e Ando (1989), em *Poncirus trifoliata*; Debiase et al. (2004), em *Zingiber officinale*; Cantagalo et al., (2005), em citrumelo 'swingle'; Vicente et al.,

(2009), em *Vernonia condensata*; (dentre outras), o que reforça a necessidade de novos testes. Vale salientar que existe uma concentração máxima para que se tenha uma resposta satisfatória no número e desenvolvimento de brotos, acima da qual há um efeito inibitório, provavelmente devido à fitotoxidez causada pelo regulador de crescimento (GUEVARA, 1987).

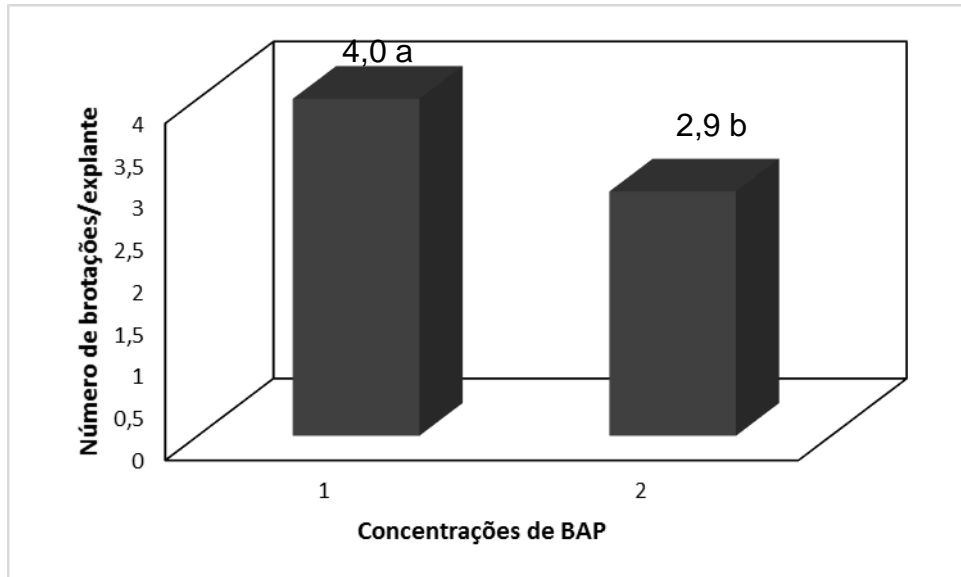
Durante a realização deste trabalho, na fase de multiplicação *in vitro*, se constatou que as brotações obtidas apresentaram dificuldades de alongamento (Figura 3e). Em virtude disto, foi acrescentado  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  visando contribuir com o alongamento dos brotos. Entretanto, não se verificou efeito positivo do  $\text{GA}_3$ , na concentração utilizada, onde poucas brotações tiveram relativo alongamento (Figura 3f). O efeito mais conhecido das giberelinas *in vitro* tem sido no alongamento de partes aéreas das brotações (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Algumas plantas medicinais têm apresentado a necessidade de utilizar regulador vegetal para promover alongamento. Neste sentido, Vicente et al., (2009) e Brito (2007) obtiveram bons resultados em *Vernonia condensata* e *Aloe vera*, respectivamente, utilizando  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ . Portanto, percebe-se a necessidade de futuros trabalhos com *M. officinalis*, onde se deve variar as concentrações de  $\text{GA}_3$ , isoladas e/ou combinadas com outros reguladores vegetais, visando promover, de forma eficiente, o alongamento das brotações obtidas durante a fase de multiplicação *in vitro*.

**Figura 1.** Estabelecimento *in vitro* de *Melissa officinalis* L. (Erva-doce). **a)** Extração dos explantes (segmentos nodais) em câmara de fluxo laminar; **b)** Explantes introduzidos em placas de Petri com 20 mL de meios de cultura MS, acondicionados em sala de crescimento, e avaliado o índice de sobrevivência após oito dias de cultivo; **c)** brotações aos 30 dias de cultivo, evidenciando algumas que mesmo respondendo morfogenticamente, apresentaram contaminação tardia; **d)** brotações transferidas para frascos e com 60 dias de cultivo *in vitro*.

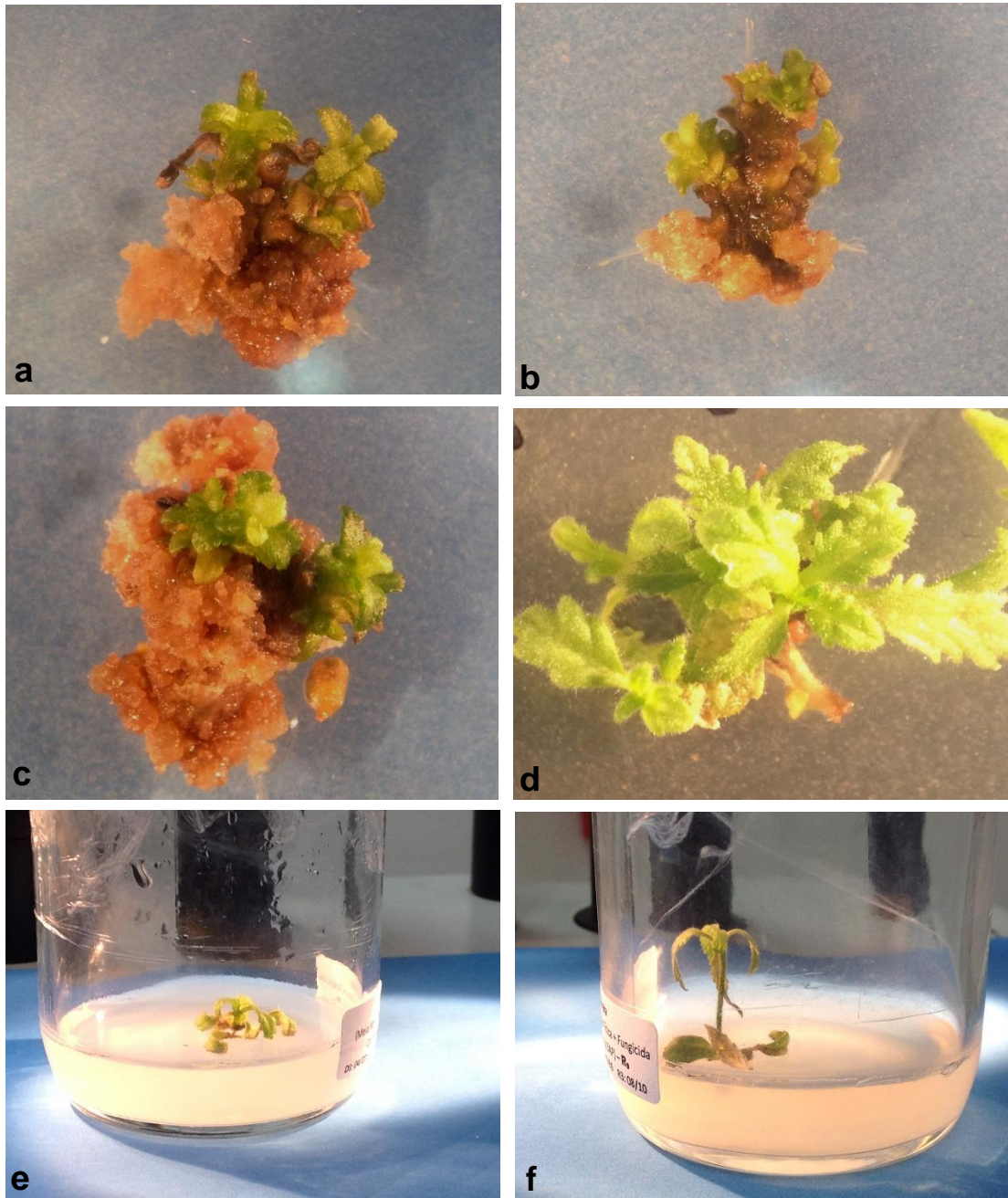




**Figura 2.** Número de brotos em função de concentrações de BAP, utilizadas na fase de multiplicação *in vitro* de *Melissa Officinalis* L. Barras seguidas da mesma letra não diferem



**Figura 3.** Fase de multiplicação (indução de brotações) e alongamento *in vitro* de *Melissa officinalis* L. (Erva-cidreira). **a, b e c)** gemas adventícias induzidas por organogênese indireta aos 15 dias de cultivo em meio de cultura MS contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; **d)** brotações aos 30 dias do cultivo em meio MS contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; **e)** brotação transferida para frascos contendo meio de cultura MS adicionado de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ ; **f)** brotação após 30 dias de cultivo em meio de cultura MS adicionado de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ .



## CONCLUSÕES

- A utilização de solução de hipoclorito de sódio (2%), na proporção de 4:1, permitiu estabelecer explantes de *Melissa officinalis* L., nas condições avaliadas neste trabalho.
- A concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP induziu a máxima proliferação de brotos, na fase de multiplicação *in vitro*.
- A rota morfogênica da formação das brotações ocorreu por organogênese indireta.
- A utilização de GA<sub>3</sub>, na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, não foi eficiente em promover o alongamento das brotações.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No mundo inteiro houve um aumento na demanda por fitoterápicos para utilização na crescente indústria de medicamentos alternativos. Com a necessidade em se adotar práticas saudáveis para melhorar a qualidade de vida, existe uma crescente busca por esses medicamentos, mais baratos que possam garantir uma atenção primária básica a inúmeras comunidades carentes.

Na medicina tradicional muitos vegetais e seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos e vêm, há muito, sendo utilizados pela população brasileira nos seus cuidados com a saúde nos programas públicos de fitoterapia no SUS, alguns com mais de 20 anos de uso.

Neste sentido uma prática que assegure uma rápida proliferação, e em larga escala, desses vegetais irá fomentar a sua utilização nos programas de saúde do governo, além de proteger e preservar essas espécies do risco de serem extintas pelo extrativismo humano.

O ginseng brasileiro [(*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen)] e a erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), representam duas dessas espécies que são amplamente utilizadas nos tratamentos alternativos para as populações menos favorecidas, que apresentam efeitos terapêuticos comprovados pela ciência. Para que a multiplicação *in vitro* destas espécies fosse possível, tornou-se necessário a utilização de segmentos nodais, introduzidas em meio MS com a adição da citocinina BAP, promovendo um grande número de brotações em *Pfaffia* e induzindo a formação de calos em *Melissa* que posteriormente possibilitou a formação de brotações via embriogênese indireta.

As técnicas de multiplicação e conservação *in vitro* constituem-se em alternativa adequada e viável para a aquisição de mudas de alta qualidade fitossanitária produzidas em curto espaço de tempo. Hoje, as técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, representam a melhor alternativa para garantir o sucesso desses programas.

A utilização de garrafas tipo PET garante a sustentabilidade do projeto por ser um material encontrado com bastante frequência em todos os lugares. O consumo de refrigerantes, maior gerador desse material, tem a maior importância no aumento da disseminação do material.

Por não apresentar custo na aquisição desse material, seu uso na forma de reutilização para agricultura possibilita principalmente para o agricultor familiar um aumento na produção, com a possibilidade de ajudar o meio ambiente. O mesmo material pode ser utilizado várias vezes pela sua resistência e durabilidade. E mostrou-se adequado no plantio de ervas medicinais.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, W. A. B. de **Caracterização Anatômica da Organogênese *in vitro* e Transformação Genética via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus spp.*** 2002. 157f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba. 2002.

ALMEIDA, W. A. B. de et al. Conservação de fruteiras potenciais para o nordeste brasileiro. In: CARVALHO, C. A. L. de; DANTAS, A. C. V. L.; PEREIRA, F. A. de C.; SOARES, A. C. F.; MELO FILHO, J. F. de; OLIVEIRA, G. J. C. de (Org.). **Tópicos em ciências agrárias**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 296 p. il. p. 3-13.2009.

ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. **Electronic Journal of Biotechnology** 2 (2): 51-55. 1999.

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. de A.; CABRAL, I. E.; ALMEIDA FILHO A. J. de. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira: In: **Revista Latino-Americana de Enfermagem 2006 maio-junho**. Disponível em:<  
[http://www.scielo.br/pdf/rlae/v14n3/pt\\_v14n3a03.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rlae/v14n3/pt_v14n3a03.pdf) >Acesso em 17 jan. 2015.

AMARAL L. F. A.; BRITO da SILVA A. Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais; **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p.56; Ed. n. 30, janeiro/junho de 2003, Brasília - DF.

ARAÚJO, P. S. et al. Micropropagação de babosa *Aloe vera* L. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.54-7, 2002.

ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO V. S. PLANTAS MEDICINAIS: CULTURA POPULAR VERSUS CIÊNCIA. In: **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI ISSN 1809-1636; Vol.7, N.12: p.51-60, Maio/2011**. Disponível em:<  
[http://www.reitoria.uri.br/~vivencias/Numero\\_012/artigos/artigos\\_vivencias\\_12/n12\\_05.pdf](http://www.reitoria.uri.br/~vivencias/Numero_012/artigos/artigos_vivencias_12/n12_05.pdf) >Acesso em: 17 Jan 2015.

APG II. **The Angiosperm Phylogeny Group 2003. An update of Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II**. Botanical Journal of the Linnean Society 141: 399-436.

ARAÚJO, C. C. A. **PSF e Homeopatia – Um paralelo de Luta e Identificação** – Pós Graduação em Saúde da Família, Faculdade Redentor, CESAHO – Centro de Estudos Avançados em Homeopatia, 2006.

ARIKAT, N. A.; JAWAD, F. M.; KARAM, N. S.; SHIBLI. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, n. 1/4, p. 193-202, Mar. 2004.

ARIKAT, N. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v.100, p.93-202, 2004.

ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, especial, p. 533-538, 2011.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por Microestaquia. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA, 11, REUNIÃO DE SILVICULTURA CLONAL, 1, 1996, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, 1996 (b). p. 1 – 9.

BARATA, L. E. S.; QUEIROZ, S. R. R. **Contribuição efetiva ou potencial do PADCT para o aproveitamento econômico sustentável da biodiversidade.** Campinas: [s.n.], 1995.

BARRETT, S. C. H.; JESSON, L. K.; BAKER, A. M. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. **Annals of Botany**, 85 (supplement A): 253-265.

BARRUETO CID, L. P.; MACHADO, A. C. G.; CARVALHEIRA, S. B. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v.56:17-23,1999.

BASTOS L. P.; MOREIRA M. J. S.; COSTA M. A. P. C.; ROCHA M. C.; HANSEN D. S.; SILVA S. A.; DANTAS A. C. V. L.; SOUSA C. S. 2007 Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.1122-1124.

BLANK, A. F. et al. *In vitro* establishment of pepperrosmarin nodal segments. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.255-8, 2008.

BLANK, A. F.; FONTES, S. M.; OLIVEIRA, A. S. O.; MENDONÇA, M. C.; SILVA-MANN, R.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Produção de mudas, altura e intervalo de corte em melissa, **Horticultura Brasileira**, v.23, n.3, p.780-784, 2005.

BLANK, A. F.; OLIVEIRA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; FAQUIN, V. Efeitos da adubação química e da calagem na nutrição de melissa e hortelã-pimenta, **Horticultura Brasileira** v.24, p. 195-198, 2006.

BORSCH, T. & PEDERSEN, T. M. **Restoring the Generic Rank of *Hebanthe Martius* (Amaranthaceae)**. *Sendtnera* n. 4: p. 13-31. 1997.

BOTTA, B. et al. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p.354-79, 2001.

BRANT, R. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSA, L. F.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; FERRI, P. H.; CORREA, R. M. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras, **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1401-1407, 2009.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n.º 338, de 06 de maio de 2004. Aprova a Política Nacional de Assistência Farmacêutica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 maio 2004. Seção 1, p. 52.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 886, 20 de maio de 2010**. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília 2010.

BRITO, C. F. de; **Micropropagação de Babosa (*Aloe vera* L.)**. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas. 2007. p-46.

CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47. 1996, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo, RJ, Sociedade Brasileira de Botânica, 1996. p.22.

CANTAGALLO, F. de S; AZEVEDO, F. A; SCHINOR, E. H; MOURÃO FILHO, F. de A. A; MENDES, B, M, J. Micropropagação de citrumelo 'swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 136-138, Abril 2005.



CARLINI, E. Entre conhecimento popular e científico. In: **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.3, p.64-69, 2007. Disponível em: <[http://www.sbpmed.org.br/download/issn\\_07\\_3/artigo9\\_v9\\_n3.pdf](http://www.sbpmed.org.br/download/issn_07_3/artigo9_v9_n3.pdf)> Acesso em: 21 jan. 2015.

CARVALHO, G. R. et al. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas “*in vitro*”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.483-490, 1999.

CENTELLAS A. Q. et al. Efeito de Auxinas Sintéticas no Enraizamento *in vitro* da Macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181-186, fev. 1999.

CHEEMA, G. S.; SHARMA, D. P. *In vitro* propagation of apple rootstocks - EMLA, **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 131, p. 75- 88, 1983.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D. A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Development Biology**, v.35, p.288-93, 1983.

COIMBRA, R. **Manual de Fototerapia**, 2ª edição. Editora Cejup, Belém. 1994.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C., **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**, Curitiba, EMATER-PR, 1991, 151p.

\_\_\_\_\_. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 162 p.

\_\_\_\_\_. **Cultivo de Plantas Medicinais, condimentares e aromáticas**. EMATER, Curitiba, 2001, 230 p.

COSTA, A. S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 068-072, 2007.

COUTO, M. E. O. **Coleção de plantas medicinais aromáticas e Condimentares**, Embrapa, Pelotas, RS, Documento 157, (on line), 2006, 91p.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia**. 2004. Disponível em:  
<<http://antoniopcunha.com.sapo.pt/ahspmscaf.htm>> Acesso em: 16 Janeiro de 2015.

DAMIANO, C.; CHIAROTTI, A.; CABONI, E.; QUARTA, R.; BOUMIS, G. Some factors affecting the induction and the expression of rooting in diferentes fruits species *in vitro*. **Acta Horticulturae**, n.300, p.211-225, 1991.

DANIEL, J. F. S. et al., Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal Pharmacology**, v.37, p.174-8, 2005.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic, p.1-13. 1991.

DESCHAMPS, C. **Propagação *in vitro* de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.) espécie florestal de mata ciliar**. In: MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. **Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 14, n.1, p. 110-121, 2012.

DINIZ, J. D. N.; MAGALHÃES, J. R.; INNECCO, R.; ALMEIDA, PINHO, J. L.; NUNES, J. L. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciência Agronômica, Fortaleza**, v.37, n.1, p.59-64, 2006.

DUNSTAN, D. I.; TURNER, K. E. The acclimatization of micropropagated plants. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and applications**. Orlando: Academic, v. 1, p.123-129, 1984.

FERREIRA, S. H., et al., **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Academia Brasileira de Ciências, São Paulo, 1998.133p.

FIALHO, V. R. F; ALFONSO, J. C. Estudios Fenológicos en Plantas Medicinales. **Revista Cubana Plantas Medicinalis**, v. 3, n.1, p. 12-17, 1998.

FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Medicinalis**, v.7, n.1, p.67-72, 2004.

FLORES. R.; MALDANER J.; NICOLOSO F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken., Santa Maria. **Ciência Rural** v.36, n.3, mai-jun, 2006.

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

FREITAS, H. B. **Desenvolvimento e hormônios vegetais**. Editora da Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2009.

GAHAN, P. B.; GEORGE E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE F. E; HALL, M. A; de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3ª ed. Springer, v. 1, p. 355-402. 2008.

GBOLADE, A. A.; LOCKWOOD, G. Metabolic studies of volatile constituents in tissue culture of *Melissa officinalis*. **Plant Physiol**. 140: 28-32. 1992.

GBOLADE, A. A.; LOCKWOOD, G. The constituents of *Melissa officinalis* cell cultures. **Planta Medicinalis**, v. 55: 228p. 1989.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. 1. ed. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Eversley: Exegetics Limited, 758p.1996.

GOMES, P.; **Fruticultura Brasileira**. 9. Ed. São Paulo: Nobel, 446p., 1983.

GONÇALVES, A. L. Substratos para a produção de mudas de plantas ornamentais. In: **MINAMI, K. (Ed.) Produção de mudas de alta qualidade em hortaliças**. São Paulo: T. A. Queiroz, Cap. 14, p. 107-115, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/Embrapa, v.1, p.183- 260, 1998.

GRIMALDI, F. et al. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008.

GUEVARA, E. B. Reguladores de crescimento. In: **II Curso de cultivo de tejidos**. [S.l.]: Turrialba, 1987. p. 58-79.

HARARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.

HOU, S. W.; JIA, J. F. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 95-100, 2004.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres de plantas cultivadas**. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, 52p., 1992.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R. et al. (Eds.). **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.

HUSSEY, G. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London: Butterwoths, 1986. p.69-84.

IMIG, C. D.; ZANCO, J. J. **Teste de adubação para plantas com atividade medicinal**. Relatório de projeto de pesquisa, Método de pesquisa em fertilidade do solo, protocolo: 2351, UNISUL, Tubarão, Santa Catarina, p. 23, 2008.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F. & DONOGHUE, M. J. 2002. **Plant systematics. A Phylogenetic approach**. 2ª ed. Sinauer Associates, Sunderland.

KLERK, G. J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v.38, n.2, p.129-144, 1990.

KOMALAVALLI, N.; RAO, M. V. *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre* – A multipurpose medicinal plant. In: MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n.1, p. 110-121, 2012.

LATA, A. H. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasma, a review. **Euphytica**, v.57, p.227-43, 1991.

LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.669-71, 2007.

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

MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa de crescimento. In: **FERRI, M.G. Fisiologia vegetal**. 1. ed. São Paulo, EDUSP, 1986, p. 331-350.

MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para el cultivos de fafia e ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J. V. et al. **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Bogotá: CYTED, 2000. p. 323-32.

MAGALHÃES, P. M. **Agrotecnologia para o cultivo da *Pfaffia***. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 5p. 2002.

MAIA, S. S. S.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, F. N.; OLIVEIRA, C. de. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (Lamiaceae), **Revista Brasileira de Ciências Agrária**, v. 3, n. 4, p. 327-331, 2008.

MALDANER, J. et al. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1201-6, 2006.

MANTELL, S. H. et al. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344p.

MARCHIORETTO, M. S., MIOTTO, S. T. S. & SIQUEIRA, J. 2008. ***Pfaffia cipoana* e *Pfaffia rupestris* (Amaranthaceae), duas novas espécies para o Brasil**. *Rodriguésia* 59: 129-133.

MARQUES, L. C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v.18, n.7, p.566-72, 2004.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. In: MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2000,136-137.

MATOS, F. J. A. 2000. Plantas Mediciniais - Guia de Seleção e Emprego de Plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. **Imprensa Universitária / edições UFC**, Fortaleza, 344 p.

MEFTAHIZADE, H.; LOTFI, M.; MORADKHANI, H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. **Afr. J. Biotechnol.**, 9: 4314- 4321. 2010.

MILLER, L. G. "Herbal Medicinals: Selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions". **Archives of Internal Medicine**, v.158, p.2200-11, 1998.

MING, L. C. **A Etnobotânica na recuperação do conhecimento popular**. UNESP, Botucatu, p. 4. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**. Brasília (DF). 2006. Disponível em:<[http://www.scielo.br/pdf/rlae/v17n3/pt\\_06.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rlae/v17n3/pt_06.pdf)>. Acesso em: 19 de dezembro de 2015.

MONTANARI JUNIOR, I.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of  $\alpha$ -ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Acta Horticulturae**, v.3, n.502, p.125-8, 1999.

MORADKHANI, H.et al. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: **A review**. **Journal of Medicinal Plants Research**, Victoria Island, v. 4, n. 25, p. 2753-2759, 2010.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e Estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 2, p. 39-44, 2007.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. **Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 14, n.1, p. 110-121, 2012.

MORARD, P.; FULCHERI, C.; HENRY, M. Mineral nutrition of *Gypsophila in vitro* root culture. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.22, n.4-5, p.717-730, 1999.

MORARD, P.; HENRY, M. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.21, n.8, p.1565-1576, 1998.

MULLER, K. & BORSCH, T. Phylogenetics of Amaranthaceae based on matK/trnK sequence data evidence from parsimony, likelihood, and bayesian analyses. **Annals Missouri Botanical Garden**. n. 92: p. 66-102. 2005.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.5, p.473-97, 1962.

NASCIMENTO A. da C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP e AIB no CULTIVO *IN VITRO* DE *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica - Ciências Agrárias e Ambientais** (PUC), Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223-228, abr./jun. 2008.

NETO A. G.; COSTA J. M. L. C.; BELATI C. C.; VINHÓIS A. H. C.; POSSEBOM L. S.; SILVA-FILHO A. A.; CUNHA W. R.; CARVALHO J. C. T.; BASTOS J. K.; SILVA M. L. A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **J. Ethnopharmacology** 2005; 96:87–91.

NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro. [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001.

NICOLOSO, F. T.; FORTUNATO, R. P.; FOGAÇA, M.A. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.277-83, 1999.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. dos S. Micropropagação de copaíba. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 109-120, julh. /dez. 2004.

NORONHA, M.A.S. **Níveis de água disponível e doses de esterco bovino sobre o rendimento e qualidade do feijão-vagem**. 2000. 76p. Dissertação (Mestrado em

Produção Vegetal) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia.

OLIVEIRA, R.A.G.; SILVA, M.S.H. **Plantas medicinais na atenção primária à saúde**. João Pessoa: UFPB, 1994. 64p.

PANIZZA, S. Emprego medicinal de plantas importadas e sucedâneas que ocorrem no Brasil. **Rev. Cienc. Farm.** São Paulo, v. 4, p. 27-38, 1982.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação de 'Trifoliata' através da cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.2, p.217-20, 1989.

PEDERSEN, T. M. 1997. Studies in South American Amaranthaceae. I. **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle**. Sér.3. Adansonia 19: 217- 251.

PEDERSEN, T. M. 2000. **Studies in South American Amaranthaceae V**. Bonplandia 10: 83-112.

PEREIRA A. M. S.; RODRIGUES D. C.; CERDEIRA R. M.; FRANÇA S. C. Isolamento de metabólitos de *Maytenus* associadas à ação anti-úlceras gástrica. **12º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Curitiba, 1993.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. 4. ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.

PIO, R. et al. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citros *Tangerina sunki* x *Trifoliata english* 63-256 com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.66-70, jan./fev., 2002.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 1, n.4, p.12-15, 1998.



PUCHOOA, D. Biotechnology in *Mauritius*: current status and constraints. **Electronic Journal of Biotechnology** 7 (2): 104-114. 2004.

RAMALHO, J. F. G. P. **Metais pesados em solos com diferentes usos agrícolas no estado do Rio de Janeiro**. 145p. Tese (PhD - Área de Concentração em Química do Solo) - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1996.

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

RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12, n. 2, p. 85-93, jul./dez. 2002.

RATHORE T. S.; DEORA N. S.; SHEKHAWAT N. S. Cloning of *Maytenus emarginata* (Willd.) Ding Hou-atre of the Indian Desert, through tissue culture. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 9, p. 449-451, 1992.

REIS, E. S; **I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí**, Minas Gerais, 2008.

RIGUEIRO, M. P. Plantas Que Curam. **Manual Ilustrado de Plantas Medicinais**. Editora Paulus, 3ª edição, São Paulo. 97p. 1992.

RODRIGUES, I. C. S. **Micropropagação, tolerância à salinidade e análise de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, cultivadas *in vitro***. 2010. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas, 2010.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F. T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p.57-63, 2003.

SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. **Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions**, *Fitoterapia*, n.74, p.445-452, 2003.

SANGUINETTI, E. E. **Plantas que curam**. Porto Alegre: Rigel, 208 p. 1989.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; FERREIRA, M. G. R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes em Rondônia, **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 234-240, 2008.

SCHEFFER, M. C. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. In: **Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais**. 1998. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinaisconservacao.pdf>> Acesso em: 17 Jan 2015.

SCHENKEL, E. P.; GOSSMAN, G.; SIMÕES, C. M. O.; MELLO, J. C. P.; MUNTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Normatização da Produção e Comercialização de Fitoterápicos no Brasil**; Editora da Universidade Federal de Santa Catarina/Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2003, cap.14.

SHARP, W. R. et al. **Plant cell and tissue culture: principles and applications**. Columbus: The Ohio State University, 892p. 1979.

SILVA, M. I. da, et al., A utilização da *Pfaffia glomerata* no processo de cicatrização de feridas da pele, **ABCD Arq Bras Cir Dig** 2010;23(4): p. 228-233.

SILVA, A. T. da; PASQUAL M.; ISHIDA J. S.; ANTUNES L. E. C. **Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro***. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.30(1): p. 48-53. 1995.

SILVA, P. A.; NETO SANTOS, A. L. dos; FILHO, S. M.; BLANK, A. F. **Efeito da temperatura e da luz na germinação e no vigor de sementes de *Melissa Officinalis* L.**, Horticultura Brasileira, v.22, n.2, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A Pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SILVA, S.; SATO, A.; LAGE, C. L. S.; GIL, R. A. S. S.; AZEVEDO, D. A.; ESQUIBEL, M. A. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. **J. Braz. Chem. Soc.**, 16: 1387-1390. 2005.

SIQUEIRA, J. C. & Grandi, T. S. M. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) nos cerrados e campos rupestres de Minas Gerais. **Acta Biologica Leopoldensia** 8: 213-230.1986.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da. E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Ciência Rural**, v.34, p.1471-1477, 2004.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, set-out, 2006.

SORENSEN, J. M. *Melissa officinalis* – essential oil – authenticity, production and pharmacological activity – a review. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 10, n. 1-2, p. 7-15, 2000.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum. Nova Odessa. 2005.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. S. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, v.56, n.1, p.71-76, 1981.

STÜTZER, O. 1935. **Die Gattung Pfaffia mit einem Anhang neuer Arten von Alternanthera**. Feddes Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis 88: 1-49.

TAVARES, A. C.; PIMENTO, M. C.; GONÇALVES, M. T. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. **Plant cell Rep.**15: 441-444. 1996.

TAVARES, A. R.; CASTRO, C. E. F.; COSTA, A. M. M. Propagação *in vitro* de *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, n. 8, Campinas, 1990. **Anais...** São Paulo: SBSP, 1992. p.67-9.

TESKE, M.; TRENTTINI A. M.M. **Compêndio de Fitoterapia**. Paraná, Herbarium, 317p. 1997.

\_\_\_\_\_. **M. Herbarium compêndio de fitoterapia**. Herbarium Laboratório Botânico. 4. ed. rev. Curitiba. 2001, p. 130-131.

TORRES A. C, CALDAS L. S.; BUZZO J. A. (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.1. e 2. Brasília, Embrapa, 864p. 1998.

TURHAN, M. Hand book of herbal plants, **Melissa officinalis**, Vol. 3: 184-245, 2006

VASCONCELOS, J. M. O. **Amaranthaceae do Rio Grande do Sul, Brasil - V.** Gêneros *Pfaffia* Mart. e *Gomphrena* Mart. Roessléria 8: 75-127. 1986.

VEIGA JUNIOR; VALDIR F.; PINTO, ANGELO. **Plantas medicinais: cura segura?** In: Quim. Nova, Vol.28, No.3, 519-528, 2005. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n3/24145.pdf>> Acesso em: 17 jan. 2015.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Rev. Bras. PI. Med.**, Botucatu, v.11, n.2, p.176-183, 2009.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. (2006), **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Química Nova, 29,326-337.

VIEIRA, I. C. G; SILVA, J. M. C.; OREN, D. C. E D'INCAO, M. A. **Diversidade biológica e cultural da Amazônia**. Belém, Museu Goeldi, 2000, 421 p.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'ÉBANO' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.3, p.582-9, 2005.

WANDERER, M.; FRANKE, L.B.; BARROS, I.B.I. de. **Germinação de sementes de melissa com diferentes origens**, In: II Congresso Brasileiro de Agroecologia, Anais, **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, fev. 2007.

WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. **Growth and differentiation in plants**. 3. ed. Oxford, England: Pergamon Press, 343 p., 1981.

WHO, Monographs on Selected Medicinal Plants. Geneva, Suica: **WHO Graphics**, v. 2, p. 351. 2002.

ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. Action of growth regulators. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Tissue culture in forestry**. Dordrech: Martinus Nijhoff, p.231-55.1985.

ZIMMER, A.R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p.450-3, 2006.

ZIMMERMAN, R. H.; BROOME, O. C. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of the apple cultivar cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.106, n.5, p.648-652. 1981.

ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, p.34-38. 1985.