



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

OLIVAL TEIXEIRA MALTA

**EFEITO DA BENZILAMINOPURINA (BAP) SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
AS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DA *Aloe vera* L. *IN VITRO***

**GOVERNADOR MANGABEIRA - BA
2020**

OLIVAL TEIXEIRA MALTA

EFEITO DA BENZILAMINOPURINA (BAP) SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DA *Aloe vera* L. *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Faculdade Maria Milza, como exigência para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro Mesquita

**GOVERNADOR MANGABEIRA - BA
2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Faculdade Maria Milza,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bibliotecárias responsáveis pela estrutura de catalogação na publicação:
Marise Nascimento Flores Moreira - CRB-5/1289 / Priscila dos Santos Dias - CRB-5/1824

M261e Malta, Olival Teixeira

Efeito da benzilaminopurina (bap) sobre a composição química e as características morfofisiológicas da aloe vera l. in vitro / Olival Teixeira Malta. - Governador Mangabeira - BA , 2020.

63 f.

Orientadora: Mariane de Jesus da Silva de Carvalho.
Co-orientador: Paulo Roberto Ribeiro Mesquita.

Tese (Mestrado Profissional em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Faculdade Maria Milza, 2020 .

1. Cultura de Tecidos. 2. Aloe Vera - Composição Química. 3. Aloe Vera - Propriedades Medicinais. 4. Metabólitos Secundários - Aloe Vera. I. Carvalho, Mariane de Jesus da Silva de, II. Mesquita, Paulo Roberto Ribeiro, III. Título.

CDD 633.88

OLIVAL TEIXEIRA MALTA

EFEITO DA BENZILAMINOPURINA (BAP) SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DA *Aloe vera* L. *IN VITRO*

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

Linha de Pesquisa: Planejamento, Gestão e Tecnologias Ambientais

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mariane de Jesus da Silva de Carvalho
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita

Aprovada em: 18 de junho de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

Prof.^a Dr.^a Mariane de Jesus da Silva de Carvalho
Orientadora

Karine da Silva Simões

Dr.^a Karine da Silva Simões
Membro Externo (EMBRAPA)

Kátia Nogueira Pestana de Freitas

Prof.^a Dr.^a Kátia Nogueira Pestana de Freitas
Membro Interno (FAMAM)

GOVERNADOR MANGABEIRA - BA
2020

Aos meus pais, Olival e Emília, pelo esforço e empenho em minha criação, abdicando muitas vezes de suas vidas em detrimento à felicidade de seus filhos.

Aos meus irmãos Ellen, Luiz, Sillas e Priscilla que direta ou indiretamente me incentivaram.

Em especial a minha esposa Laise por toda compreensão, apoio, incentivo e amor, aos meus filhos João Gabriel e Lara por toda paciência e carinho. Vocês são a maior motivação para minha dedicação em vencer mais esse desafio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por guiar todos meus passos e me permitir conquistar tantas realizações, proporcionando meu crescimento pessoal e profissional. Por ter me concedido uma Família linda, grandes amigos e ter me cercado de pessoas maravilhosas.

A Professora Mariane, por toda competência, paciência, profissionalismo, dedicação e orientação. Por ter me estimulado a seguir em frente apesar de alguns momentos de desânimo. Obrigado pelo crédito depositado em mim. Tenho certeza que não conseguiria sem seu direcionamento.

Ao professor Frederico que gentilmente participou de maneira muito importante desse trabalho, passando um pouco do seu vasto conhecimento. Ao professor Paulo Mesquita, pela coorientação, dedicação e por aceitar prontamente a participar nesta pesquisa.

Ao professor Weliton por ter sido o primeiro a ofertar esse desafio de adentrar uma área distante de minha formação profissional. Embora o destino tenha traçado caminhos diferentes, ficaram as marcas da competência e respeito.

A professora Kaliane pelo incentivo, profissionalismo e amizade. Deixo aqui minha admiração e respeito. Como também a todos professores do Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Faculdade Maria Milza que contribuíram em minha formação e nessa pesquisa.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão desta etapa, deixo aqui o meu respeito e muito obrigado.

RESUMO

A *Aloe vera* é uma planta medicinal utilizada para tratamento de diversas patologias. Popularmente conhecida como babosa, possui em suas folhas substâncias farmacologicamente ativas. Em função disso, este trabalho estabeleceu como objetivo avaliar o perfil dos metabólitos secundários em plantas de *Aloe vera* cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e através de método convencional de cultivo, com intuito de promover maior produção de compostos com propriedades farmacológicas nas plantas cultivadas *in vitro*. Para isso, gemas axilares de plantas de babosa, cultivadas no município de Muritiba - BA, foram coletas em duas épocas distintas, desinfestadas e cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 3,0 mg L⁻¹ BAP sob condições controladas de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa durante 30 dias. Brotações oriundas das gemas axilares foram cultivadas por mais dois subcultivos com intervalos de 30 dias cada em meio MS sem adição de reguladores e posteriormente inoculadas em frascos de vidro contendo o meio de cultura MS, suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de ANA e concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), em dois ambientes de cultivo com variação de temperatura e luminosidade (Sala de crescimento com 25 °C e 30 μmol m⁻² s⁻¹ e BOD com 30 °C e 40 μmol m⁻² s⁻¹). Após 30 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram avaliadas quanto a suas características morfofisiológicas (altura de planta, número de brotos; número de folhas verdes, presença de folhas senescentes e de raízes) e, tanto as plantas cultivadas *in vitro*, como as cultivadas pelo método convencional foram avaliadas quanto ao perfil de metabólitos produzidos (pelas técnicas HS-SPME/GC-MS). O delineamento experimental dos experimentos foi inteiramente casualizado. Foram utilizadas quatro a cinco repetições por tratamento, sendo a unidade experimental representada por um frasco contendo três explantes com aproximadamente 1,5 cm de tamanho. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa R. As concentrações de BAP avaliadas não apresentaram diferenças significativas nas características morfofisiológicas analisadas. No entanto, a utilização e o aumento nas concentrações de BAP promoveram redução da área total dos compostos orgânicos voláteis (COV's) nas plantas. Contudo, as plantas cultivadas *in vitro* apresentaram maior área total e concentração dos COV's que a planta matriz *in vivo*. Dessa maneira, é fundamental a realização de pesquisas envolvendo a utilização de outras citocininas e condições de cultivo *in vitro*, para o ajuste de protocolo que proporcione a propagação *in vitro* em larga escala e favoreça a produção de COV's em babosa, assim como em outras plantas de interesse da indústria farmacêutica, diminuindo a necessidade de retirada de plantas do meio ambiente. Assim, esta pesquisa pode ser utilizada como base para desenvolver protocolos de cultivo *in vitro* dessa espécie e de outras plantas medicinais, visando, além dos aspectos mencionados, avaliar a atividade farmacológica de plantas em organismos vivos, pois a ação dos COV's atua em sinergismo, e concentrações isoladas de cada composto presente nas plantas medicinais pode não influenciar positivamente na sua resposta farmacológica.

Palavras-chave: Cultura de Tecidos. Babosa. Metabólitos Secundários. Princípios ativos.

ABSTRACT

Aloe vera is a medicinal plant used to treat several pathologies. Popularly known as *aloe vera*, it has pharmacological active substances in its leaves. Therefore, this article established the objective of evaluating the profile of secondary metabolites in *Aloe vera* plants cultivated *in vitro*, using different 6-benzylaminopurine (BAP) filters and through the conventional cultivation method, in order to increase the production of chemical substances, with pharmacological properties in plants cultivated *in vitro*. To this end, axillary buds from *aloe* plants, cultivated in the municipality of Muritiba - BA, were harvested at two different times, disinfected and cultivated *in vitro* in MS culture medium with 0.2 mg L⁻¹ of naphthalenoacetic acid (ANA) and 3.0 mg L⁻¹ BAP under controlled conditions of temperature, photoperiod and light intensity for 30 days. Shoots from the axillary buds were cultivated for two more subcultures at 30 days intervals each MS medium without the addition of regulators and subsequently inoculated in glass flasks containing the MS culture, supplemented with 0.2 mg L⁻¹ of ANA and BAP concentration (0.0; 1.0; 2.0 and 3.0 mg L⁻¹), in two cultivation environments with temperature and light variation (Cultivation room with 25 ° C and 30 μmol m⁻² s⁻¹ and BOD with 30 °C and 40 μmol m⁻² s⁻¹). After 30 days of *in vitro* cultivation, the plants were evaluated based on their morphophysiological characteristics (plant height, number of shoots; number of green leaves, presence of senescent leaves and roots) and both, the plants cultivated *in vitro* and the plants cultivated by conventional method were evaluated based on the profile of produced metabolites (by HS-SPME / GC-MS techniques). The experimental design of the experiments was completely randomized. Four to five repetitions per treatment were used, with the experimental unit represented by a flask containing three explants approximately 1.5 cm in size. Statistical analysis were performed using the program R. The evaluated BAP concentrations did not show significant differences in the morphophysiological characteristics analyzed. However, the use and increase in BAP concentrations promoted a reduction in the total area of volatile organic compounds (VOCs) in plants. Nevertheless, plants cultivated *in vitro* had a greater total area and concentration of VOCs than the parent plant *in vivo*. Thus, it is essential to carry out research involving the use of other cytokinins and *in vitro* cultivation conditions, for the adjustment of the protocol that provides large-scale *in vitro* propagation and favors the production of VOCs in *aloe*, as well as in other plants of interest to the pharmaceutical industry, reducing the need to remove plants from the environment. Thus, this research can be used as a basis to develop protocols for *in vitro* cultivation of this species and other medicinal plants, aiming, in addition to the aspects mentioned, to evaluate the pharmacological activity of plants in living organisms, as the action of VOCs acts in synergism, and isolated concentrations of each compound present in medicinal plants may not positively influence its pharmacological response.

Keywords: Tissue Culture. *Aloe*. Secondary metabolites. Active principles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Plantas de *Aloe vera* cultivadas sob condições de campo: A) local de coleta e B) plantas matrizes utilizadas nos experimentos I, II e III.26
- Figura 2** – Explantes de *Aloe vera* utilizados no estabelecimento *in vitro*: A) gemas axilares presentes na planta matriz; B) gemas axilares submetidas ao processo de desinfestação; C) gemas inoculadas em tubos de ensaio contendo meio nutritivo; D) cultivo *in vitro* sob condições controladas.....27
- Figura 3** – Subcultivo das brotações de *Aloe vera* oriundas da fase de estabelecimento *in vitro*: A) brotações das gemas axilares; B) subcultivadas; C) inoculadas em frascos de vidro contendo meio nutritivo e cultivadas por 30 dias sob condições controladas28
- Figura 4** – Brotações de *Aloe vera* cultivadas *in vitro* em distintas concentrações de BAP: A) brotos das matrizes coletadas em dezembro de 2018 com aproximadamente 1,5 cm de tamanho; B) inoculados em frascos de vidro contendo meio de cultura com distintas concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), cultivadas durante 30 dias sob condições controladas29
- Figura 5** – Brotações de *Aloe vera* oriundas das matrizes coletadas em agosto de 2019 cultivadas *in vitro* em distintas concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e ambiente de cultivo com temperatura de 25^o ± 1^oC, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹30
- Figura 6** – Brotações de *Aloe vera* oriundas das matrizes coletadas em agosto de 2019 cultivadas *in vitro* em distintas concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), em estufa BOD com temperatura 30^o ± 1^oC, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹).....31
- Figura 7** – Técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME) dos compostos orgânicos voláteis das plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*: A) explante a ser macerado com bastão de vidro; B) folha macerada e armazenada em recipiente lacrado; C) equipamento extrator em fase sólida (headspace); D) microextração em fase sólida com fibra CAR/PDMS/DVB33
- Figura 8** – Separação dos compostos voláteis das plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*: A) cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, Modelo QP2010 Plus, Shimadzu); B) separação dos COV's realizadas em coluna DB-1MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); C e D) programação do forno; E) tempo total de corrida de 46,0 min.....34
- Figura 9** – Processo de aclimatização das mudas de *A. vera* provenientes do cultivo *in vitro*: A) plantas acondicionadas em garrafas plásticas transparentes PET contendo terra vegetal autoclavada; B) retirada da tampa das garrafas por intervalos crescentes de tempo; C) remoção da parte superior das garrafas; D) após o desenvolvimento das plantas...36

Figura 10 – Área total dos compostos voláteis observados nas plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹) durante 30 dias e das plantas cultivadas *in vivo*43

Figura 11 – Área total dos compostos voláteis observados nas plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹) durante 30 dias e das plantas cultivadas *in vivo*.....49

Figura 12 – Plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias em BOD com temperatura 30° ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹: A, B, C e D) plantas cultivadas na ausência e presença de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹, 3,0mg L⁻¹, respectivamente).....50

Figura 13 – Plantas de *Aloe vera*, provenientes do cultivo *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹, 3,0mg L⁻¹, respectivamente): A e B) 30 dias da etapa de aclimatização; C e D) 120 dias de aclimatização.....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância para altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias37
- Tabela 2.** Valores médios de altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias38
- Tabela 3.** Porcentagem de folhas senescentes (PFS) e de enraizamento (PR) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias39
- Tabela 4.** Tempo de retenção (RT/min) e compostos voláteis, analisados por HS-SPME-CG-MS, das plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹) durante 30 dias e das plantas cultivadas *in vivo*.....40
- Tabela 5.** Resumo da análise de variância para altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.....44
- Tabela 6.** Valores médios de altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.....44
- Tabela 7.** Porcentagem de folhas senescentes (PFS) e de enraizamento (PR) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.....45
- Tabela 8.** Tempo de retenção (RT/min) e compostos voláteis, analisados por HS-SPME-CG-MS, das plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹) durante 30 dias e das plantas cultivadas *in vivo*.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACM - Acemannan

ANA - Ácido naftalenoacético

ANOVA - Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

AP - Altura da Planta

BA - Bahia

BAP - 6-benzilaminopurina.

BOD - Biochemical Oxygen Demand ou DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

CAR/PDMS/DVB - carbonxen/polimetilsiloxano/divinilbenzeno

CETAB - Centro Tecnológico Agropecuário do Estado da Bahia

COV's - Compostos Orgânicos Voláteis

FDA - U. S Food and Drug Administration

FS - Folhas Senescentes

GC-MS - Cromatógrafo a gás

GLA - Ácido Gama Linolênico

HS-SPME - microextração em fase sólida

IL - interleucina

LPS - lipopolissacarídeo

MS - MURASHIGE e SKOOG.

NB - Número de Brotos.

NFS - Número de Folhas senescentes

NFV - Número de Folhas verdes

OMS - Organização Mundial de Saúde

PR - Presença De Raízes

RNA - ácido Ribonucleico

SAS - Sistema Integrado De Aplicações

SUS - Sistema Único de Saúde.

TNF - Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	15
2.2	PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	16
2.3	MICROPROPAGAÇÃO	18
2.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA <i>Aloe vera</i> L.....	20
2.5	PROPRIEDADES MEDICINAIS DA <i>Aloe vera</i> L.	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DA <i>Aloe vera</i> L.....	26
3.1.1	Experimento I: plantas coletadas em dezembro de 2018	29
3.1.2	Experimento II e III: plantas coletadas em agosto de 2019	30
3.2	AVALIAÇÃO MORFOFISIOLOGICA DAS PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	31
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
3.4	AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DE <i>Aloe vera</i> L. CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E ATRAVÉS DE MÉTODO CONVENCIONAL DE CULTIVO	32
3.5	ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS DE <i>Aloe vera</i> L.	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	EXPERIMENTO I: PLANTA MATRIZ COLETADA EM DEZEMBRO DE 2018.....	37
4.1.1	Análise morfofisiológica das plantas de <i>A. vera</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP	37
4.1.2	Análise química das plantas de <i>A. vera</i> cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	39
4.2	EXPERIMENTO II: PLANTA MATRIZ COLETADA EM AGOSTO DE 2019...	43
4.2.1	Análise morfofisiológica das plantas de <i>Aloe vera</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP	43
4.2.2	Análise química das plantas de <i>A. vera</i> cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	45

4.3	EXPERIMENTO III: PLANTA MATRIZ COLETADA EM AGOSTO DE 2019..	49
4.4	ACCLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS DE <i>Aloe vera</i> L.....	50
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXO.....	62

1 INTRODUÇÃO

A *Aloe vera* L., popularmente conhecida como babosa, vem sendo utilizada há muitos anos como fitoterápico (CAGNI; LUBI, 2018). É uma planta pertencente à família Xanthorrhoeaceae, originária da África do Sul e Ásia, sendo trazida ao Brasil no início da colonização, onde se adaptou bem a nossa biodiversidade (TROLLER, 1999; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002). Vem sendo utilizada pela medicina tradicional para tratamento de diversas enfermidades (FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014).

Apesar de conhecida há pelo menos três mil anos, a babosa ganhou interesse da ciência no último século (PALHARIN et al., 2008). Diversas populações faziam uso desta planta, remontando o ano de 1.500 a.C., ocorrendo achados de 12 medicamentos com base na *Aloe vera* (COASTS; AHOLA, 2010; PAL et al., 2013). Embora existam centenas de espécies do gênero *Aloe* no mundo, apenas quatro (*Andongensis*, *Arborescens*, *Barbadensise* *Ferox*) apresentam propriedades medicinais e/ou algum outro interesse econômico, e nesse contexto destaca-se a *Aloe vera*, espécie de maior interesse comercial na área cosmética, medicinal e nutricional (CHINCHILLA et al., 2013).

A *A. vera* tem sido bastante estudada por indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e fitoterápica, ganhando destaque nas últimas décadas, no Brasil, com a atuação de um grupo americano (Forever Living Products), que é o maior produtor e distribuidor mundial de produtos nutricionais e de beleza, à base de babosa (BACH; LOPES, 2007).

Devido ao alto custo dos medicamentos industrializados, a possibilidade de produção de medicamentos de baixo custo, através de matéria prima advindas de fontes sustentáveis abre espaço à busca de substâncias naturais, como os fitoterápicos (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011; TORO et al., 2018).

A fitoterapia consiste em um conjunto de técnicas de utilização dos vegetais no tratamento de doenças e na recuperação da saúde. Como método terapêutico, essa técnica faz parte dos recursos da medicina natural (TEIXEIRA et al., 2012).

Segundo Fonseca (2012), no Brasil a biodiversidade genética de fauna e flora é extremamente rica, tendo 55 mil espécies já pesquisadas de um total de 550 mil. Em pesquisa realizada por Lorenzi e Mattos (2002) eles presumiram que pelo menos metade das plantas que representam a diversidade da flora brasileira possuem

princípios ativos, que por sua vez, têm na maioria dos casos propriedades farmacológicas.

É nessa conjuntura que a *A. vera* tem despertado grande interesse por ser uma planta descrita em diversas farmacopeias com crescente relevância para os setores agrícola, cosmético, nutracênico e farmacêutico. A Babosa tem sido usada como planta medicinal tanto no uso interno quanto externo, além de ser encontrada também em diversos produtos de higiene pessoal (SILVA et al, 2013).

O mercado mundial de fitoterápicos tem crescido de 10% a 20% ao ano e diversos fatores como hábitos de vida saudáveis, aumento do consumo de produtos naturais, efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos, descoberta de novos princípios ativos em plantas, comprovação científica da ação dos fitoterápicos, bem como acessibilidade financeira à população de menor poder aquisitivo corroboram para estimular o aumento do consumo dos fitoterápicos (SOUSA; MIRANDA, 2004).

Na população brasileira, 20% dos indivíduos respondem pela parcela de consumidores dos medicamentos sintéticos disponíveis; enquanto os 80% restantes fazem uso de produtos naturais, especialmente as plantas medicinais, sendo muitas vezes a única fonte de recurso terapêutico e de acesso mais fácil. Essa alternativa é muito utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

A utilização da *A. vera* na medicina tradicional possui diversas vertentes, como: controle de doenças na pele, danos por irradiação, afecções dos olhos, distúrbios intestinais e doenças virais, se justificando pela sua ação cicatrizante, anti-inflamatória, protetora da pele, propriedade bactericida, atividade laxante e por possuir agentes desintoxicantes. Além disso, possui em sua composição vitaminas C, E, complexo B e ácido fólico, minerais, aminoácidos e polissacarídeos (DOMINGUEZ et al., 2006; SIMÃO, 2013).

É nessa perspectiva que estudos experimentais, à base de plantas medicinais e outros elementos que atuam no processo de cicatrização, estão sendo desenvolvidos e, entre eles, encontram-se pesquisas com o uso da *A. vera* (OLIVEIRA; SOARES; ROCHA, 2010). Nessa vertente, as áreas da saúde têm realizado pesquisas que possam agregar melhor resposta tecidual em condições pós-cirúrgicas, como ocorre na área odontológica.

Algumas dessas pesquisas estimam que cerca de duzentas moléculas biologicamente ativas na *A. vera*, agem sinergicamente na neoformação celular,

como no caso de formação dos fibroblastos para neoformação epitelial (GRYNDLAY; REYNOLDS, 1986); assim como, favorecem a fibroplasia, síntese e maturação de colágeno (CHITHRA; SAJITHLAL; CHANDRAKASAN, 1998), e também, estimulam regeneração do osso alveolar (RADHA; LAXMIPRIYA, 2015).

Assim, a *A. vera* tem sido estudada no curso do processo de cicatrização alveolar, onde foi utilizada em quadros de alveolite seca (processo pós-cirúrgico odontológico), sendo observado indução de formação de tecido de granulação (MORALES, 1984).

Com isso, a babosa também está relacionada ao uso conjunto com oxido de zinco em casos de alveolite, assim como associado à própolis em casos pós-extrações, sendo observado um melhor processo de cicatrização, bem como remodelação óssea na terceira semana pós-tratamento com o gel de babosa (BERRIOS, 2004).

Outra característica observada nesta planta é a capacidade anti-inflamatória do extrato do parênquima de reserva da *A. vera*, que está associada à atividade inibitória das ciclooxigenases, e por consequência inibição da síntese de prostaglandinas, um dos principais mediadores do processo inflamatório (BAUTISTA-PÉREZ; SEGURA-COBOS; VÁSQUEZ-CRUZ, 2004).

Portanto, o controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matérias-primas têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (EVANS, 1996). O aprimoramento e o investimento em estudos de domesticação, produção biotecnológica e melhoramento genético de plantas medicinais, ao invés do uso de plantas selvagens coletadas diretamente no campo, deve levar à obtenção de matérias-primas uniformes e de alta qualidade (EVANS, 1996; CALIXTO, 2000).

Deste modo, nas plantas cultivadas *in vitro* é possível a utilização de agentes físicos e químicos para promover alterações morfológicas e em sua composição química de forma mais eficiente do que em plantas oriundas do meio ambiente (SERAFINE; BARROS; AZEVEDO, 2002).

É nessa perspectiva que a técnica de micropropagação tem sido utilizada para multiplicar centenas de espécies de plantas medicinais, genótipos selecionados, ou para substituir acessos que tenham adquirido caracteres indesejáveis como baixa produtividade e susceptibilidade a doenças. A multiplicação

in vitro de plantas, a partir da cultura de gemas e meristemas, é basicamente uma extensão da propagação vegetativa feita em muitas espécies (FIDELIS et al., 2000).

Com esta pesquisa buscou-se ajustar uma metodologia para cultivo *in vitro* de *A. vera* e avaliar o perfil dos metabólitos secundários dentro da perspectiva estabelecida, como também, propiciar o fornecimento de mudas uniformes para futuros estudos farmacológicos e estabelecimento de farmácias vivas.

Em função dos aspectos abordados, esse trabalho estabeleceu como objetivo geral avaliar o perfil dos metabólitos secundários em plantas de *Aloe vera* L. cultivadas *in vitro* e através de método convencional de cultivo, com intuito de promover maior produção de compostos com propriedades farmacológicas nas plantas cultivadas *in vitro*. Para isso, foram executados os seguintes objetivos específicos: 1) avaliar o cultivo *in vitro* da babosa utilizando diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP, e sua influência sobre as características morfofisiológicas da babosa; 2) identificar o perfil dos metabolitos nas plantas cultivadas *in vitro* em comparação com as plantas oriundas do método convencional de cultivo, avaliando as substancias com potenciais propriedades farmacológicas utilizadas para controle da dor, inflamação e infecções.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

As plantas têm sido utilizadas com fins medicinais, para tratamento, cura e de forma preventiva, sendo provavelmente, a forma mais antiga de prática medicinal da humanidade. No final do século XX, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde, através de práticas tradicionais (AKERELE, 1993; BRASIL, 2007).

Portanto, apesar da evolução da indústria farmacêutica a partir da segunda metade do século XX, ainda existem obstáculos básicos para utilização de fármacos sintéticos pelas populações mais carentes, devido a problemas que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Desta forma, devido a fácil obtenção e a tradição do uso de plantas medicinais, verifica-se uma ampla utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIAL, 2005).

Dentro do contexto abordado, é importante ressaltar que a OMS (2002) define planta medicinal como todo e qualquer vegetal, cultivado ou não, que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos.

Porém, existe diferença entre planta medicinal e fitoterápico, este último reside na manipulação da planta para uma formulação específica. Esses compostos são obtidos a partir de recursos renováveis apresentando desenvolvimento mais lento de resistência por conter vários agentes com diferentes mecanismos de ação, degradam mais rapidamente, não provocam efeito em organismos não alvos e promovem baixa toxicidade em animais e seres humanos, como também baixa contaminação ambiental e dos alimentos (BALANDRIN et al., 1985; BORGES; ZOUSA; BARBOSA, 2011).

Com isso, a fitoterapia é representada pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade, sendo o produto final, acabado, embalado e rotulado. Contudo, na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado

produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas. Neste último caso encontra-se o fitofármaco, que por definição “é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal” (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIAL, 2005).

No Brasil, cerca de 90% da população fez uso de alguma planta medicinal nos últimos anos. Hábito herdado dos povos indígenas, continuado com a colonização portuguesa através da importação de ervas e especiarias da Índia, China e países do Oriente. Nos últimos anos, este hábito tem aumentado, principalmente pela creditação de ser um medicamento mais “saudável”. Porém, muitas plantas medicinais ainda não apresentam um controle de qualidade adequado, o que pode ocasionar sérios riscos de contaminação para seus consumidores (SANTOS et al., 2013; ASSIS et al., 2015).

2.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são compostos químicos que cumprem funcionalidades não essenciais as plantas, desde que não interfiram no metabolismo primário, porém permitem claras vantagens seletivas intervindo nas interações ecológicas entre a planta e seu ambiente (MASSA, 2011).

Contudo, por muitos anos, o conhecimento sobre a maioria dos metabólitos secundários era desconhecido. Em princípio, eram considerados produtos finais de processos metabólicos, sem função específica, ou diretamente como resíduos de plantas. Em geral, não tiveram sua importância reconhecida pelos biólogos, então historicamente receberam pouca atenção dos botânicos e muitas das funções ainda são desconhecidas. O estudo dessas substâncias foi iniciado por químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, que estavam interessados nessas substâncias devido à sua importância como fármacos, venenos, aromas, colas, óleos, ceras e outros materiais usados na indústria (TAIZ; LINCOLN; GEIGER, 2006).

Assim, experimentos observaram que condições ambientais adversas como, falta de nutrientes e déficit hídrico, podem restringir o crescimento das plantas e reduzir a velocidade fotossintética. Em tais condições, os carboidratos não estruturais tendem a ser acumulados e podem explicar o aumento da síntese de

substâncias de defesa baseadas nas cadeias de carbono, pertencentes ao metabolismo secundário. A confirmação do balanço de carbono/nutrientes foi encontrada em plantas que se desenvolvem em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes ou água, onde ocorre aumento da concentração de taninos condensados, lignina, fenóis totais e/ou glicosídeos fenólicos (GERSHENZON, 1984; BRYANT; TIITO, 1995).

Tais compostos que fazem parte do metabolismo secundário são classificados em diferentes tipos: fenóis, terpenóides, compostos nitrogenados ou alcaloides (HARBORNE, 1988; JURADO et al. 2015). Dois grupos de compostos secundários amplamente distribuídos em plantas são fenóis e terpenos, e apenas parte das espécies conhecidas contém metabolitos baseados em nitrogênios, tais como alcalóides ou glucosinolatos (HARBORNE, 1997).

Os fenóis são compostos químicos com pelo menos um anel aromático que contém um ou mais grupos hidroxilo. Muitos destes compostos aparecem como compostos derivados de reações de condensação e dependência, dando origem a uma grande variedade de compostos químicos em plantas (HARBORNE, 1980; STRACK, 1997; JURADO et al., 2015). A importância dos fenóis é que eles produzem suporte mecânico para a planta, contribuem para a coloração de flores e frutas, protegem contra patógenos e herbívoros e são altamente eficazes na proteção de tecidos da radiação UV (STRACK, 1997).

Os terpenóides são a família mais extensa de compostos em plantas (FELIPE; BICAS, 2017). Tais compostos são constituídos por duas ou mais unidades de isopreno unidos (5 átomos de carbono). A nomenclatura do terpeno reflete o número de unidades de isopreno presentes (BRAMLEY, 1997). Terpenos participam em diferentes funções nas plantas, como hormônio, em pigmentos fotossintéticos e como componentes em membranas (MCGARVEY; CROTEAU, 1995). Como também, alguns terpenos atuam no sistema de defesa na planta, bem como através de insetos polinizadores e dispersores de sementes (HARBORNE, 1991; FELIPE; BICAS, 2017).

Contudo, a formação dos metabólitos secundários ocorre graças ao metabolismo da glicose, no qual vai originar três vias, a dos intermediários principais, a do ácido chiquímico e a via do acetato (SANTOS, 2004). Nesse ciclo a glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico, que poderá seguir por vias diferentes. Na primeira ela pode seguir pela via do ácido chiquímico, no qual irão

originar os metabólitos secundários aromáticos, como os alcaloides indólicos, os quinolínicos, os isoquinolínicos, as ligninas e lignanas, as cumarinas e os taninos. Já na via da acetil-coenzima A (acetil-coA) depois da oxidação do piruvato, podem seguir três caminhos diferentes: a via do ácido cítrico vai dar origem aos alcaloides tropânicos, pirrolizidínicos piperidínicos e quinolizidínicos; a via do mevalonato vai gerar os terpenóides e os esteróis; e a condensação que vai formar os ácidos graxos (SILVA, 2008).

Portanto, independente da via metabólica seguida fica evidente a importância que os metabólitos secundários apresentam, haja visto que em estudos realizados foi constatado seus efeitos no organismo. Além disso, foi observado que dentre os grupos mais abundantes de metabólitos estão os compostos fenólicos e seus efeitos biológicos (sequestro de radicais livres, inibição da proliferação celular, bem como seu potencial como agente antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório) (CUNHA et al., 2016).

2.3 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação é o cultivo de vegetais em ambiente artificialmente controlado e em meio de cultivo adequado. Esta técnica tem como objetivo obter grande quantidade de plantas geneticamente idênticas a planta mãe, denominadas clones (GARCILIA, 2015). Este método utiliza pequenas frações de tecido vivo, denominados explantes, que são removidos de um organismo vegetal, passando pelo processo de desinfestação e posteriormente cultivados por um período indeterminado em um meio de cultura (TORRES et al., 2000).

Esta cultura de tecidos vegetais é extremamente vantajosa do ponto de vista ecológico, como também econômico, pois, permite a preservação dos vegetais no ambiente natural sem a necessidade de serem coletados, assim como corroboram na utilização de plantas com desenvolvimento celular mais uniforme, ratificando uma produção de metabólitos em maiores quantidades e em menor espaço de tempo, devido ao aumento da taxa de biossíntese das plantas (FUMAGALI et al., 2008).

Diferentes tipos de explantes são utilizados no cultivo *in vitro*, podendo ser qualquer segmento de tecido ou órgão vegetal, desde um fragmento de folha, da raiz, caule ou a qualquer tecido que se adéque à composição do meio de cultura e condições do ambiente de cultivo (JARDIM et al., 2010).

Dentre as várias condições que influenciam no cultivo *in vitro*, destaca-se o meio nutritivo, as condições fisiológicas dos explantes, o genótipo de cada planta e os fitoreguladores utilizados. Ressalta-se também que, a parte do vegetal a ser utilizada é fundamental para a morfogênese, pois as células da planta respondem de diferentes formas frente as diversas combinações hormonais e de condições de cultivo (FLORES, 2006).

Sendo assim, um dos fatores determinantes para o sucesso da micropropagação é a presença nos meios de cultivo de substâncias que favoreçam o crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais. Para isso, são necessários sais inorgânicos, uma fonte de carbono, vitaminas, reguladores de crescimento (fitohormônios), aminoácidos, açúcares e outras substâncias importantes para o desenvolvimento *in vitro* das plantas (CAMPO; SANZ; HERNANDEZ, 2007).

Diversos meios de cultura são utilizados para o cultivo *in vitro* de vegetais, como: MS (Murashige e Skoog), WPM, LS (Linsmaier e Skoog), BN (Borgn e Nitsch), B5 (Gamborg) e White, Miller e Oyima (RAMOS, 2012). Porém o meio MS é o mais utilizado para cultivo de plantas medicinais (MURASHIGE; SKOOG, 1962; VICENTE; ALMEIDA; CARVALHO, 2009).

Além do meio de cultura selecionado, a utilização de reguladores de crescimento vegetal são fatores determinantes no padrão de desenvolvimento das plantas *in vitro*. Assim, na micropropagação, as citocinas e auxinas desempenham papéis muito importantes. As citocinas são utilizadas quando a intenção for estimular a formação de múltiplas brotações, enquanto as auxinas são utilizadas principalmente, para induzir a formação de raízes, estudos de embriogênese somática e nos cultivos de células em suspensão (PIERIK, 1990; EINSERT, 1991; GEORGE, 1993).

A 6-benzilaminopurina (BAP) está entre as citocininas mais empregadas em estudos de micropropagação, pois atua na divisão celular, promovendo multiplicação de partes aéreas, indução na formação de gemas, atraso no envelhecimento foliar e indução no surgimento de novos brotos. Esse regulador de crescimento de origem sintética, dentre todas citocinas, possui o menor custo financeiro, por isso é bastante utilizado em trabalhos de multiplicação vegetal *in vitro* (RAVEN, 2001; VICENTE; ALMEIDA; CARVALHO, 2009; LUDTKE, 2013).

A biotecnologia tem utilizado a micropropagação como uma técnica de cultura de tecidos vegetais alternativa para propagação de espécimes de interesse comercial, entre as quais as plantas medicinais com valor farmacológico reconhecido. Apesar dos custos elevados da técnica, a crescente demanda por plantas indexadas, livres de vírus, com elevada qualidade fisiológica e fitossanitária, assim como síntese de metabólitos secundários potencializada, viabilizam a utilização desta técnica (LIMA et al. 2007).

Desta forma, esse método de propagação pode ser aplicado na produção de metabolitos secundários que tenham relevância terapêutica, haja vista a possibilidade de avaliar a qualidade fitossanitária e a qualidade do explante produzido e que, por algum impedimento não são sintetizados pela planta na natureza (PEREIRA, 2009). Além disso, é possível disponibilizar plantas saudáveis e livres de contaminações (CABRAL et al., 2003).

Em função dos aspectos mencionados, a micropropagação se mostra de extrema viabilidade para indústria farmacêutica, permitindo a multiplicação de plantas com valor farmacológico reconhecido, além da obtenção de espécies competitivas e adaptadas a diversos métodos de cultivo, escolha de novas espécies que servirão como fonte de compostos biologicamente ativos, aperfeiçoamento na produção de fitofármacos. Além do mais, proporciona maior produção de biomassa e manutenção de exemplares de interesse econômico (MORAIS et al., 2012).

E quando analisou-se a viabilidade econômica de produção dos exemplares da planta, em estudo realizado por Bach e Lopes (2007), na NATURAMA (Indústria e Comercio e Produtos Agropecuários LTDA), pesquisando-se os custos de produção de um dos derivados do extrato da *Aloe vera* por hectare de plantação da Babosa, constatando uma lucratividade de 20% anual, o que mostra ser um produto agrícola viável para produção rural.

2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA *Aloe vera* L.

Uma diversidade de compostos pode ser isolado tanto do parênquima central das folhas da *A. vera* como do exsudado resultante das células adjacentes aos feixes vasculares. A folha da planta é dividida em três partes principais, o látex, a casca e o gel mucilaginoso, onde podemos encontrar substâncias de interesse farmacológico. O exsudado das folhas é composto por derivados de 1,8-

dihidroxi-antraquinonas (antraquinona), um dos compostos fenólicos (ARO, 2012), e seus glicosídeos que são usados principalmente por seus efeitos catárticos. Os principais compostos fenólicos encontrados são os grupamentos cromonas e antraquinonas (barbalóina e isobarbalóina) (LACERDA, 2016).

O extrato proveniente de folhas apresenta concentrações de esteroide e triterpenos, ácido elágico, epigalocatequina, catequina, ácido gálico, naringina, miricetina, quercitina, kaempferol, assim como alcaloides. Esses compostos podem ser encontrados em qualquer parte da planta, mas haverá concentrações preferenciais em um ou mais órgãos da planta. Apesar da existência de controle genético, diversos fatores como manejo e clima, podem interferir na quantidade dos metabólitos secundários o que pode gerar diferenças nas ações farmacológicas das espécies vegetais (LACERDA, 2016).

A polpa do parênquima é composta por antraquinonas, carboidratos (polissacarídeos), cromonas, enzimas (carboxipeptidases, glutathione peroxidase, superóxido dismutase), compostos inorgânicos, compostos orgânicos, lipídeos, aminoácidos (arginina, asparagina, ácido glutâmico, ácido aspártico e serina), sacarídeos, proteínas e vitaminas (LIMA et al., 2012), assim como, vitaminas A, C, E, do complexo B, saponinas, ligninas, ácido salicílico, esteroides precursores de prostaglandinas (ácido gama linolênico ou GLA), fitoesteróis e oligoelementos tipo cálcio, fósforo, manganês, potássio, magnésio e zinco. Os compostos ativos majoritários até então identificados no parênquima de reserva são os polissacarídeos glucomannan e acemannan (HAMMAN, 2008; SHARRIF; SANDEEP, 2011).

A composição da *A. vera* pode não surtir o efeito esperado em situações que os componentes farmacológicos estejam separados, pois este efeito se dá pelo sinergismo dos diferentes compostos presentes (LACERDA, 2016). O que é corroborado por Oliveira (2007) quando afirma que o poder fitoterápico da planta ocorre devido a sua complexa composição dos constituintes químicos de natureza fenólica e aos polissacarídeos presentes na polpa.

De acordo com a literatura, existem cerca de 75 fitocompostos como representantes principais dos componentes bioativos já identificados na planta babosa (SHARRIF; SANDEEP, 2011; AHP, 2012; CHINCHILLA et al., 2013; PAL et al., 2013).

A proporção entre manose e glicose presente na babosa é de 1:1,3 sendo a glicose na forma livre (glucomannan) e manose na forma polimerizada (acemanna ou acemannan ou carrysina®) (AHP, 2012). No gel do parênquima, pode ser encontrado a manose (83,7% – 92,1%) como principal componente de um polissacarídeo de armazenamento conhecido como acemannan (ACM). Além de ser o mais importante constituinte bioativo da *A. vera*, representa a maior fração da porção de carboidrato do gel extraído do parênquima de reserva. O acemannan apresenta duas características: 1ª) São, na sua maioria, compostos por um “esqueleto” estrutural de resíduos polimerizados de manose com um pequeno percentual de glicose conectado por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4); 2ª) São resíduos polimerizados de manose acetilados na segunda (O-2), terceira (O-3) ou sexta (O-6) posição dos átomos de oxigênio, com uma taxa média de acetilação de \pm 0,78 por resíduo de manose (FEMENIA et al., 1999; AHP, 2012).

Outros polissacarídios encontrados nesse gel, porém em menores concentrações, são os derivados da glicose (glucomannana) em teor equivalente à 3,2% - 3,9%, da galactose (galactomanana) igual à 3,8% - 3,9% e da arabinose (arabinana) com valores de 0,9% à 3,6% (AHP, 2012).

Diversos polissacarídeos também podem ser encontrados, representados por carboidratos acetilados do ácido málico, denominados veracil glucans A (296 Da), B (458 Da, pH 3,8) e C (1570 Da, pH 4,7) que tem sido investigados em relação a suas propriedades imunomoduladoras (ESUA; RAUWALD, 2006; KUSTER et al., 2015).

A aloerida (PM 4000 – 7000 KDa) é um outro polissacarídeo encontrado em pequenas porções (0,015% p/p) no extrato mucilaginoso da babosa. Esse polissacarídeo possui frações glicosídicas contendo glicose (37,2%), galactose (23,9%), manose (19,5%) e arabinose (10,3%). Tal composto induziu a expressão de mRNA codificador de IL-1 β e TNF- α à níveis semelhantes aos observados em células maximamente ativadas por LPS; assim como, demonstrou indução em células monocíticas humanas do tipo THP-1 (QIU et al., 2000; PUGH et al., 2001).

2.5 PROPRIEDADES MEDICINAIS DA *Aloe vera* L.

A *A. vera* se divide basicamente em duas partes, uma mais externa, composta pelos feixes vasculares, e outra mais interna, o parênquima, contendo o gel mucilaginoso incolor de *aloe* (HAMMAN, 2008). Esse gel com aparência viscosa

e incolor constitui-se principalmente por água e polissacarídeos, além de 70 outros componentes, tais como, vitamina A, B, C e E, cálcio, potássio, magnésio e zinco, diversos aminoácidos, enzimas e carboidratos (TESKE; TRENTINI, 1997; FEMENIA et al., 1999; CARVALHO, 2005; SURJUSHE et al., 2008).

Devido a estas características supracitadas, esta planta tem sido utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatório, cicatrizante, em colite ulcerosa, como anti helmíntico, no tratamento de hemorroidas e como estimulante uterino (HOSSAIN et al., 2013) como também, em queimaduras, pequenas feridas, eczemas, psoríase e irritações na pele (CUNHA; ROQUE, 2011).

Assim, em experimentos que relacionam o metabolismo primário da *A. vera*, os polissacarídeos presentes no parênquima, merecem atenção especial, pois estes respondem por mais de 60% do remanescente sólido, sendo a acemanana o polissacarídeo encontrado em maior quantidade (FEMENIA et al., 1999).

Nesse sentido, a presença do polissacarídeo “acemanana” no gel de babosa foi pesquisada em estudos *in vitro*, verificou-se a estimulação de macrófagos, bem como a combinação da acemanana com interferón, potencializando seus efeitos de forma sinérgica. Em outro experimento a acemanana promoveu aumento significativo na proliferação dos fibroblastos, estimulou secreção de fator de crescimento queratinócito, fator de crescimento vascular endotelial, assim como de colágeno tipo I. Por conseguinte, essas substâncias atuam no processo de cicatrização de tecidos (epitelial e ósseo) de forma importante (JETTANACHEAWCHANKIT et al., 2009).

Com nome comercial de Carrysin, Acemanana Hidrogel, a acemanana foi aprovada pelo FDA (U. S Food and Drug Administration) como produto farmacêutico com aplicação em feridas desde a década de 90 e, além disso, vem sendo utilizada no tratamento de osteíte alveolar (TALMADGE et al., 2004).

Assim, em estudo realizado por Vadillo (2009) foi descrito o comparativo da resposta tecidual em alvéolos pós-extrações preenchidos com babosa, onde foi avaliado a resposta celular inflamatória, contagem de fibroblastos e organização de colágeno por leitura histológica aos 1, 7, 21 e 28 dias, concluindo que houve uma resposta tecidual favorecida pelo aumento do tecido osteóide, além de fibroblastos e fibras colágenas no 28 dia.

Ademais, em experimentos, *in vivo*, a acemanana promoveu aceleração na cicatrização de feridas orais, na formação de dentina reparadora e na reparação

óssea (JITTAPIROMSAK et al., 2010). Corroborando com essa vertente, o estudo realizado por BOONYAGUL et al. (2012) utilizando acemanana comprovou que a utilização do polissacarídeo aumenta significativamente a atividade da fosfatase alcalina, expressão das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP-2) e mineralização óssea.

Segundo a literatura recente, a acemanana estimula a regeneração do osso alveolar, cemento e ligamento periodontal em defeito ósseo maxilares e mandibulares, aumentando a proliferação celular, elevando a produção do fator V de crescimento e diferenciação, colageno tipo I e atividade da fosfatase alcalina (RADHA; LAXMIPRIYA, 2015).

Além disso, a acemanana também está envolvida na expressão de proteínas não colagenosas (sialoproteínas ósseas, osteonectina, osteocalcina e osteopontina), componentes da matrix extracelular. Desta maneira, regularizando a diferenciação dos osteoblastos e a síntese de matriz extracelular favorecendo a regeneração óssea (CHANTARAWARATIT; SANGVANICH; THUNYAKITPISAL, 2013).

Acresce que, a acemanana também é utilizada em processos de reparação óssea no intuito de aumentar a proliferação de células estromais da medúla óssea, promover aumento de fatores de crescimento endotelial vascular, como também de proteínas morfogenéticas, e a atividade da fosfatase alcalina, o que favorece a diferenciação de osteoblastos (BOONYAGUL et al., 2012).

Portanto, em estudos *in vivo*, a acemanana também está envolvida na expressão de proteínas como: sialoproteína óssea (proteína ligante de cálcio), osteonectina (proteína ligante de cálcio), osteocalcina (proteína envolvida na mineralização) e osteopontina (proteína de adesão celular), e desta maneira regulariza a diferenciação dos osteoblastos e a síntese de matriz extracelular o que favorece a regeneração óssea (CHANTARAWARATIT; SANGVANICH; THUNYAKITPISAL, 2013).

Outros monossacarídeos presente no gel da babosa, e pouco discutidos são, a manose, que acelerou o processo de cicatrização em estudo realizado em camundongos (DAVIS et al., 1994), e a alantoína, que favorece a angiogênese, processo que ocorre durante a fase reparativa sendo indispensável para a formação de calo ósseo (BONE; MILLS, 2013).

Em estudos realizados *in vitro*, foram isoladas proteínas e glicoproteínas do gel da babosa, sendo observada atividade anti-inflamatória ao reduzirem de forma

significante as enzimas COX-2 e lipoxigenase, de maneira comparável a anti-inflamatórios não esteroides como diclofenaco e nimesulida. Em testes *in vivo* foi observado aceleração do processo cicatricial bem como aumento da proliferação celular (CHOI et al., 2001).

Outras substâncias extraídas do gel da *A. vera* e testadas *in vitro* foram a aloína e a aloe-emodina, tendo os seus efeitos anti-inflamatórios comparáveis a quercetina e a campeferol (PARK et al., 2015). Essas duas substâncias anti-inflamatórias são produtos naturais ingeridos ou extraídos em diversos alimentos, possuindo também diversas propriedades farmacológicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da Faculdade Maria Milza (FAMAM), localizada as margens da BR – 101, distando 4,5 Km do município de Governador Mangabeira - BA e 11,6 Km do município de Cruz das Almas – BA. As plantas matrizes de *Aloe vera* utilizadas nos experimentos foram coletadas em uma residência localizada no município de Muritiba – BA (Figura 1).

A avaliação dos compostos voláteis produzidos pelas plantas oriundas do cultivo *in vitro* e através de método convencional de cultivo ocorreu no Laboratório de Ecologia Química do Centro Tecnológico Agropecuário do Estado da Bahia - CETAB em Salvador – BA.

Figura 1 – Plantas de *Aloe vera* cultivadas sob condições de campo: A) local de coleta e B) plantas matrizes utilizadas nos experimentos I, II e III.



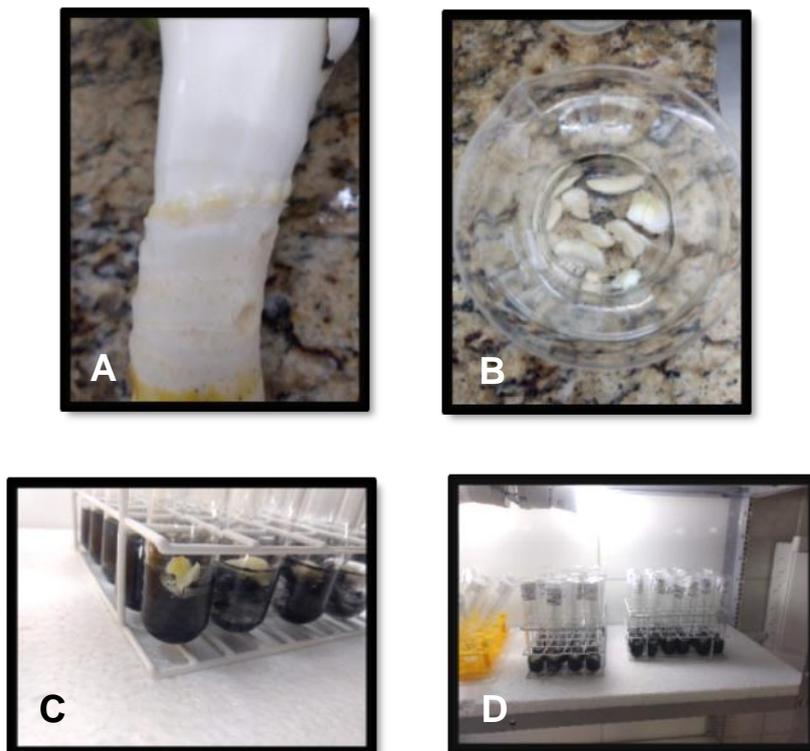
Fonte: arquivo próprio (2018)

3.1 CULTIVO *IN VITRO* DA *Aloe vera*

Para estabelecimento das plantas *in vitro* foram utilizadas gemas axilares, oriundas de plantas de babosa cultivadas sob condições de campo. As plantas matrizes selecionadas foram coletadas em dezembro 2018 e agosto de 2019, no mesmo local de coleta, pois o período do ano que a planta é coletada está entre os fatores de maior importância na composição dos compostos secundários, uma vez que a quantidade e a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano (NETO; LOPES, 2007) .

Após a coleta, as plantas foram levadas para o Laboratório, onde foram lavadas em água corrente e realizada a retirada das gemas axilares (Figuras 2A e 2B). Em câmara de fluxo laminar, as gemas foram desinfestadas em álcool etílico 70% durante 3 minutos e em hipoclorito de sódio na concentração de 1,25% durante 20 minutos. Posteriormente, os explantes foram lavados três vezes com água destilada autoclavada. Após a desinfestação, as gemas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de ANA, 3,0 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Figura 2C). O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes foram cultivados *in vitro* sob condições controladas de temperatura (25° ± 1°C), fotoperíodo (16 horas) e intensidade luminosa (30 μmol m⁻² s⁻¹) durante 30 dias (Figura 2D), conforme a metodologia descrita por CIANO (2018).

Figura 2 – Explantes de *Aloe vera* utilizados no estabelecimento *in vitro*: A) gemas axilares presentes na planta matriz; B) gemas axilares submetidas ao processo de desinfestação; C) gemas inoculadas em tubos de ensaio contendo meio nutritivo; D) cultivo *in vitro* sob condições controladas.

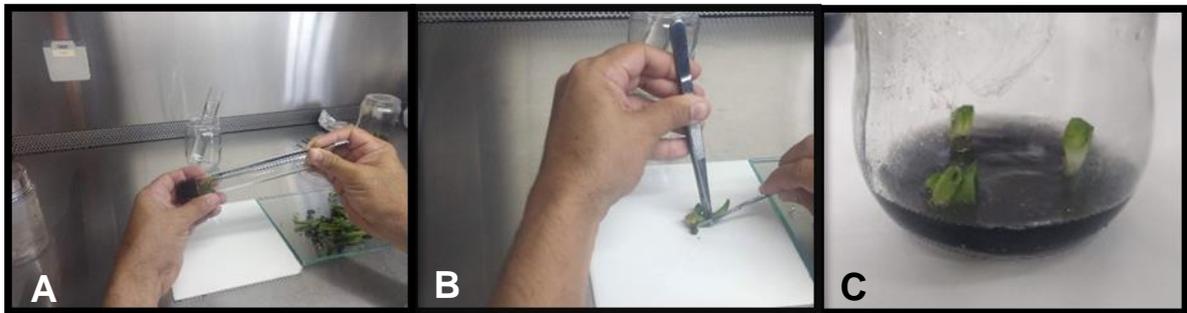


Fonte: arquivo próprio (2018)

As brotações das gemas axilares foram cultivadas por mais dois subcultivos com intervalos de 30 dias cada, em frascos de vidro contendo 20 mL do meio de cultura com a mesma composição descrita anteriormente, sem adição de reguladores, sendo inoculados em cada frasco três explantes (Figura 3). Nessa etapa não foi adicionada a auxina ANA e a citocinina BAP no meio nutritivo, visando inibir o efeito residual desses reguladores nas plantas, para avaliar o efeito do BAP no cultivo *in vitro* e na produção de metabolitos secundários pelas plantas de babosa.

A escolha pelo BAP se deu em função da sua ampla utilização em estudos de propagação *in vitro*, devido a sua atuação na divisão celular, indução na formação de gemas, indução no surgimento de novos brotos e, além disso, entre as citocininas, possui o menor custo financeiro (RAVEN, 2001; VICENTE; ALMEIDA; CARVALHO, 2009; LUDTKE, 2013).

Figura 3 – Subcultivo das brotações de *Aloe vera* oriundas da fase de estabelecimento *in vitro*: A) brotações das gemas axilares; B) subcultivadas; C) inoculadas em frascos de vidro contendo meio nutritivo e cultivadas por 30 dias sob condições controladas.



Fonte: arquivo próprio 2018

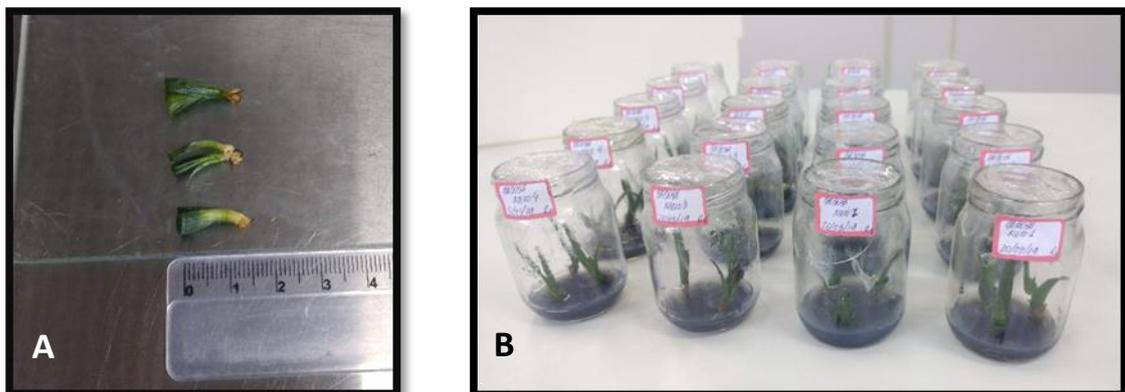
Esta pesquisa foi repetida em duas fases de experimentação, envolvendo explantes oriundos de duas épocas distintas de coleta, visando identificar se esse fator interferia no desenvolvimento das plantas *in vitro*, assim como na produção de metabolitos pelas mesmas, como ocorre nas plantas cultivadas sob condições de campo.

3.1.1 Experimento I: planta matriz coletada em dezembro de 2018

Neste experimento, brotos oriundos das matrizes coletadas em dezembro de 2018 e decorrentes do estabelecimento e realização de dois subcultivos, com aproximadamente 1,5 cm de tamanho (Figura 4A) foram inoculados em frascos de vidro contendo 20 mL do meio de cultura MS, suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de ANA, BAP nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado em 5,8. Os explantes foram cultivados *in vitro* sob condições controladas de temperatura (25° ± 1°C), fotoperíodo (16 horas) e intensidade luminosa (30 µmol m⁻² s⁻¹) durante 30 dias (Figura 4B), semelhante a etapa de estabelecimento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, representados por distintas concentrações de BAP. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental representada por um frasco contendo três explantes com aproximadamente 1,5 cm de tamanho. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram avaliadas quanto a suas características morfofisiológicas e perfil de compostos voláteis produzidos.

Figura 4 - Brotações de *Aloe vera* cultivadas *in vitro* em distintas concentrações de BAP: A) brotos das matrizes coletadas em dezembro de 2018 com aproximadamente 1,5 cm de tamanho; B) inoculados em frascos de vidro contendo meio de cultura com distintas concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), cultivadas durante 30 dias sob condições controladas.



Fonte: arquivo próprio (2019)

3.1.2 Experimento II e III: plantas coletadas em agosto de 2019

No segundo e terceiro experimentos, brotos provenientes das plantas matrizes coletadas em agosto de 2019 e oriundos da fase de estabelecimento após realização de dois subcultivos em meio de cultivo sem adição de fitorregulador, foram inoculados em frascos de vidro contendo 20 mL do meio de cultura MS, suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de ANA, BAP nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado em 5,8 .

Em relação ao primeiro experimento, estes foram repetidos em dois ambientes de cultivo com variação de temperatura e intensidade luminosa, como experimentos independentes:

- a) Experimento II: sala de crescimento com temperatura de 25^o±1^oC, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹ (Figura 5);
- b) Experimento III: BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) ou DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com temperatura de 30^o ± 1^oC, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹ (Figura 6).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, representados por distintas concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹). Foram utilizadas 4 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental representada por um frasco contendo três explantes com aproximadamente 1,5 cm de tamanho. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram avaliadas quanto a suas características morfofisiológicas e perfil de compostos voláteis produzidos.

Figura 5 – Brotações de *Aloe vera* oriundas das matrizes coletadas em agosto de 2019 cultivadas *in vitro* em distintas concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e ambiente de cultivo com temperatura de 25^o ± 1^oC, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.



Fonte: arquivo próprio (2019)

Figura 6 – Brotações de *Aloe vera* oriundas das matrizes coletadas em agosto de 2019 cultivadas *in vitro* em distintas concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), em estufa BOD com temperatura 30° ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹).



Fonte: arquivo próprio (2019)

3.2 AVALIAÇÃO MORFOFISIOLOGICA DAS PLANTAS DE *Aloe vera* CULTIVADAS *IN VITRO*

Completados 30 dias de cultivo *in vitro* dos brotos utilizados nos experimentos, foram avaliadas as seguintes características nas plantas oriundas dos diferentes tratamentos: altura de planta (AP), em cm, medida com auxílio de uma régua graduada e considerando-se da base do explante até a extremidade apical; número de brotos (NB); número de folhas verdes (NFV); presença de folhas senescentes (PFS) e presença de enraizamento (PR), visando identificar a concentração de BAP e a temperatura do ambiente de cultivo favoráveis ao cultivo *in vitro* de plantas de *A. vera*. Em seguida, foi comparado o resultado desta pesquisa com o valor da dose de BAP sugerida por CIANO (2018) em estudo sobre multiplicação *in vitro* de babosa.

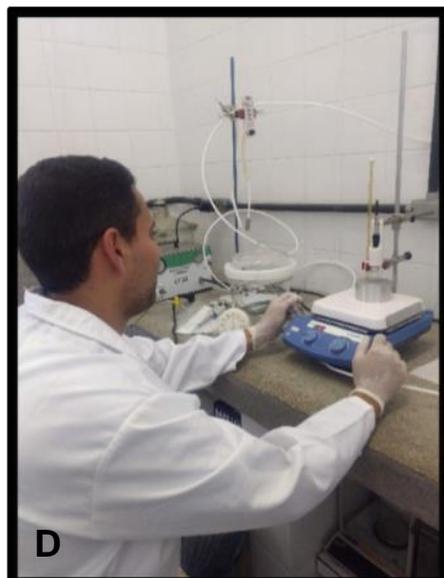
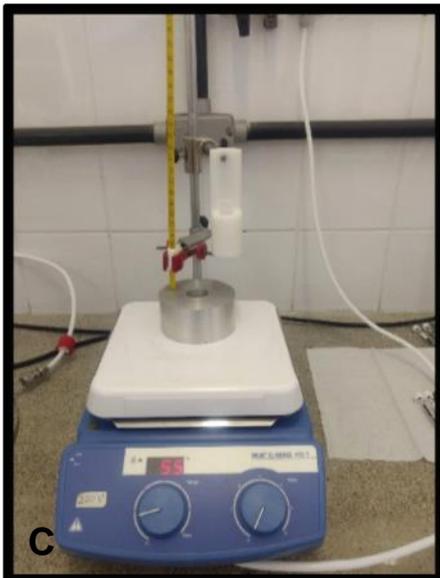
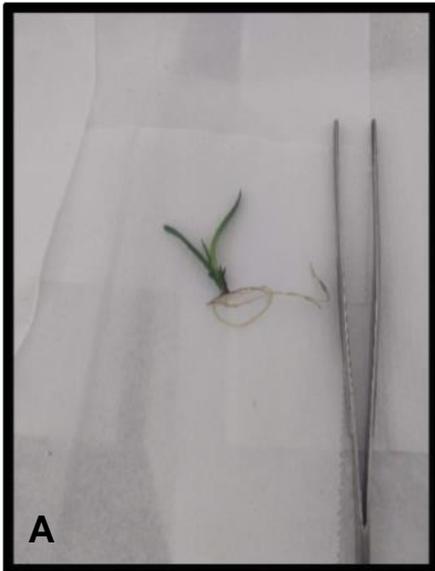
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados resultantes da avaliação morfofisiológica foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para as concentrações de BAP não foi possível o ajuste de modelos de regressão polinomial significativos e com alto R^2 . A variável NB foi transformada para $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da ANOVA. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018) utilizando o pacote ExpDes.pt: (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2018).

3.4 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DE *Aloe vera* L. CULTIVADAS *IN VITRO* E ATRAVÉS DE MÉTODO CONVENCIONAL DE CULTIVO

Através da técnica de microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME) os compostos orgânicos voláteis foram extraídos em condições de temperatura de 80 °C, 30 min de extração utilizando fibra do tipo CAR/PDMS/DVB a partir de 0,2 g de folha das plantas selecionadas (Figura 7), tanto nas plantas cultivadas *in vitro*, como também dos espécimes cultivados pelo método convencional de cultivo.

Figura 7 – Técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME) dos compostos orgânicos voláteis das plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*: A) explante a ser macerado com bastão de vidro; B) folha macerada e armazenada em recipiente lacrado; C) equipamento extrator em fase sólida (headspace); D) microextração em fase sólida com fibra CAR/PDMS/DVB.



Fonte: arquivo próprio (2019)

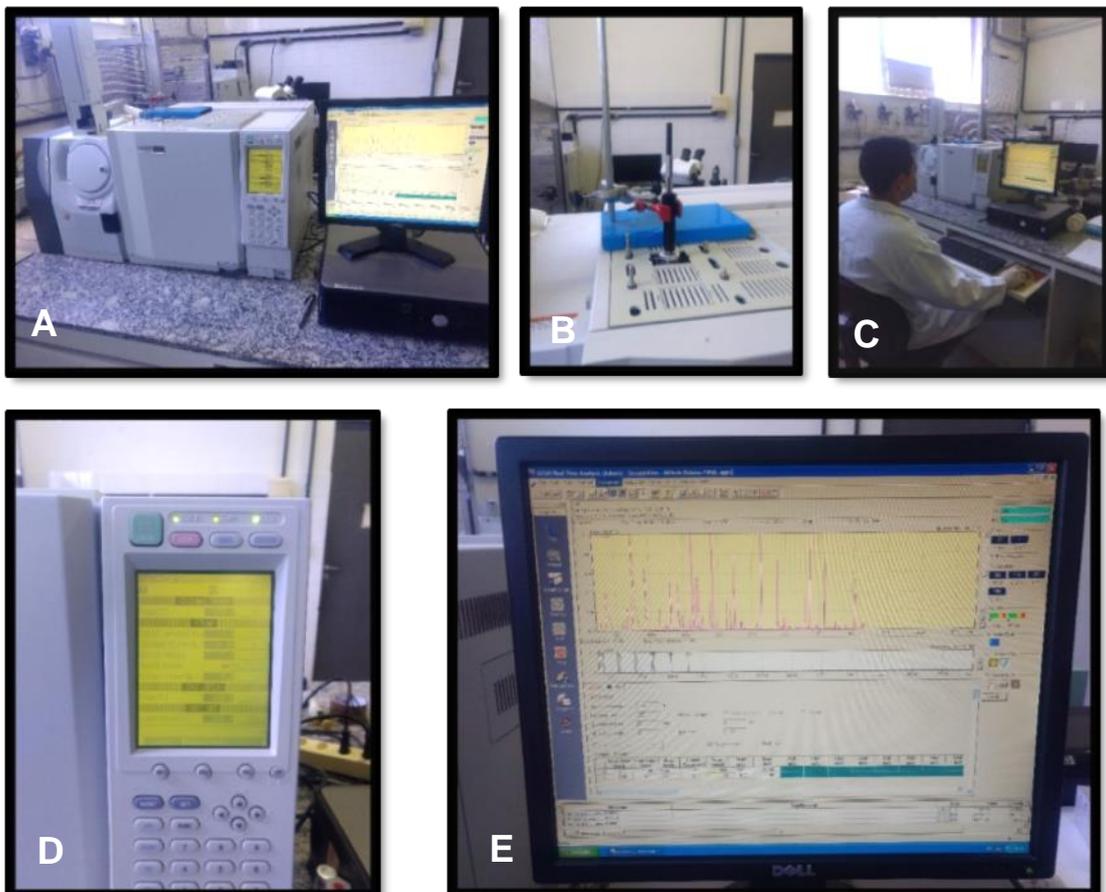
As plantas oriundas do cultivo convencional foram coletadas nas mesmas épocas e no mesmo local das plantas que foram utilizadas para o experimento do cultivo *in vitro*, mantendo o padrão genético em ambos os ensaios.

A fibra foi introduzida no injetor de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, Modelo QP2010 Plus, Shimadzu). Com isso, as separações dos compostos orgânicos voláteis (COV's) foram realizadas em uma

coluna DB-1MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). As injeções foram realizadas no modo *splitless*, gás arraste hélio com fluxo de 0,7 mL/min e velocidade linear constante de 30,2 cm/s, temperatura do injetor e temperatura da linha de transferência de 260 °C. Com programação do forno: temperatura inicial 40°C, rampa de aquecimento de 0,5 °C/min até 45 °C; 2,50 °C/min até 80 °C, em seguida 5 °C/min até 120 °C; 10 °C/min até 200 °C e, por fim, 20 °C/min até 280 °C, permanecendo por 2 min. Tempo total de corrida foi de 46,0 min (Figura 8).

A identificação dos compostos voláteis ocorreu por meio de espectrometria de massas, como também por um índice que expõe o comportamento de retenção dos compostos comparados ao de uma mistura de alcanos, índice este chamado de Kovats (COV's).

Figura 8 – Separação dos compostos voláteis das plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*: A) cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, Modelo QP2010 Plus, Shimadzu); B) separação dos COV's realizadas em coluna DB-1MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); C e D) programação do forno; E) tempo total de corrida de 46,0 min.



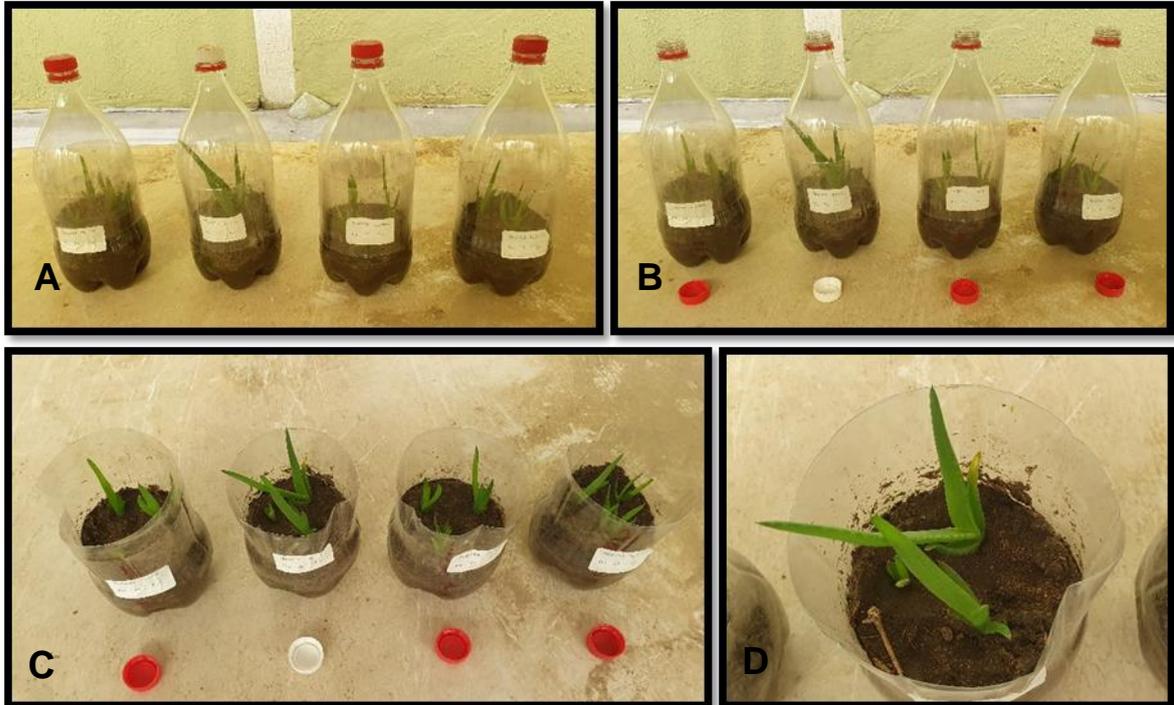
Fonte: arquivo próprio (2019)

3.5 ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS DE *Aloe vera*

As plantas de babosa oriundas do cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de BAP e que não foram utilizadas na etapa de análise química, foram aclimatizadas. Para isso, foram retiradas dos recipientes de cultivo *in vitro*, em seguida as raízes foram lavadas com água para remover o excesso do meio de cultura. Posteriormente, as plantas foram acondicionadas em garrafas plásticas transparentes PET, de dois litros, com furos em sua base para drenar o excesso de água. Essas garrafas foram cortadas no ponto médio de sua altura, facilitando adição de substrato (terra vegetal autoclavada) e transplante da muda, sendo fechadas posteriormente por sobreposição das metades cortadas (ALMEIDA et al., 2020).

As mudas foram expostas gradativamente ao meio externo retirando-se a tampa da garrafa por 10 minutos no primeiro dia, 20 min no segundo dia e assim sucessivamente, elevando-se o tempo de exposição em 10 min a cada dia, sendo mantidas em local sem incidência direta de luz solar, e com intuito de manter a umidade relativa do ar elevada as mudas eram irrigadas com auxílio de borrifador (VICENTE; ALMEIDA; CARVALHO, 2009; ALMEIDA et al., 2020). Quando as plantas estavam bem desenvolvidas, o recipiente foi aberto e as mesmas ficaram expostas permanentemente ao meio ambiente, ou seja, quando as mudas se apresentavam adaptadas ao meio externo. Dessa maneira, as plantas foram expostas ao meio ambiente de forma progressiva com objetivo de redução do estresse sobre essas plantas (Figura 9). Após 30 dias de aclimatização a porcentagem de sobrevivência das mudas foi avaliada.

Figura 9 – Processo de aclimatização das mudas de *A. vera* provenientes do cultivo *in vitro*: A) plantas acondicionadas em garrafas plásticas transparentes PET contendo terra vegetal autoclavada; B) retirada da tampa das garrafas por intervalos crescentes de tempo; C) remoção da parte superior das garrafas; D) após o desenvolvimento das plantas.



Fonte: arquivo próprio (2019)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO I: PLANTA MATRIZ COLETADA EM DEZEMBRO DE 2018

4.1.1 Análise morfofisiológica das plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP

A partir da análise de variância descrita na Tabela 1, é possível observar que a adição de BAP no cultivo *in vitro* das plantas de babosa provenientes da coleta em dezembro de 2018 promoveu uma resposta significativa apenas na característica número de brotos (NB), enquanto que para as variáveis altura das plantas (AP) e número de folhas verdes (NFV) as concentrações de BAP não apresentaram diferenças significativas, evidenciando a atividade das citocininas no estímulo de formação de brotações. Ainda em relação à Tabela 1, foi possível observar uma altura média das plantas de 3,51 cm, média de número de brotos de 0,80, e uma média de número de folhas verdes de 2,55.

Ao analisar o coeficiente de variância, este apresentou resultados de 14,56% à 31,41%, para as variáveis número de folhas verdes (NFV) e número de brotos (NB), respectivamente (Tabela 1), mostrando similaridade com pesquisa realizada por Pasa et al. (2012), com amoreira-preta, que relataram CV de 15,90% relacionado ao número de folhas verdes com utilização do fitorregulador BAP, demonstrando a influência desse hormônio sobre as características supracitadas, inibindo o desenvolvimento da altura de planta e estimulando formação de brotações.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.

FV	GL	QM		
		AP	NB	NFV
BAP	3	0,89 ^{ns}	0,44*	0,19 ^{ns}
Erro	16	0,41	0,11	0,14
CV (%)		18,32	31,41	14,56
Média Geral		3,51	0,80	2,55

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade.

Apesar de não existir influência entre as concentrações de BAP para AP e NFV, ao avaliarmos os valores médios do NB é possível observar que ocorreu maior brotação utilizando 1 mg L⁻¹ de BAP no meio nutritivo, com resultado inferior com a utilização de 3 mg L⁻¹ dessa citocinina (Tabela 2). Assim, existe concordância com os estudos de Vicente, Almeida e Carvalho (2009) utilizando a planta medicinal alumã quando avaliaram o cultivo *in vitro* de plantas medicinais em diferentes concentrações de BAP.

Tabela 2. Valores médios de altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	AP	NB	NFV
0	4,11 a	0,60 ab	2,27 a
1	3,20 a	1,73 a	2,60 a
2	3,24 a	0,53 ab	2,53 a
3	3,49 a	0,33 b	2,73 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estudo realizado por Danial et al. (2019) em plantas de *Aloe vera* utilizando os fitorreguladores BAP e ANA, relata que a AP é suprimida com a elevação nas concentrações desses reguladores de crescimento, com maior expressão desta característica morfofisiológica sem adição de BAP, assim como nesse experimento, porém sem diferenças estatísticas significativas. Por outro lado, para o NFV esses autores mencionam uma variação de 3,17 à 7,17, com maior expressão na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP, enquanto nessa pesquisa foi observado variação de 2,27 à 2,73, com maior expressão na concentração de 3,0 mg L⁻¹ de BAP, essa diferença pode ser atribuída ao padrão genético distinto entre as plantas matrizes utilizadas nos estudos.

Para NB esta pesquisa apresenta diferença significativa à desenvolvida por Danial et al. (2019), pois houve uma variação de 1,16 a 4,50 número de brotos, com maior valor observado na concentração de 3,0 mg L⁻¹ de BAP, enquanto neste estudo ocorreu 0,33 a 1,73 brotos por planta com maior número de brotos na

concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Contudo, ao observar estudo realizado por Camargo, Meneguzzi e Rufato (2020) em morangueiros a expressão de NB foi significativa em meio de cultura MS com 1,0 mg L⁻¹ BAP, favorecendo maior número de brotações, o que justifica à utilização das citocininas em micropropagação, com finalidade de quebra de dormência apical, potencializando um dos objetivos da propagação *in vitro*.

A porcentagem de folhas senescentes (PFS) apresentada pelas plantas foi baixa, independente da concentração de BAP utilizada (Tabela 3). Em estudo realizado por Ciano (2018) com o cultivo *in vitro* da babosa em diferentes concentrações de BAP, os resultados observados são semelhantes aos desta pesquisa, com poucas folhas senescentes nas plantas em todos os tratamentos, que também apresentaram PFS maior no tratamento sem a adição de BAP.

No que se refere a porcentagem de enraizamento (PR), os valores são bastante satisfatórios, com PR acima de 99% em todas as concentrações de BAP utilizadas (Tabela 3). Em concordância com o experimento realizado por Molsaghi, Moieni e Kahrizi (2014), quando utilizaram matrizes de *Aloe vera* em meio de cultura enriquecido com BAP e observaram taxas elevadas de enraizamento (próximas a 100%).

Tabela 3. Porcentagem de folhas senescentes (PFS) e de enraizamento (PR) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	Folhas senescentes (%)	Enraizamento (%)
0	6,66*	99,87
1	0,00	100,00
2	0,00	99,93
3	0,00	99,87

* As plantas apresentaram uma folha senescente.

4.1.2 Análise química das plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* e *in vivo*

Na Tabela 4 é possível observar que foram identificados 17 compostos orgânicos voláteis, onde 13 destes COV's apresentaram maior percentual nas plantas cultivadas *in vitro*, quando comparadas com a matriz *in vivo*. Contudo, ao se

comparar as plantas cultivadas em meio sem regulador de crescimento BAP e com a adição deste regulador, as substâncias de maior expressão foram o 2-hexenal (20,84% - 30,56%, 0,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), nonanal (9,22% - 10,98%, 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), 1-hexanol (8,55% - 9,28%, 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), 1-octanol (4,56% - 6,17%, 0,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), hexanal (4,25% - 6,46%, 0,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), benzaldeído (3,35% - 3,86%, 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), 2-etil-1-hexanol (1,78% - 7,07%, 2,0 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente) e 1-nonanol (1,42% - 4,82%, 2,0 e 0,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente).

Tabela 4. Tempo de retenção (RT/min) e compostos voláteis, analisados por HS-SPME-CG-MS, das plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹) durante 30 dias e das plantas cultivadas *in vivo*.

RT/min	Composto	0,0	1,0	2,0	Matriz <i>in vivo</i>
5.032	1-pentanol	0,29	0,70	0,95	2,43
5.834	Hexanal	4,25	5,66	6,46	4,16
7.449	2-hexenal	20,84	24,09	30,56	6,18
8.021	1-hexanol	8,55	9,28	9,09	0,00
11.333	benzaldeído	3,35	3,86	3,70	10,17
12.125	benzeno acetaldeído	1,10	1,01	0,94	0,72
14.087	2-etil-1-hexanol	2,24	7,07	1,78	1,41
15.220	2-octenal	0,79	0,84	0,64	0,43
15.742	1-octanol	4,56	5,74	6,17	2,45
16.865	beta-linalol	0,27	0,07	0,33	0,00
17.046	Nonanal	9,22	10,98	9,76	4,78
19.730	1-nonanol	4,82	2,19	1,42	0,84
20.181	Decanal	0,49	0,22	0,96	0,11
29.539	2-decanona	0,27	0,18	0,14	0,08
32.955	beta-ionona	1,41	0,79	0,47	0,67
46.571	2,4-dimeil-pentanal	0,30	0,08	0,03	0,93
47.859	1-hexadecanol	0,00	0,98	0,69	2,34

Contudo, na matriz *in vivo* os COV's de maior expressão foram benzaldeído (10,17%), 2-hexenal (6,18%), nonanal (4,78%), hexanal (4,16%), 1-octanol (2,45%), 1-pentanol (2,43%), 1-hexadecanol (2,34%) e 2-etil-1-hexanol (1,41%). Também foi possível observar que os compostos 1-hexanol e beta-linalol só foram evidenciados em plantas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS com ou sem adição de BAP (Tabela 4).

Ao analisar os COV's das plantas é possível observar que quatro deles: 1-pentanal, benzaldeído, 2,4-dimeil-pentanal, 1-hexadecanol, apresentaram maior porcentagem na matriz *in vivo* em comparação com as plantas oriundas do cultivo *in vitro* (Tabela 4), podendo estar relacionado a inibição destes pelo fitorregulador. Enquanto os treze compostos restantes: hexanal, 2-hexanal, 1-hexanol, benzeno-acetaldeído, 2-etil-2-hexanol, 2-octenal, 1-octanol, beta-linalol, nonanal, 1-nonanol, decanal, 2-decanona, beta-ionona, apresentaram maiores valores de porcentagens em plantas provenientes do cultivo *in vitro* (Tabela 4).

Ao analisar os diferentes tratamentos com e sem a presença de BAP, é possível inferir que ao menos 5 compostos expressaram diminuição (>0,10%) da sua concentração quando foi adicionado BAP ao meio de cultivo, em comparação ao meio MS sem o regulador, demonstrando entre eles concentrações de benzeno acetaldéido de 1,10%, 1-nonanol de 4,82%, 2-decanona de 0,27%, beta-ionona de 1,41% e 2,4-dimetil-pentanal de 0,30% da matéria total de COV's detectados no experimento.

Observando os compostos voláteis que apresentam maiores valores nas plantas oriundas do cultivo *in vitro*, em comparação com a matriz *in vivo*, hexanal, 1-hexanal, 2-hexanol, 2-etil-1-hexanol e nonanal são utilizados como solventes pelas indústrias (OMORI; PORTAS; OLIVEIRA, 2012).

Em relação à atividade farmacológica do benzaldeído, em estudo realizado por Tresvenzol et al. (2009) foi possível observar a atividade antimicrobiana em diversas cepas de microrganismos desse composto. Como também em pesquisa realizada por Vieira et al. (2010) foi possível relatar que este composto possui atividades anticonvulsivante, analgésica e anti-inflamatória.

Outro composto que merece atenção é a beta-ionona que apresentou expressão em plantas cultivadas em meio MS sem adição de BAP, bem como em comparação com a planta matriz. Em pesquisa realizada sobre suas atividades

farmacológicas foi possível avaliar suas características anticancerígenas e hepáticas favoráveis (FREITAS, 2013).

Assim como descrito anteriormente, algumas substâncias encontradas em menores percentuais entre os COV's, também merecem destaque, como é o caso do beta-linalol que apresenta características antibacterianas e antifúngicas por sua capacidade de inibir o crescimento destes microrganismos como relatado por Sellami et al. (2009), Arrebola, Sivakumar e Korsten (2010) e Park et al. (2015), evidenciando sua capacidade antibiótica e importância farmacêutica. Contudo, a capacidade antimicrobiana do linalol apresenta alterações no padrão de resposta quando ele é testado isoladamente ou na presença de outros compostos (JUIZ et al, 2016).

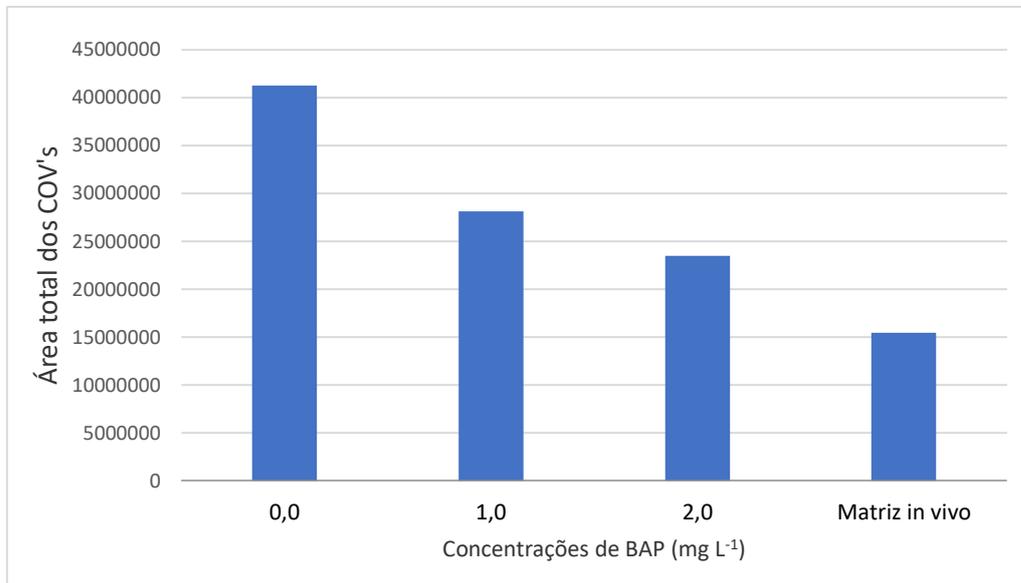
Ainda sobre os compostos fenólicos linalol e iononi, em experimento realizado por Ogunwanda et al. (2018) utilizando óleos essenciais de plantas de *Bougainvillea glabra*, observaram a capacidade que a associação destes compostos presentes no óleo essencial, possuem para expressar suas características farmacológicas anti-inflamatórias e anti-nociceptivas com resultados bastante efetivos.

Portanto, ao analisar as substâncias detectadas nesse experimento (terpenos e derivados deste) é possível descrever que a maior parte destes compostos possui estudos promissores quanto a suas propriedades farmacológicas. Em ensaio realizado por Ferreira (2018), utilizando a *Cordia sessilis* como base para extração de compostos voláteis, observou que os COV's terpenóides apresentaram propriedades de interesse farmacêutico como: atividades antibióticas, antifúngica, redutora de radicais livres e inibidora enzimática.

Outro composto que apresentou expressão significativa entre os COV's foi o nonanal, um aldeído que em estudo realizado por Zavala-Sánchez et al (2002) em plantas de *Astemisia ludoviciana* analisaram sua atividade antidiarréica com resultados muito satisfatórios.

A análise da área total de compostos orgânicos voláteis (COV's) presentes nas plantas de babosa cultivadas *in vitro* promoveu aumento significativo na produção dos COV's quando comparado ao cultivo *in vivo*, porém a utilização do fitorregulador BAP não proporcionou aumento significativo na produção de metabólitos secundários voláteis, assim como o aumento nas concentrações de BAP propostas neste estudo tem ação antagonista à produção dos COV's como observado na Figura 10.

Figura 10 – Área total dos compostos voláteis observados nas plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹) durante 30 dias e das plantas cultivadas *in vivo*.



É importante ressaltar que os compostos voláteis, assim como a área total dos compostos das plantas cultivadas em meio de cultura contendo 3,0 mg L⁻¹ de BAP não foram apresentados na Tabela 4 e Figura 10, pois durante a análise dessas plantas ocorreu um problema no aparelho, que logo em seguida foi danificado, provocando a perda de todas as parcelas oriundas desse tratamento.

4.2 EXPERIMENTO II: PLANTA MATRIZ COLETADA EM AGOSTO DE 2019

4.2.1 Análise morfofisiológica das plantas de *Aloe vera* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP

O segundo experimento, com as plantas coletadas em agosto de 2019, apresentou resultado semelhante ao primeiro ensaio experimental para as características AP e NFV, as quais não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de BAP utilizadas no meio nutritivo, diferindo do primeiro experimento apenas em relação ao número de brotos (Tabelas 5 e 6). Entretanto, os valores médios das variáveis AP e NB foram bem próximos em ambos os experimentos I e

II, com valores médios maiores para a característica NFV no experimento II (Tabelas 2 e 6).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.

FV	GL	QM		
		AP	NB	NFV
BAP	3	0,05 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,97 ^{ns}
Erro	12	0,42	0,07	0,90
CV (%)		21,21	28,94	17,96
Média Geral		3,01	0,50	5,25

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 6. Valores médios de altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	AP	NB	NFV
0	3,18 a	0,50 a	5,67 a
1	3,03 a	0,50 a	5,75 a
2	2,92 a	0,25 a	4,75 a
3	3,03 a	0,42 a	5,00 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tais resultados corroboram com pesquisa realizada por Pasqual et al. (2008), que avaliaram a resposta do abacaxizeiro à distintas concentrações de BAP no meio de cultura, e observaram que a adição desse fitorregulador não promove diferenças morfofisiológico nas mudas de abacaxizeiro em comparação ao meio de cultura sem adição dessa citocinina.

Contudo, em experimento realizado por Perez-Alonso et al. (2015) com plantas de babosa foi possível inferir que ausência ou concentrações elevadas do fitorregulador BAP tende a interferir negativamente nas características morfofisiológicas das mudas, inibindo a expressão das mesmas.

Nessa segunda fase da pesquisa, avaliando os dados obtidos quanto à porcentagem de folhas senescentes (PFS) nas plantas, foi possível observar valores maiores do que os apresentados nas plantas do primeiro experimento em todas as concentrações de BAP (Tabelas 3 e 7), mostrando a provável influência que o meio externo exerce sobre o padrão genético das plantas.

Tabela 7. Porcentagem de folhas senescentes (PFS) e de enraizamento (PR) de plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias.

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	Folhas senescentes (%)	Enraizamento (%)
0	50,00*	100,00
1	33,33*	100,00
2	25,00**	100,00
3	66,67**	91,67

* As plantas apresentaram uma folha senescente. ** As plantas apresentaram uma ou duas folhas senescentes.

Em estudo realizado por Ciano (2018) com o cultivo *in vitro* da babosa em diferentes concentrações de BAP, os resultados observados em sua pesquisa foram distintos aos deste trabalho, com porcentagem de folhas senescentes maior em plantas cultivadas em meio de cultura sem a adição de BAP, enquanto neste experimento foi mais evidente no 4º tratamento (3 mg L⁻¹ de BAP).

Assim como na primeira fase do estudo, as plantas apresentaram elevados valores de porcentagem de enraizamento (PR), com 100% de plantas enraizadas quando cultivadas *in vitro* na ausência e presença de BAP no meio nutritivo, exceto na concentração de 3 mg L⁻¹ que proporcionou 91,67% de enraizamento nas plantas (Tabela 7), sendo extremamente favorável para a fase posterior de aclimatização, assim como, fica evidente o papel da adição da auxina (ANA), para estimular enraizamento, ao meio de cultivo.

4.2.2 Análise química das plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* e *in vivo*

É possível observar na Tabela 8, como ocorreu na primeira fase de avaliação do perfil de metabolitos secundários, que foram identificados 17 COVs, e destes, 10

apresentaram maior expressão no experimento *in vitro*, e sete apresentaram maior percentual na matriz *in vivo*.

Na análise da expressão nas plantas de cultivo *in vitro*, comparando as plantas cultivadas em meio sem BAP e com a adição deste regulador, estão entre os compostos mais expressivos temos, 2-hexanal (5,38% - 39,25%, 3,0 e 0,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), 1-hexanol (6,76% - 13,20%, 1,0 e 0,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), hexanal (1,95% - 5,48%, 3,0 e 0,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), 2-etil-1-hexanol (2,20% - 5,93%, 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente), nonanal (2,27% - 2,90%, 1,0 e 0,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente) e benzaldeído (1,52% - 2,90%, 1,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente).

Tabela 8. Tempo de retenção (RT/min) e compostos voláteis, analisados por HS-SPME-CG-MS, das plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹) durante 30 dias e das plantas cultivadas *in vivo*.

RT/min	Composto	0,0	1,0	2,0	3,0	Matriz <i>in vivo</i>
5.032	1-pentanol	0,84	1,27	1,96	2,83	3,33
5.834	Hexanal	5,48	2,26	2,31	1,95	4,96
7.449	2-hexenal	39,25	21,43	11,42	5,38	3,11
8.021	1-hexanol	13,20	6,76	8,32	8,87	0,00
11.333	Benzaldeído	2,32	1,52	1,94	2,90	15,87
12.125	benzeno acetaldeído	0,44	0,28	0,29	0,59	0,80
14.087	2-etil-1-hexanol	4,97	2,70	2,20	5,93	1,13
15.220	2-octenal	0,49	0,32	0,37	0,40	0,35
15.742	1-octanol	0,71	0,67	0,73	0,89	0,89
16.865	beta-linalol	0,44	0,36	0,87	0,43	0,00
17.046	Nonanal	2,62	2,27	2,90	2,35	6,31
19.730	1-nonanol	2,64	1,17	1,13	0,69	0,53
20.181	Decanal	0,02	0,00	0,02	0,05	0,06
29.539	2-decanona	0,20	0,06	0,15	0,12	0,10
32.955	beta-ionona	1,41	1,19	0,92	1,22	0,80
46.571	2,4-dimeil-pentanal	0,14	0,11	0,15	0,16	0,61
47.859	1-hexadecanol	0,80	1,33	1,78	1,40	1,97

No entanto, na matriz *in vivo* os sete COV's de maior expressão foram benzaldeído (15,87%), nonanal (6,31%), hexanal (4,96%), 1-pentanal (3,33%), 2-hexanal (3,11%), 1-hexadecanol (1,97%) e 2-etil-1-hexanol (1,13%). Assim como ocorreu nas plantas do primeiro experimento, foi possível observar nas plantas do experimento II que os compostos 1-hexanol e beta-linalol só foram evidenciados em plantas provenientes do cultivo *in vitro* em meio nutritivo com ou sem adição de BAP (Tabela 8).

Assim, nos COV's encontrados nas plantas do experimento II, é possível observar que sete deles: 1-pentanol, benzaldeído, benzeno-acetaldeído, nonanal, decanal, 2,4-dimeil-pentanal, 1-hexadecanol, apresentaram maior porcentagem na matriz *in vivo* em comparação com as plantas provenientes do cultivo *in vitro*. Enquanto os outros dez compostos: hexanal, 2-hexanal, 1-hexanol, 2-etil-2-hexanol, 2-octenal, 1-octanol, beta-linalol, 1-nonanol, 2-decanona, beta-ionona, apresentaram maiores valores de porcentagens em plantas que foram cultivadas *in vitro* (Tabela 8).

Como também, após análise dos diferentes tratamentos com e sem BAP, é possível inferir que ao menos seis compostos apresentaram diminuição significativa (>0,10%) da sua concentração quando foi adicionado BAP ao meio de cultivo, em comparação ao meio MS sem o regulador, promovendo concentrações nestes compostos de: hexanal (5,48%); 2-hexenal (39,25%); 1-hexanol (13,20%); 1-nonanol (2,64%); 2-decanona (0,20%); beta-ionone (1,41%).

Como no primeiro experimento, dois compostos merecem destaque pelas suas propriedades farmacológicas, beta-ionona e beta linalol que apresentaram expressão baixa na matriz *in vivo* no presente estudo. As atividades terapêuticas destas substâncias são de grande importância para a área da saúde, como relatado em literatura e descrito neste trabalho, o que justificaria a realização da propagação *in vitro* desta planta para estimular a produção destes metabólitos em maiores concentrações que as plantas cultivadas *in vivo*.

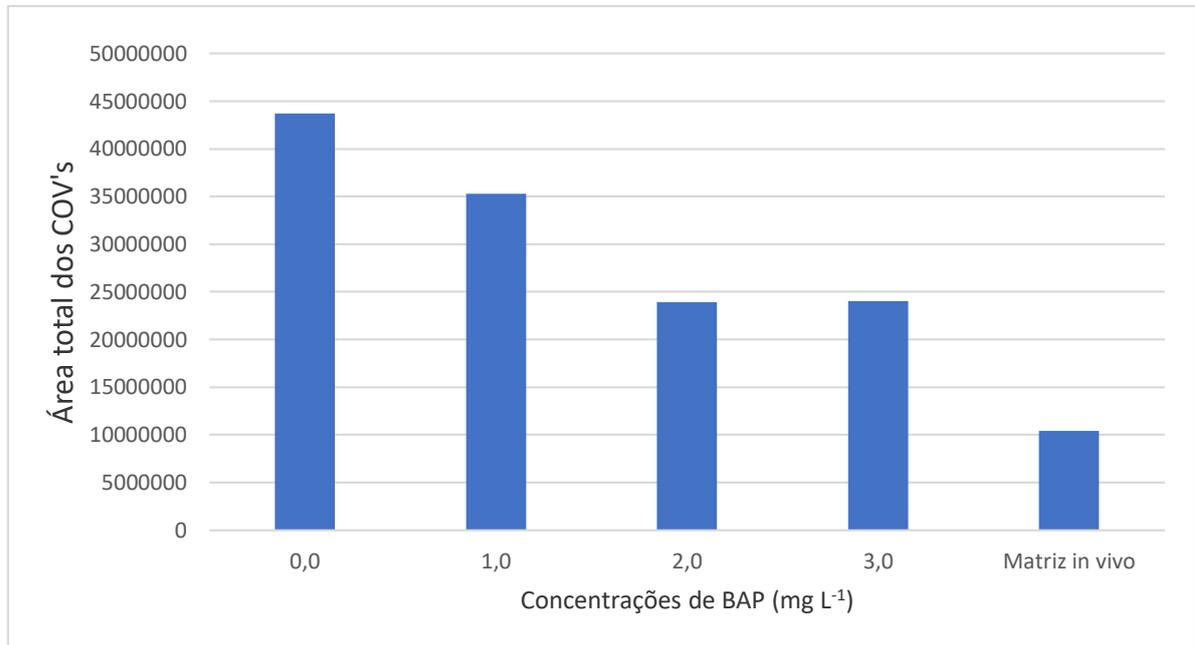
Outro composto que também merece atenção é o benzaldeído que apresentou alto percentual no cultivo *in vivo*, pois possui propriedades farmacológicas de grande importância para área da saúde como atividade anticonvulsivante, analgésica e anti-inflamatória. Visto que, estudos realizados por Vieira et al. (2010) em seres vivos, utilizando o benzaldeído em composição com a semicarbazona inibiu a resposta nociceptiva primária e secundária, tendo ação

comparada a analgésicos opioides e antidepressivos, assim como a atividade anti-inflamatória.

Portanto, os resultados deste trabalho mostram que ocorreu variação na composição dos compostos voláteis nas plantas *in vitro* e na matriz *in vivo*, em função da época em que as plantas foram coletadas. Isso foi relatado por Neto e Lopes (2007), quando afirmaram que o período do ano que a planta é coletada é um dos fatores de maior importância na composição dos compostos secundários, uma vez que a quantidade, bem como a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. Esses autores mencionaram variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos, em estudos realizados em plantas medicinais.

Semelhante ao que foi observado no primeiro experimento, no que se refere a área total de compostos orgânicos voláteis (COV's) presentes nas plantas de babosa cultivadas *in vitro* em cada tratamento, é possível destacar que a utilização da citocinina BAP não promoveu aumento significativo na produção de metabólitos secundários. Além disso, o aumento nas concentrações de BAP provocou redução da área total dos COV's (Figura 11). No entanto, a área total dos COV's nas plantas cultivadas *in vitro* foi maior que a área observada na matriz *in vivo*.

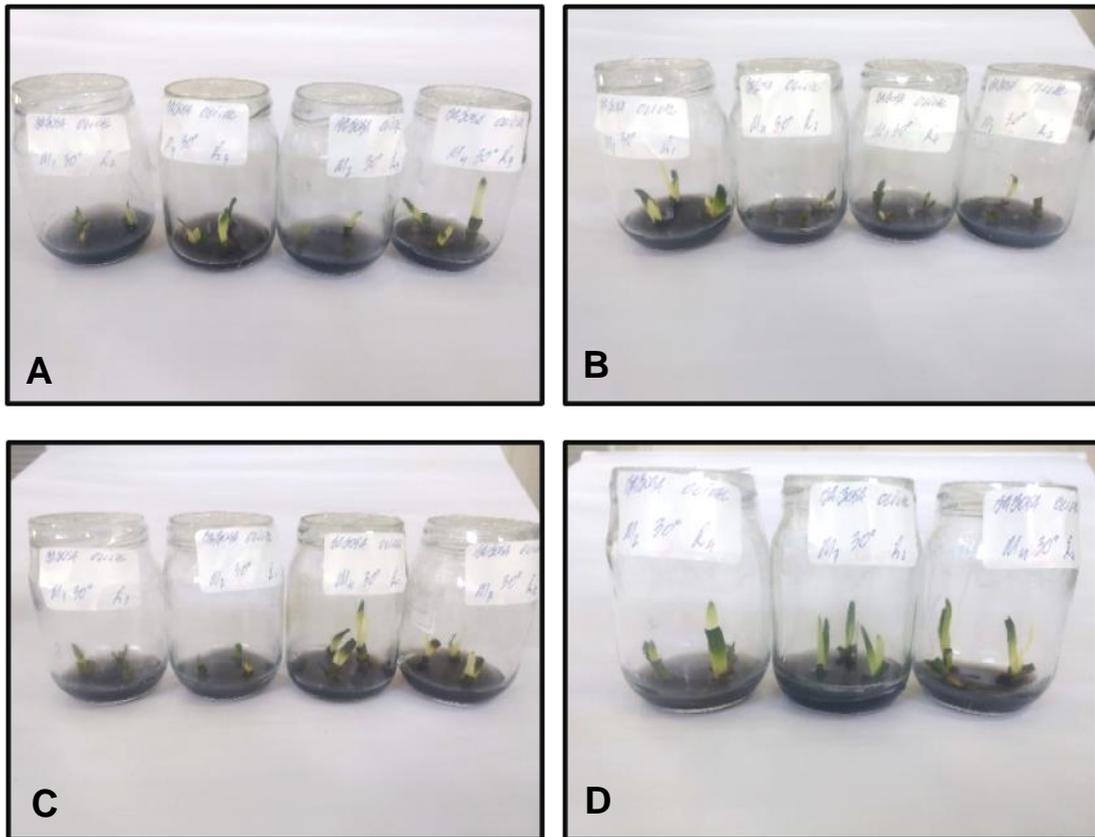
Figura 11 - Área total dos compostos voláteis observados nas plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e diferentes concentrações de BAP ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$) durante 30 dias e das plantas cultivadas *in vivo*.



4.3 EXPERIMENTO III: PLANTA MATRIZ COLETADA EM AGOSTO DE 2019

O cultivo *in vitro* em BOD com temperatura de 30°C e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ afetou negativamente a capacidade regenerativa e o desenvolvimento dos explantes de *Aloe vera*, impossibilitando a obtenção de plantas com características morfofisiológicas satisfatórias, como exemplo de folhas verdes, para garantir a viabilidade e vigor das plantas após o período de cultivo *in vitro* (Figura 13). Nesse sentido, a temperatura de 30°C associada com a intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ não é indicada para estudos de cultivo *in vitro* da babosa, visando a produção de mudas com características morfofisiológicas satisfatórias e maior produção de compostos voláteis nas plantas.

Figura 12 - Plantas de *A. vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante 30 dias em BOD com temperatura $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$: A, B, C e D) plantas cultivadas na ausência e presença de BAP ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, $3,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente).



Fonte: arquivo próprio (2020)

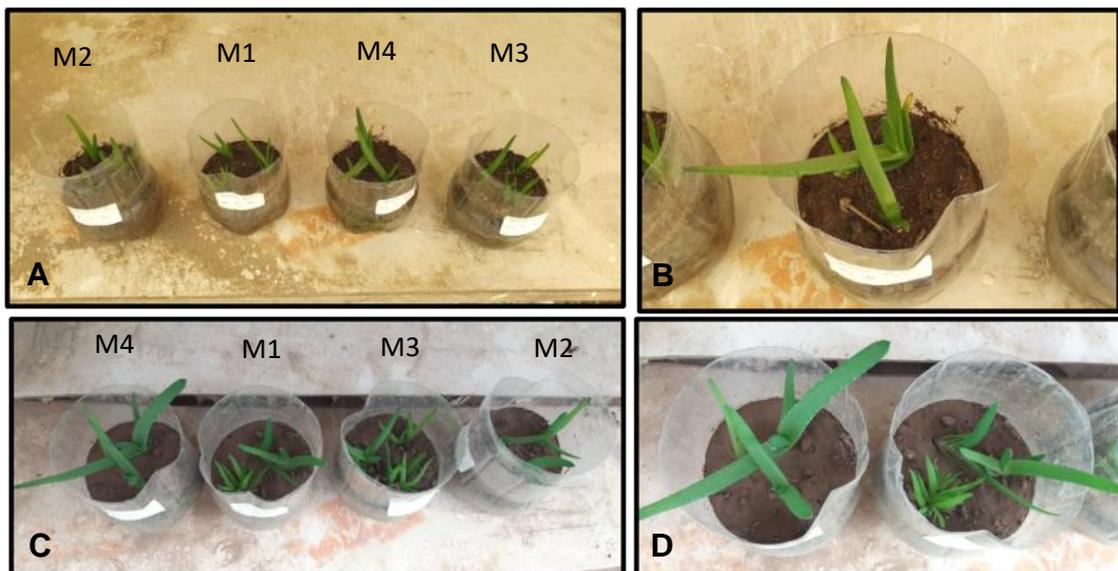
4.4 ACLIMATIZAÇÃO DAS PLANTAS DE *Aloe vera* L.

Na etapa de aclimatização das plantas que foram cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP, que não passaram pela análise química (fase destrutiva), foi possível observar 100% de sobrevivência das plantas independente da concentração de citocina utilizada no cultivo *in vitro* (Figura 12). Da mesma maneira, em estudo com a planta medicinal alumã e utilizando metodologia semelhante de aclimatização, Vicente, Almeida e Carvalho (2009) relataram 100% de sobrevivência das plantas e bom desenvolvimento durante o processo de aclimatização, independente da concentração de BAP utilizada.

Em pesquisa realizada por Oliveira et al. (2009) em plantas de babosa, com metodologia semelhante a esse experimento, obtiveram uma taxa acima de 95% de

sucesso na aclimatização das mudas. Contudo, também em *Aloe vera*, estudo realizado por Oliveira (2007) com metodologia diferente de aclimatização alcançou porcentagens elevadas de sobrevivência das plantas após a aclimatização, entretanto valores bem inferiores a 100%.

Figura 13 – Plantas de *Aloe vera*, provenientes do cultivo *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0,0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹, 3,0mg L⁻¹, respectivamente): A e B) 30 dias da etapa de aclimatização; C e D) 120 dias de aclimatização.



Fonte: arquivo próprio (2020)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da avaliação das características morfofisiológicas, é possível inferir que a utilização da citocinina BAP no meio de cultura MS nas concentrações e condições avaliadas neste estudo não promoveu resultados significativos que indique a utilização desse regulador de crescimento em estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de *Aloe vera*, objetivando a produção de mudas em larga escala. No entanto, a partir deste trabalho ficou evidente que plantas de babosa cultivadas *in vitro* apresentam maior produção de compostos voláteis, e por consequência, maiores concentrações de princípios com atividades farmacológicas, quando comparado com as plantas cultivadas sob condições de campo. Além disso, nas plantas submetidas ao cultivo *in vitro*, as substâncias de interesse farmacológico para utilização na área da saúde apresentam alterações consideráveis (benzaldeído, beta-linalol, beta-ionona) entre os compostos voláteis detectados.

Nesse sentido, sugere-se a realização de pesquisas envolvendo a utilização de outras citocininas em condições de cultivo *in vitro*, para o ajuste de protocolo que proporcione de forma eficiente a propagação clonal *in vitro* em larga escala e favoreça a produção de compostos voláteis em babosa, assim como em outras plantas de interesse da indústria farmacêutica, diminuindo a necessidade de retirada de plantas do meio ambiente.

Por fim, este estudo pode ser utilizado como base para estabelecimento de protocolos de cultivo *in vitro* de plantas medicinais, visando, além dos aspectos mencionados, avaliar a atividade farmacológica das plantas em organismos vivos (a exemplo do controle da dor, controle anti-inflamatório e controle microbiano), visto que a ação dos compostos voláteis possui atuação em sinergismo, e a concentração isolada de cada composto presente nas plantas medicinais pode não influenciar positivamente na sua resposta farmacológica.

REFERÊNCIAS

AHP - releases monograph standards for aloe vera leaf, aloe vera leaf juice, aloe vera inner leaf juice (Aloe vera (L.) Burm f.). In: **Scotts Valley, CA: American Herbal Pharmacopoeia**. 18 Dec. 2012. Press release.

Disponível em: < www.herbal-ahp.org/news.htm>. Acesso em: 22 out 2018.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v.28, p.13-19, 1993.

ALMEIDA, L. V. da S. et al. *Vernonia condensata* Baker: an alternative for large-scale seedling production. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 50, n. 3, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782020000300201&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 06 Abr. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180941>.

ALVES, H.; MACHADO, M. T.; NORONHA, W. A. M. N. Análise quantitativa do processo de cicatrização cirúrgica de ratos tratados com extrato de Musa Sapientum, Aloe Vera, Colgenase e Placebo. **Revista Ciências em Saúde**. v.1, n 2, jun 2011.

ARO, A. A. **Efeito dos extratos de Aloe vera e Arrabidaea chica sobre a cicatrização do tendão calcâneo de ratos após transecção parcial**. Campinas, 2012. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2012.

ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L. Efeito de compostos voláteis produzidos por cepas de *Bacillus* na decomposição pós-colheita em citros. **Biological Control**, Orlando, v.53, p.122-128, abril de 2010.

ASSIS, A.F.S. et al. Determinação do teor de metais em chás de plantas medicinais. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.11 n.21; p.3396, 2015.

BACH, D. B.; LOPES, M. A. Estudo da Viabilidade Econômica do Cultivo da Babosa (*Aloe vera L.*). **Ciências Agrotécnicas, Lavras**, v. 31, n. 4, p. 1136-1144, jul./ago., 2007

BALANDRIN, M. F. et al. Natural plantchemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1154-1160, 1985.

BAUTISTA-PÉREZ, R.; SEGURA-COBOS, D.; VÁSQUEZ-CRUZ, B. *In vitro* antibradykinin activity of Aloe barbadensis gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 89-92, 2004.

BERRIOS, E. M. **Estudio histológico de la evolución de la cicatrización alveolar entre un apósito experimental a base de Crotons sp más propolis, y Crotons sp más Alvogyl em la gomorfos**. Tesis Bachiller. Universidad de San Martín de Porres. Facultad de Odontología. Perú 2004.

BONE, K., MILLS, S. **Principles and Practice of Phytotherapy**. 3.edicion, Ed. Elsevier Ltd, 2013.

BOONYAGUL, S. et al. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. **Odontology**, 2012.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. Perspectivas para o uso de extratos de plantas para o controle do carrapato de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 89-96, abr/jun. 2011.

BRAMLEY, M. Isoprenoid Metabolism. **Plant Biochemistry**, p 417-437, 1997.

BRASIL. Decreto N. 6.040, de 7 de Fevereiro de 2007. Institui a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável dos Povos e Comunidades Tradicionais. Brasília, 7 de fevereiro de 2007.

BRYANT, J.; TIITTO, J. R. Ontogenetic development of chemical defense by seeding resin birch: Energy cost of defense production. **Jornal of Chemical Ecology**. 21: 833-896, 1995.

CABRAL, G.B. et al. **Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria sp.*** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

CAGNI, T. F.; LUBI, N. ALOE VERA NO REPARO TECIDUAL. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**. Curitiba, n. 20, maio-ago. p. 33-42. 2018.

CALIXTO, J. B. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33, 179, 2000.

CAMARGO, S. S.; MENEGUZZI, A.; RUFATO, L. Cultivo *in vitro* do cultivar italiano de morangueiro Pircinque. **Acta Biológica Catarinense**, Jan-Mar;7(1):57-74, 2020.

CAMPO, F.; SANZ, S.; HERNANDEZ, L. Laboratory avançada of Plant Physiology, **Módulo de cultura *in vitro***. 2007. Disponível em <https://www.uam.es/docencia/LAVanFis/guiones/guionCI200607.pdf>. Acesso em 05/01/2019.

CARVALHO, J.C.T. **Formulário Médico Farmacêutico de Fitoterapia**. 2.ed. Editora pharmabooks, 404p, 2005.

CHANTARAWARATIT, P.; SANGVANICH, P.; THUNYAKITPISAL, P. Acemannan Stimulates Bone Sialoprotein, Osteocalcin, Osteopontin and Osteonectin Expression in Periodontal Ligament Cells *in Vitro*. **Journal Dental Association**, 63(2), 92-102, 2013.

CHINCHILLA, N. et al. Aloe barbadensis: how a miraculous plant becomes reality. **Phytochemistry Research**, v. 12, n. 4, p.581-602, Dec. 2013.

Disponível em: <DOI 10.1007/s11101-013-9323-3>. Acesso 10 out 2018.

CHITHRA, C.; SAJITHLAL, G.; CHANDRAKASAN, G. Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 59, 195-201, 1998.

CHO I, C.W. et al. The Wound-Healing Effect of A Glycoprotein Fraction Isolated From Aloe Vera. **British journal of dermatology**, v.145, n.4, p.535-45, 2001.

CIANO, G.S. O. S. **Multiplicação *in vitro* de planta medicinalde interesse ao SUS: Aloe vera L.** Dissertação, Faculdade Maria Milza, 2018.

COASTS, B. C.; AHOLA R. Aloe vera the silent healer - a modern study of Aloe vera. **Fideli Publishing Inc.**, Martinsville, Indiana, 2010.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. **Dictionary of Terpenoids**. Vol 3, 2001.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**. Volume 1, Número 2 (mai./ago) pp: 175-181, 2016.

CUNHA, A. P. da.; ROQUE, O. **Plantas medicinais da Farmacopeia Portuguesa: Constituintes, Controlo, Farmacologia e Utilização**. Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª ed., 2011.

DANIAL, G. H. et al. RAPID PROTOCOL OF Aloe vera In Vitro propagation. **Iraqi Journal of Agricultural Sciences** –50(5):1377-1382, 2019.

DAVIS, R.H. et al. Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v.84, n.2, p.77-81, 1994.

DOMINGUEZ, I. R. et al. Benefício del Aloe Vera L. em lasafecciones de lapiel. **Revista Cubana Enfermagem**. 2(3): 1-4, 2006.

EINSERT, J.W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, v.17, p.190- 201, 1991.

ESUA, M. F.; RAUWALD, J. W. Novel bioactive maloyl glucans from aloe vera gel: isolation, structure elucidation and *in vitro* bioassays. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 355–364, 2006.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**, 14th ed., WB Saunders Company: London, 1996, cap. 7.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**. São Paulo - SP, BR. Vol. 39, N° 2, p. 120-130, maio 2017.

FEMENIA, A. et al. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v.39, n.2, p.109-117, 1999.

FERREIRA, A. E. A. **Atividade Biológica e Caracterização de Compostos Presentes nas Folhas e Cascas de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze**. Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes.pt: **Pacote Experimental Designs** (Portuguese). R package version 1.2.0. 2018.

FIDELIS, I. et al. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de . Desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 2, p. 327-336, 2000.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de b-Ecdisona em *Pfaffiaglomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 169 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Mediciniais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**, Viçosa, 2012.

FREITAS, L. B. N. **Efeito Protetor Do Serquiterpenoide Beta-Ionona Na Lesão Gástrica Induzida Por Etanol Em Camundongos: Envolvimento Da Via No/Gmpc/K_{atp} E Da Glutathiona**. Dissertação. Universidade Federal do Ceará. 2013.

FREITAS, V.S.; RODRIGUES, R.A.F.; GASPI, F.O.G. Propriedades farmacológicas da *Aloe vera* (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, p.299-307, 2014.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em culturas de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Taberneamontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(4): 627-641, Out./Dez. 2008.

GARCILIA, R. A Propagação de Plantas *In-vitro*, A Biotecnológico Sucesso. revista **Outreach Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**. 2015. Disponível em:<<http://www.sabermas.umich.mx/archivo/secciones-antteriores/articulos/75numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exitobiotecnologico.html>>.Acessadoem 05/01/2019

GEORGE, F. Plant propagation by tissue culture: the technology. **Dordrecht: Springer**, 1993. 574p.

GERSHENZON, J. Changes in the production of plant secundar metabolites under water and nutrientes stress. **Plenum Press**, New York, 1984.

GRYNDLAY, D.; REYNOLDS, T. The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **Journal of Ethnopharmacology**. 1986; 16 (3): 117-51, 1986.

HAMMAN, J. H. Composition and Applications of Aloe vera Leaf Gel. **Molecules**, v. 13, p. 1599-1616, 2008.

HARBORNE, J. B. Biochemical plant ecology. **Plant Biochemistry**, p, 503-516, 1997.

_____. Recent Advances in the Ecological chemistry of plant terpenoids. **Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids**, p 399-426, 1991.

_____. Introduction to Ecological Biochemistry. **Academic Press**, London, 1988.

_____. Plant Phenolics. **Plant Physiology**, p 329-395, 1980.

HOSSAIN, M. S., et al.. A review onethnopharmacologicalpotentialof Aloe vera L. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, 2(2), 113–120, 2013.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCAR, 152 p. v. 4, 2003.

JARDIM, L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*AnibarosaeodoraDucke*). **Acta Amazônica.**, Manaus, 2010.

JETTANACHEAWCHANKIT, S. et al. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type 1 collagen; and wound healing. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.109, p.525-31, 2009.

JITTAPIROMSAK N.et al. Acemannam, na extracted product from Aloe vera, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. **Tissue Engineering**. 16(6): 1997-2006, 2010.

JUIZ, P. J. L. et al. Atividade Antimicrobiana Do Óleo Essencial De *OcimumAmericanum* E *OcimumBasilicum* Sobre Periodontopatógenos. **Brazilian Journal Periodontology** - December 2016 - volume 26 - issue 04

JURADO, F. R. et al. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. **Food Engineering Reviews**. v 7, p 275–297. 2015.

KUSTER, R.M. et al. Identification of maloyl glucans from *Euphorbia tirucalli* by ESI-()-FT-ICR MS analyses. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 209-214, 2015.
Disponível em: <doi.org/10.1016/j.phytol.2015.04.008>. Acesso em: 20 nov. 2018.

LACERDA, G. E. **Composição Química, Fitoquímica E Dosagem De Metais Pesados Das Cascas Das Folhas Secas E Do Gel Liofilizado De Aloe Vera Cultivadas Em Hortas Comunitárias Da Cidade De Palmas, Tocantins**. Dissertação. Universidade Federal do Tocantins, 2016.

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

LIMA, R. M. F. et al. Desenvolvimento de sabonete líquido de aloe vera: extração, purificação do extrato ativo e manipulação da forma farmacêutica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 2, p. 251-259, ago./dez. 2012.

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

LUDTKE, M. M. **Atividades de Pesquisa em Cultura de Tecidos Vegetais com Espécies Florestais Nativas**. 2013. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Palotina - PR, 2013.

MASSA, C. V. **Variación del Metabolismo Secundario em plantas debida al genotipo y al ambiente**. Universidad de Extremadura. Dissertação, 2011.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid Metabolism. **Plant Cell**, p 1015-1026, 1995.

MOLSAGHI, M.; MOIENI, A.; KAHRIZI, D. Efficient protocol for rapid Aloe vera micropropagation. **Pharmaceutical Biology**, 52, 735-739

MORAIS, T. P. et al. Aplicações de cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, 2012.

MORALES, G. M. **Estudio Clínico de los efectos del Croton Draconoide em el tratamiento de la alveolitis seca dolorosa**. Tesis Bachiller. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Odontología. Perú, 1984.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 1962.

NETO, L. G.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Plantas medicinais: guia para profissionais de saúde**. São Paulo, premier, 2002.

OLIVEIRA, E. T. **Micropropagação e Acompanhamento Bioquímico, Fisiológico e Nutricional da babosa (Aloe vera (L.) Burm. f) cultivada extra vitro em doses de nitrogênio**. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, E. T. et al. Large-scale Micropropagation of *Aloe vera*. **HORTSCIENCE**, 44(6):1675–1678. 2009.

OLIVEIRA, S. H. dos S.; SOARES, M. J. G. O.; ROCHA, P. de S. Uso de cobertura com colágeno e aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Revista da Escola de Enfermagem USP**. 2010; 44(2):346-51, 2010.

OGUNWANDA, I. A. et al. Chemical composition, anti-nociceptive and antiinflammatory activities of essential oil of *Bougainvillea glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**. S0378-8741 (18) 33024-1, 2018

OMORI, Á. T.; PORTAS, V. B.; OLIVEIRA, C. de S. de. Redução Enzimática Do 4-(Dimetilamino) Benzaldeído Com Pedacos De Cenoura (*DaucusCarota*): Um Experimento Simples Na Compreensão Da Biocatálise. **Química Nova**, Vol. 35, No. 2, 435-437, 2012.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional**. Ginebra, 2002. 67 p, 2002-2005.

PAL, S. et al. Aloe vera: composition, processing and medicinal properties. **Current Discovery**, v. 2, n. 2, p. 106-122, 2013.

PALHARIN, L. H. de C. et al. EFEITOS FITOTERÁPICOS E HOMEOPÁTICOS DA BABOSA. **Revista Científica Eletrônica De Agronomia**, Ano VII, n 14, dez, 2008.

PARK, H. -J. et al. Hyphal anchoring during arbuscled development requires RAM1. **Plant Physiology Preview**. Doi:10.1104/pp.15.01155, 2015.

PASA, M. da S. et al. Qualidade de luz e fitoreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.8, p.1392-1396, ago, 2012.

PASQUAL, M. et al. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**. vol.26 n.1 Brasília Jan./Mar. 2008.

PEREIRA, A.M.S. **Cultura de Tecidos de plantas medicinais**. 2009. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/.../Cultura%20de%20tecidos%20de%20plantas%20medicinais.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

PERÉZ-ALONSO, N. et al. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes de Aloe vera L. **Bioteología Vegetal**. Vol. 15, No. 2: 85 - 95, abril - junio, 2015

PIERIK, R.L.M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. **Madrid: Mundi-Prensa**, 326p, 1990.

PUGH, N. et al. Characterization of Aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from Aloe vera with potent immunostimulatory activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 1030-1034, 2001.

QIU, Z. et al. Modified Aloe barbadensis polysaccharide with immunoregulatory activity. **Planta Medicinal**, v. 66, p.152-156, 2000.

RADHA, M.;LAXMIPRIYA, N. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of Aloe vera: A systematic review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 5, 21-26, 2015.

RAMOS, J. **Avances de la Micropropagación *in vitro* de Plantas Leñosas**, 2012. Disponível em: <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/2515/1/17127974.pdf>. Acessado em:05/01/2019.

RAVEN, P. H. **Biologia Vegetal In: Regulando o Crescimento e o Desenvolvimento: Os Hormônios Vegetais**. Sexta edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Disponível em: <http://www.R-project.org/>

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5º Ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004.

SANTOS, R. L. et al. Contaminação fúngica de plantas medicinais utilizadas em chás. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 289 – 293, 2013.

SELLAMI, I.H. et al. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana L.*), **Industrial Crops and Products**, v.30, n.3, p.395-402, 2009.

SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SHARRIF, M.; SANDEEP, K.V. Aloe vera their chemicals composition and applications: A review **Internacional Journal of Biological and Medical Research**., v. 2, n. 1, p. 466-471, 2011.

SILVA, S. S. et al. Effect of cross linking in chitosan/aloe vera-based membranes for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**. 114-8617(13)618-8, 2013.

SILVA, F. P. **Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de centella asiática (L.) Urban**. Juiz de Fora MG. 169 f Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, 2008.

SIMÃO, A. A. **Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade**. Tese. Universidade Federal de Lavras. 2013.

SOUSA, J. A.; MIRANDA, E. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: Alternativas viáveis**. 2004.

STRACK, D. Phenolic Metabolism. **Plant Biochemistry**, p 388-416, 1997.

SURJUSHE, A. et al. Aloe vera: A short review. **Indian Journal of Dermatology**, v.53, n.4, p.163-66, 2008.

TAIZ, I.; LINCOLN, L.; GEIGER, E. Secondary Metabolites and Plant Defense. **Plant Physiology**, Fourth Edition, cap. 13, 2006.

TALMADGE, J. et al. Fractionation of Aloe vera L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1757-1773, 2004.

TEIXEIRA, J. B. P. et al. A Fitoterapia no Brasil: da Medicina Popular à regulamentação pelo Ministério da Saúde. UFJF, 2012. Disponível em: <[http://www.ufjf.br/proplamed/files/2012/04/A-Fitoterapia-no-Brasil-da-Medicina-Popular- %C3%A0-regulamenta%C3%A7%C3%A3o-pelo-Minist%C3%A9rio-da-Sa%C3%BAde.pdf](http://www.ufjf.br/proplamed/files/2012/04/A-Fitoterapia-no-Brasil-da-Medicina-Popular-%C3%A0-regulamenta%C3%A7%C3%A3o-pelo-Minist%C3%A9rio-da-Sa%C3%BAde.pdf)>. Acesso em 30 jan. 2018.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium – Compêndio de Fitoterapia**. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 317p, 1997.

TORO, A. M. et al. Levantamento Etnobotânico da planta medicinal *Aloe vera* L. na Comunidade São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá, MT. **Biodiversidade** - v.17, n1, p- 80, 2018.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

TRESVENZOL, L. M. F. et al. Composição Química do Óleo Essencial e Atividade Antimicrobiana da *Memora nodosa* (Bignoniaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. **28** (4): 513-9, 2009.

TROLLER, R, B. **Ecologia e Desenvolvimento**. v9, p54-55, 1999.

VADILLO, P. G. Y. **Estudio comparativo de la respuesta tisular al relleno alveolar a base de Aloe vera y Crotonlechleri, em Alveolos post exodoncia en incisivos de Caviaporcellus**. Lima: Tesis para optar el grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2009.

VEIGA JUNIOR, V. F; PINTO, A. C.; MACIAL, M. A. M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**, v. 28, n 3, 519-528, 2005.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 2009.

VIEIRA, R. P. et al. Benzaldeído Semicarbazona: Um Candidato a Fármaco que Alia Simplicidade Estrutural a um Amplo Perfil de Atividades. **Revista Virtual Química**. Vol 2, nº. 1, (2-9). 2010.

Zavala-Sánchez, M. A.; Pérez-Gutiérrez, S.; Perez-González, C.; Sánchez-Saldivar, D.; Arias-García, L. Antidiarrhoeal Activity of Nonanal, an Aldehyde Isolated from *Artemisia ludoviciana*. **Pharmaceutical Biology**, 40:4, 263-268, 2002.

ANEXO

TIPO DE PRODUTO E PROCESSO

O produto deste trabalho é caracterizado como Protocolo experimental, desenvolvido a partir do estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de *Aloe vera* coletadas em duas épocas do ano, com posterior cultivo de plantas em diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP e em ambientes de cultivo com variação de temperatura e intensidade luminosa, além de identificação do perfil de compostos produzidos pelas plantas de babosa cultivadas *in vitro* e *in vivo*.

IMPACTO E APLICABILIDADE

O protocolo experimental utilizado nesta pesquisa aborda aspectos fundamentais para estabelecimento de condições ideais de cultivo da planta medicinal *Aloe vera* que faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Assim, este estudo servirá de base para futuras pesquisas relacionadas ao cultivo *in vitro* dessa espécie e de outras plantas medicinais, visando aumentar a produção de compostos voláteis em plantas de interesse da indústria farmacêutica. Dessa maneira, reduzirá o extrativismo acelerado, uma vez que evitará a necessidade de retirada de plantas medicinais do meio ambiente, pois através do cultivo *in vitro* é possível a produção de mudas em larga escala, em espaço físico reduzido e curto espaço de tempo, independente das condições edafoclimáticas, possibilitando a produção de mudas de qualidade para estabelecimento de farmácias vivas e fornecimento para indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

INOVAÇÃO E COMPLEXIDADE

Este trabalho permitiu a identificação do perfil de compostos voláteis produzidos pelas plantas de babosa cultivadas em diferentes concentrações de BAP e em ambientes de cultivo distintos, possibilitando a comparação com os compostos voláteis produzidos em plantas matrizes cultivadas sob condições de campo. Dessa forma, auxiliará no estabelecimento de protocolos de cultivo *in vitro* de plantas medicinais, visando, além dos aspectos descritos, avaliar a atividade farmacológica

das plantas em organismos vivos, uma vez que a ação dos compostos voláteis possui atuação em sinergismo, e a concentração isolada de cada composto presente nas plantas medicinais pode não influenciar positivamente na sua resposta farmacológica.