



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

RAFAELA FONSECA LOPES

**MICROPOPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS
DE INTERESSE AO SUS: *Mentha x villosa* Huds e *Vernonia condensata* Baker**

**GOVERNADOR MANGABEIRA-BA
2017**

RAFAELA FONSECA LOPES

**MICROPOPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS
DE INTERESSE AO SUS: *Mentha x villosa* Huds e *Vernonia condensata* Baker**

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

Orientador: Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

**GOVERNADOR MANGABEIRA-BA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação

L864m	<p>Lopes, Rafaela Fonseca</p> <p>Micropopagação e conservação <i>in vitro</i> de plantas medicinais de interesse ao SUS: <i>Mentha x villosa</i> Huds e <i>Vernonia condensata</i> Baker / Rafaela Fonseca Lopes. – 2017.</p> <p>100 f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida Coorientadora: Profa. Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho</p> <p>Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Faculdade Maria Milza, Governador Mangabeira, 2017.</p> <p>1. Plantas Medicinais. 2. Hortelã. 3. Alumã. 4. Cultivo <i>in vitro</i> I. Almeida, Weliton Antônio Bastos de. II. Carvalho, Mariane de Jesus da Silva de. III. Título.</p> <p>CDD 633.88</p>
-------	--

RAFAELA FONSECA LOPES

Micropropagação e conservação In vitro de plantas medicinais de interesse ao SUS: Mentha x Villosa Huds e Vernonia Condensata Baker

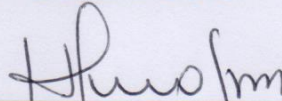
Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Faculdade Maria Milza (FAMAM), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Linhas de Pesquisa: Planejamento, Gestão e Tecnologias ambientais

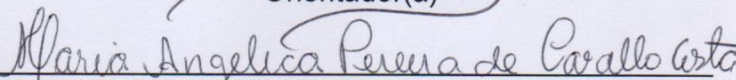
Orientador(a): Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida

Aprovada em: 29 / novembro / 2017

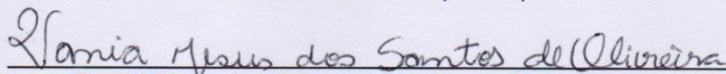
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida
Orientador(a)



Prof.ª Dr.ª Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Membro Externo (UFRB)



Prof.ª Dr.ª Vânia Jesus dos Santos de Oliveira
Membro Interno (FAMAM)

GOVERNADOR MANGABEIRA - BA
2017

*Dedico aos meus pais, **Zenelde Fonseca Lopes e Roque Lopes Reis (In memoriam)**. Nunca pouparam, esforços ou estímulo para a minha formação.*

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus, pelo fôlego da vida e por permitir vencer todos os obstáculos com saúde e perseverança. A ti Senhor toda honra e toda glória!

À minha amada mãe Zeneide, pelo amparo, apoio e orações. Segurou minhas mãos como quem conduz os primeiros passos de uma criança e embarcou comigo no meu sonho de ingressar em um curso de mestrado.

A meu irmão Rafael Lopes, pela paciência, apoio e incentivo aos meus estudos.

Ao meu noivo Raffael Freitas, pela paciência e compreensão em tantos momentos de ausência. Sua presença e apoio foram muito importantes na realização deste trabalho.

A minha sogra Josemeire Passos pelas constantes orações.

A minha amada Avó Duzinha, minha Madrinha Zenilde, as minhas tias Marinês e Zezeu, aos meus tios Danilo, André, Sandro, Ricardo, João, Jorge, pelas incessantes orações e palavras de incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida a quem tenho muito respeito e admiração, minha eterna gratidão por ter participado dessa trajetória, pela paciência na orientação desta pesquisa, por ter me apoiado e incentivado, incentivo este que me ajudou a crescer a cada dia como pessoa e profissional. Professor, o meu muito obrigado por todos os ensinamentos.

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Mariane de Jesus da Silva de Carvalho e Prof.^a Dr.^a Vânia Jesus dos Santos de Oliveira, pelo carinho que me receberam, pela amizade, pela paciência, pelo apoio e pelo incentivo constante na construção deste trabalho.

Aos meus amigos, Plácido (Nuno), Jean e Gabryel pelo apoio e auxílio durante a pesquisa.

À professora Jenelara Almeida pelos incentivos na minha formação e profissão, por acreditar sempre na minha capacidade e por tecer palavras de incentivo fundamentais para motivar minha caminhada.

A professora, Janay Almeida dos Santos Serejo, pela oportunidade de contar com suas contribuições na qualificação do alicerce deste trabalho.

Aos professores do mestrado, em nome da professora Andréa Jaqueira da Silva Borges, Claudia Cecilia Blaszkowski de Jacob e Sérgio Roberto Lemos de Carvalho pelo incentivo e privilégio de compartilhar seus conhecimentos.

A Secretaria Municipal de Saúde de Sapeaçu, na pessoa de Cristiane de Almeida Gois pelo incentivo, apoio e compreensão, flexibilizando meus horários.

À Faculdade Maria Milza-FAMAM, especialmente ao Programa de Mestrado Profissional em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente que me proporcionou a oportunidade de realizar um sonho.

A todos os amigos e colegas de trabalho por terem me apoiado, desde o início dessa longa jornada, incentivando-me para que eu pudesse permanecer sempre fiel aos meus ideais, que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse possível!

“O agradecer é infinito, tal a profundidade do que sinto por todos aqueles que me sorriam ao caminho e que graças a Deus, não foram poucos. Palavras dificilmente expressam o apoio que recebi em momentos nos quais, muitas vezes, a fragilidade era apenas por mim percebida”.

(Autor Desconhecido)

Muito Obrigada.

RESUMO

Mentha x villosa Huds e *Vernonia condensata* Baker são espécies de plantas medicinais nativas do Brasil, que possuem grande potencial para sanar problemas gastrointestinais. Devido à importância medicinal e por estas serem obtidas principalmente através do extrativismo predatório, o que pode levar a erosão genética das espécies, estudos relacionados à multiplicação e conservação *in vitro* se fazem necessários. Assim, este trabalho teve como objetivo, estabelecer um protocolo para o cultivo *in vitro* das espécies *Mentha x villosa* Huds e *Vernonia condensata* Baker, visando o estabelecimento de uma coleção *in vitro* de plantas medicinais de interesse ao SUS. Para isso, alguns estudos foram conduzidos, sendo o primeiro relacionado à multiplicação e conservação *in vitro* de hortelã. Na micropropagação de hortelã avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) no meio de cultura MS após 60 dias de cultivo de segmentos nodais, utilizando as variáveis percentual de explantes responsivos (explantes com desenvolvimento de brotos) e o número de brotações por explantes. As plantas resultantes foram aclimatizadas e após 30 dias avaliou-se o percentual de sobrevivência. Para a conservação *in vitro* de hortelã foram utilizados segmentos nodais de plantas oriundas da micropopagação, sendo avaliadas diferentes concentrações do meio MS (MS, MS/2 e MS/4) e distintas concentrações de sacarose (15 e 30 g L⁻¹). Com 30 e 120 dias de cultivo foram avaliadas as características altura de planta, número de folhas senescentes, número de ramificações e número de raízes. No segundo, relacionado à conservação *in vitro* do alumã, segmentos nodais foram cultivados nas mesmas concentrações do meio de cultura MS e de sacarose avaliadas na pesquisa com hortelã. Além disso, avaliou-se a temperatura dos ambientes de cultivo: sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C e BOD com temperatura de 20 ± 1°C. Após 30 e 120 dias de cultivo, as plantas foram avaliadas através das características descritas anteriormente, substituindo apenas o número de ramificações por número de folhas verdes. Observou-se que a adição do BAP na concentração de 1,5 mg L⁻¹ proporcionou a máxima proliferação de brotos na multiplicação *in vitro* de hortelã, sendo constatado 100% de sobrevivência das plantas após a aclimatização. Além disso, verificou-se que o meio MS a 1/4 de sua concentração e adição de 30 g L⁻¹ de sacarose foi eficiente para a conservação *in vitro* da espécie *Mentha x villosa* Huds. Para a conservação *in vitro* da espécie *Vernonia condensata* Baker as melhores respostas em relação à condição de crescimento mínimo foram verificadas utilizando o meio de cultura MS a 1/4 de sua concentração e adição de 30 g L⁻¹ de sacarose, na temperatura de 25°C.

Palavras-chave: Hortelã. Alumã. Cultivo *in vitro*. Biotecnologia.

ABSTRACT

Mentha x villosa Huds and *Vernonia condensata* Baker are native Brazilian medicinal plants widely used to treat gastrointestinal disorders. Their medicinal importance and the fact that they are obtained through predatory extractivism, which can cause genetic erosion, justifies *in vitro* multiplication and conservation studies. The aim of this research was to develop a protocol for *in vitro* culture of *Mentha x villosa* Huds and *Vernonia condensata* Baker in order to build up a collection of medicinal plants of interest to the Unified Health System (SUS). To attain our objective we studied firstly the *in vitro* multiplication and conservation of mint. With regard to mint micropropagation, the effect of different BAP concentrations (0.0; 0.5; 1.0 and 1.5 mg L⁻¹) in MS culture media on the percentage of responsive explants (explants with shoots) and the number of shoots per explant after a sixty day culture of nodal segments was assessed. The resulting plants were acclimatized for 30 days after which the survival percentage was evaluated. Nodal segments of micropropagated mint plants were used for *in vitro* conservation in different MS (MS, MS/2 and MS/4) and sucrose concentrations (15 and 30 g L⁻¹). After 30 and 120 days plant height, number of senescent leaves, branching, and number of roots were assessed. In the second set of experiments we studied the *in vitro* conservation of *Vernonia condensata* Baker. Nodal segments were cultured in the same conditions described above for *Mentha x villosa* Huds. We also evaluated the culture room temperature: growth room at 25 ± 1°C and BOD at 20 ± 1°C. After 30 and 120 days the same traits analyzed in *M. villosa* were assessed in *V. condensata* just substituting number of green leaves for number of ramifications. The addition of 1.5 mg L⁻¹ BAP resulted in maximum shoot proliferation and 100% survival after acclimatization when considering mint *in vitro* multiplication. Besides, the MS concentration of 1/4 MS medium with 30 g L⁻¹ of sucrose were efficient for *M. villosa in vitro* conservation. Minimum growth requirements for *V. condensata in vitro* conservation were attained in media containing 1/4 of MS with 30 g L⁻¹ sucrose at 25°C.

Keywords: Mint. *In vitro* Culture. Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** Porcentagem de explantes responsivos em função das concentrações de BAP. 42
- Figura 2** Número de brotos/explante em função das concentrações de BAP. 43
- Figura 3** Plantas de *Mentha x villosa* Huds cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP: (A) 0,0 mg L⁻¹; (B) 0,5 mg L⁻¹; (C) 1,0 mg L⁻¹ e (D) 1,5 mg L⁻¹. 43
- Figura 4** Plantas de *Mentha x villosa* Huds oriundas do cultivo *in vitro*, acondicionadas em garrafas do tipo PET, contendo terra vegetal, durante a etapa de aclimatização. 45

CAPÍTULO II

- Figura 1** Plantas de *Vernonia condensata* Baker com 120 dias de conservação *in vitro* em meio de cultura MS na sua concentração normal (A, D), na metade da sua concentração (B, E) e a 1/4 de sua concentração (C, F), com doses de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose mantidas na temperatura de 20 e 25°C±1°C, respectivamente. 78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1** Resumo da análise de variância das variáveis: altura de planta (AP), em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de ramificações (NRF) e número de raízes (NR) de plantas de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias. 46
- Tabela 2** Valores médios de altura de planta (cm) de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias. 47
- Tabela 3** Valores médios do número de ramificações de plantas de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias. 49
- Tabela 4** Valores médios do número de folhas senescentes de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS durante 30 e 120 dias. 50
- Tabela 5** Valores médios do número de raízes de plantas de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de meio de cultura MS durante 30 e 120 dias. 51
- Tabela 6.** Valores médios do número de raízes de plantas de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose. 51

CAPÍTULO II

- Tabela 1** Resumo da análise de variância das variáveis: altura de planta (AP), em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de raízes (NR) de plantas *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, em ambientes com temperaturas de 20°C e 25°C durante 30 e 120 dias. 67
- Tabela 2** Valores médios de altura de planta de *Vernonia condensata* Baker (cm), cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias. 68
- Tabela 3** 70
Valores médios de alturas de plantas de *Vernonia condensata* Baker (cm), cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento) durante 30 e 120 dias.

Tabela 4 Valores médios de altura de planta de *Vernonia condensata* Baker (cm), cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e 25°C (sala de crescimento) durante 30 e 120 dias. 70

Tabela 5 71
Valores médios de altura de planta de *Vernonia condensata* Baker (cm), cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA- Ácido Absísico.

ANAVA- Análise de Variância.

ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária.

AP- Altura da Planta.

BAP- 6-benzilaminopurina.

COFEn- Conselho Federal de Enfermagem.

NFS- Número de Folha Senescente.

NRF- Número de Ramificação.

NR- Número de Raízes.

MS- MURASHIGE e SKOOG.

OMS- Organização Mundial de Saúde.

PNPMF- Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.

PNPIC- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares.

RENISUS- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.

SUS- Sistema Único de Saúde.

SCNES- Sistema de Cadastro Nacional de Estabelecimento de Saúde.

USF- Unidade de Saúde da Família.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Aspectos Gerais Sobre Plantas Medicinais	15
2.1.1 Aspectos Botânicos e Importância Medicinal da <i>Mentha x villosa</i> Huds	17
2.1.2 Aspectos Botânicos e Importância Medicinal da <i>Vernonia condensata</i> Baker	20
2.2 As Plantas Medicinais no Cenário das Políticas Públicas	22
2.3 Micropropagação de Plantas Medicinais	25
2.4 Conservação <i>In Vitro</i> de Plantas Medicinais	29
3 CAPÍTULO I – Multiplicação e Conservação <i>in vitro</i> de <i>Mentha x villosa</i> Huds	34
4 CAPÍTULO II – Conservação <i>in vitro</i> de <i>Vernonia condensata</i> Becker.....	60
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática inserida na vida da população brasileira há muitos anos (VANINI, 2010).

Considerando a relevância da participação do Brasil no mercado mundial de fitoterápicos, associada à necessidade de conservação da flora medicinal brasileira, duas políticas foram instituídas em 2006, pelo Governo Federal brasileiro (REBOUÇAS, 2009). A primeira foi a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) através da portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006 (BRASIL, 2006a). A segunda foi a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, estabelecida por meio do Decreto Federal de nº 5.813 de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006b). Ambas as políticas propõem em suas diretrizes o estímulo à pesquisa e o estímulo com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, onde as quais possam ser fornecidas com qualidade, segurança e eficácia aos indivíduos, valorizando e considerando a biodiversidade do país. Além disso, vale ressaltar que a OMS (Organização Mundial da Saúde) recomenda que o uso de plantas medicinais deve ser estendido à atenção básica de saúde (BRASIL, 2012b).

Em torno de 75% da população mundial recorrem às plantas medicinais para tratamento de doenças, devido às propriedades desejáveis interligadas ao uso, como eficácia, baixo custo, reprodutibilidade e constância de qualidade (CARVALHO; COSTA; CARNELOSSI, 2010).

Contudo, a exploração desenfreada do meio ambiente tem provocado redução drástica de inúmeras espécies medicinais, através da extração direta nos ecossistemas (extrativismo) levando prejuízos para toda a população. A falta de conhecimento sobre o extrativismo tem dificultado o uso de alternativas eficazes de manejo e conservação das espécies (CARVALHO; COSTA; CARNELOSSI, 2010; NUNES et al., 2012). Assim, somente o cultivo sistematizado, com o auxílio de ferramentas biotecnológicas, a exemplo do cultivo *in vitro* de tecidos vegetais, poderá assegurar a produção em larga escala e a conservação *in vitro* de espécies vegetais (MARINHO et al., 2011).

A cultura de tecidos vegetais tem sido apontada como método favorável a rápida multiplicação e uso sustentável de plantas medicinais para as gerações futuras (SIDHU, 2010). Por esse motivo, a técnica de micropopagação já vem sendo

utilizada como subsídio de produção em larga escala de espécies medicinais visando perpetuação de espécies (MARINHO et al., 2011).

Neste contexto, a criação de um banco ou coleção de espécies de plantas medicinais *in vitro*, inserido dentro de uma faculdade, assume um papel fundamental na produção de plantas livres de patógenos, ideais para uso, cultivo e fornecimento de mudas para gestores de saúde, que desejam implementar Farmácias Vivas nas Estratégias de Saúde da Família, bem como para a sociedade em geral. Além disso, contribuirá para a preservação dessas espécies.

Pedagogicamente, a ligação com a graduação, através do ensino, pesquisa e extensão, fará do banco ou coleção *in vitro* de Plantas Medicinais uma ferramenta de conhecimento e contribuição valorosa na formação multidisciplinar dos futuros profissionais no âmbito das plantas medicinais.

Portanto, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para o cultivo e conservação *in vitro* da espécie *Mentha x villosa* Huds, bem como para a conservação *in vitro* da *Vernonia condensata* Baker, visando o estabelecimento de uma coleção *in vitro* de plantas medicinais de interesse ao SUS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE PLANTAS MEDICINAIS

Planta medicinal é conceituada como espécie vegetal empregada para fins terapêuticos podendo ser utilizada em estado fresco (*in natura*) ou seco (procedida à secagem) (BRASIL, 2010). Seu uso se dá com o objetivo de evitar, sanar doenças ou de diminuir sintomas das mesmas (DI STASI, 2007; VANINI, 2010).

O homem primitivo dependia exclusivamente da natureza para manter-se vivo utilizou especialmente das plantas medicinais para sanar os problemas de saúde (ALMEIDA, 2011). Durante muito tempo, a utilização dessas plantas foi a única opção para sanar necessidades essenciais de saúde, constando em apontamentos e manuscritos de distintas civilizações (BORNHAUSEN, 1998; BRASIL, 2012b).

No decorrer dos séculos o homem já fazia uso de plantas com o objetivo de nutri e curar, muito antes de surgir algum formato de escrita. Ao longo dos experimentos com as ervas obteve-se sucesso e fracasso, pois existiam plantas que curavam, matavam e outras ocasionavam dores, cólicas ou alucinações. Óbvio que todos os médicos e feiticeiros antigos, que estudavam as propriedades medicinais das ervas, e neste âmbito a botânica, a medicina e a magia se desordenavam (BORNHAUSEN, 1998).

Diversas culturas corroboraram para o uso sistemático das plantas medicinais, entre elas a egípcia, chinesa e grega, sendo que diversas espécies utilizadas com fins terapêuticos ainda fazem parte do cardápio medicinal utilizado pelas populações até os dias atuais, tais como o alho, chá verde e sene (GUEDES, 2009). No entanto, nota-se que no passado as plantas medicinais foram vastamente utilizadas por várias civilizações fazendo parte até hoje da cultura destes povos (CAMARGO, 2010).

No período da Idade das Trevas, as feiticeiras e curandeiras eram muito conhecidas e condenadas pela Igreja, por possuírem conhecimentos a respeito das plantas medicinais, além de serem influenciadas por superstição e crenças pagãs na época. Suas porções incluíam esporadicamente remédios efetivos, venenos abortivos e elixires afrodisíacos (GIACOMETTI, 1989).

No Ocidente, em 1973 a.C. foram encontrados papiros na região egípcia, os quais descrevem o uso de finalidade terapêutica de mais de 700 plantas usadas pelos sacerdotes (VALE, 2002).

No Brasil o conhecimento sobre o uso de plantas medicinais teve influências indígenas, mas também de negros e europeus, ocasionando uma variedade no conhecimento das plantas e de seus aspectos terapêuticos (COSTA, 2011).

Na época em que o Brasil era colônia de Portugal, muitas foram às espécies vegetais trazidas no período do tráfico de escravos, como também muitas plantas foram levadas daqui para o continente africano (ALMEIDA, 2011). Por intermédio dos Pajés, os índios que aqui viviam dispostos em várias tribos, faziam uso da grande biodiversidade de plantas medicinais e o conhecimento do poder curativo das ervas eram transmitidos e aprimorados de geração em geração (BRASIL, 2012b; LORENZI; MATOS, 2002).

Corroborando com os autores supracitados, Costa (2011) afirma que as técnicas de utilização das ervas medicinais tem sua ascendência na cultura das diversas tribos indígenas que habitavam as regiões mais distantes, sendo ainda agregada, com as tradições de uso dos europeus e africanos que chegaram posteriormente e constitui a atual farmacopéia, despertando grandes interesses pela potencialidade terapêutica e econômica.

Em diversas regiões do Brasil, o uso de ervas medicinais é uma prática corriqueira, principalmente em comunidades que se encontram distantes de centros de saúde. Conforme a carência de acesso da maioria dos indivíduos aos medicamentos sintéticos, relacionada à deficiente estrutura e qualidade no atendimento médico e dos serviços de saúde pública, observa-se que o emprego de plantas medicinais, no Brasil, vem mostrando um aumento acentuado nas últimas décadas e é ocasionado pela facilidade de obtenção e afinidade cultural (CARVALHO et al., 2007; SERPELONI et al., 2008; COSTA, 2011).

No entanto, Oliveira (2011) salienta que as plantas medicinais representam a procura dos indivíduos por maior autonomia sobre o corpo, como também a sensação de valorização da natureza e dos produtos a ela agregados.

Um estudo realizado no Povoado de Sapucaia, localizado no município de Cruz das Almas-BA, apontou que 62,7% dos moradores portadores de doenças não fazem uso de medicamentos, devido principalmente ao baixo poder aquisitivo. Contudo, utilizam receitas de plantas medicinais provenientes de seus antepassados

e dos seus vizinhos, onde, das 65 espécies de plantas citadas pelos moradores da localidade de Sapucaia, 28 foram identificadas cientificamente e o seu uso comparados com a literatura, reforçando a necessidade de investimentos em pesquisas no âmbito das plantas medicinais (RODRIGUES; GUEDES, 2006).

Um levantamento etnofarmacológico realizado por Silva et al. (2009) nas comunidades rurais da Pumba e Sapucaia, localizadas no município de Cruz das Almas-BA, evidenciou que as duas comunidades possuem tradicionalidade a respeito das plantas medicinais, e que se aproximam do conhecimento científico, visto que suas indicações terapêuticas são reconhecidas pela ciência e validadas pelo conhecimento tradicional.

Estudo realizado por Battisti et al. (2013) demonstram uma grande biodiversidade de espécies utilizadas, e o papel das plantas medicinais não apenas como agentes curativos/profiláticos da cultura popular, mas como uma forma de integração e cuidado mútuo nas comunidades.

2.1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA MEDICINAL DA *Mentha x villosa* Huds.

A *Mentha x villosa* Huds pertence à família *Lamiaceae*, é conhecida popularmente como hortelã-comum, hortelã-de-tempero, hortelã rasteira, hortelã miúda, mentrasto, etc. (RADÜNZ et al., 2006).

A família *Lamiaceae* possui grande número de espécies aromáticas. Esta família é representada por 200 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies. Um dos gêneros mais importantes é o gênero *Mentha*, no qual já foram identificadas 18 espécies (DECHAMPS et al., 2013).

A menta de temperos (*M. x villosa* Huds) originou-se do cruzamento entre *Mentha Spicata* com e *Mentha suaveolens*. Em virtude de características intermediárias devidas a cruzamentos, esta menta apresenta várias sinonímias: *Mentha alopecuroides* Hull; *Mentha nemorosa* Willd, e *Mentha x villosa* Huds. (pro sp.) var. *alopecuroides* (Hull) Briq. (pro nm.), de acordo com o USDA- Natural Resources Conservation Service (ADJUTO, 2008).

Embora seja uma espécie nativa nas regiões temperadas do hemisfério norte ela se desenvolve nos cinco continentes (América, Ásia, África, Austrália e Oceania). No Brasil ocorrem vários tipos de hortelãs, mas os tipos são originários da Europa,

onde os portugueses as trouxeram para o sul do País no período da colonização. Dos vários tipos de hortelã rasteira, aclimatados no Brasil, todos têm origem europeia e atualmente encontra-se em todos os estados (CARRICONDE et al., 1995; ADJUNTO, 2008).

É uma planta perene, com 30 a 40 cm de altura, folhas ovais, curtamente peciolada, com aroma característico e as flores quando aparecem ficam dispostas em espigas curtas terminais (LORENZI; MATOS, 2002; MOREIRA et al., 2010). Optam por locais sombreados, são resistentes ao frio e não suportam o calor, porém baixas temperaturas podem dificultar sua sobrevivência e devido à predisposição de cruzamento não se recomenda o cultivo de outras espécies do mesmo gênero *Mentha* ao lado (OLIVEIRA, 1999).

Os principais produtos da *Mentha* são os óleos essenciais, responsáveis por atribuir diversas propriedades biológicas (KUMAR et al., 2011). Os principais componentes químicos estão em seu óleo essencial, onde se destaca o mentol, que pode alcançar e superar 80% do óleo essencial. Outros compostos são: mentofurona, pineno, limoneno e cânfora. Contém ainda tanino, ácidos orgânicos, flavonoides e heterosídeos (MARTINS et al., 2002; MOREIRA et al., 2010).

No Brasil, a *Mentha x villosa* Huds é naturalmente encontrada em hortas e jardins, inclusive em grandes cultivos para fabricação de mentol (MOREIRA et al., 2010). Em geral, são cultivadas por seus óleos essenciais para fins medicinais e culinários (ADJUNTO, 2008). Corroborando com este autor, Moreira et al. (2010) relatam que a literatura etnobotânica menciona seu uso como planta medicinal e como condimento alimentar desde as primeiras civilizações orientais.

A *Mentha x villosa* Huds é muito empregada na medicina popular brasileira, especialmente no Nordeste, no combate a afecções bucais, cólicas estomacais e desordens menstruais e, além disso, tem amplo uso na culinária (TELES et al., 2011). Moreira et al. (2010), ressalta a importância dessa espécie não apenas na medicina popular, como na indústria para produção de substâncias aromáticas, bebidas alcoólicas, medicamentos e fabricação de cigarros.

A *Mentha piperita* L., também pertence ao mesmo gênero da espécie em estudo, fazendo parte da Farmacopéia Brasileira, onde a folha e sumidades florais secas são as partes utilizadas, através da Infusão (1,5 g em 150 mL, devendo ser tomado 10 minutos após o preparo e 2 a 4 vezes ao dia). Sua via de administração é

oral, o uso é para indivíduos acima de 12 anos, devendo utilizar o infuso em caso de espasmos musculares e flatulências (BRASIL, 2011).

Acessos de *M. x villosa* Huds são ricos em óxido de piperitenona, um princípio ativo eficaz contra amebíase e giardíase, encontrado no medicamento Giamebil (SILVA, 2014). Este medicamento é utilizado na dose de 24 mg duas vezes por 3 dias (TELES et al., 2011).

O hortelã tem grande importância medicinal e social por sua ação contra microrganismos intestinais, Lorenzi e Matos (2002) ressaltam que o uso médico mais recente do hortelã (*Mentha x villosa* Huds) é no tratamento contra ameba, giárdia e tricomonas, fruto de investigação em tratamento caseiro onde utilizou-se o pó da folha de hortelã para tratar crianças com “diarreia-de-sangue” nas proximidades de Recife.

Pesquisa realizada por Nascimento et al. (2009), apontou que os testes in vivo realizado com as fezes de bezerras, mostraram ausência de atividade anti-helmíntica do hidrolato de *Mentha x villosa* Huds na dose de 0,1ml kg dia⁻¹, nos animais tratados.

Alguns estudos apontam as propriedades terapêuticas da espécie *Mentha x villosa* Huds. Um ensaio experimental com ratas grávidas, realizado por Guerra et al. (2012), revelou que o óleo essencial não comprometeu a saúde das ratas grávidas e gestação. Entretanto, mesmo não ocorrendo episódios de malformações e fetotoxicidade, foi revelado suaves pontos hemorrágicos no fígado, rins, cérebro e vasos sanguíneos de alguns fetos expostos. Em outro estudo, Fialovaa et al. (2015) constataram efeito antioxidante do extrato aquoso das folhas de hortelã.

2.1.2 ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA MEDICINAL DA *Vernonia condensata* Baker.

A *Vernonia condensata* Baker pertence à família Asteraceae, é um das plantas medicinais mais cultivadas em jardins e hortas no Brasil, oriunda provavelmente da África tropical e conduzida ao Brasil no período colonial, através dos escravos (LORENZI; MATOS, 2002; PIZZIOLLO et al., 2011).

A família Asteraceae é uma das maiores famílias de Angiospermas, com cerca de 30.000 espécies abrangidas em 1.700 gêneros, tem uma distribuição cosmopolita, ou seja, esta universalizada, estando mais bem representada nas

regiões tropicais e subtropicais, sendo esta utilizada há séculos na medicina popular (ROQUE; BAUTISTA, 2008).

O gênero *Vernonia* é comumente citado em pesquisas de plantas utilizadas pela população que fazem uso de terapias alternativas com plantas medicinais, porém, os estudos de sua composição química ainda encontram-se bastante limitados, atingindo somente cerca de 15% das espécies (VICENTE; ALMEIDA; CARVALHO, 2009). Devido à produção de óleos essenciais, esta família apresenta espécies de grande importância na indústria farmacêutica (MILAN, HAYASHI; GLÓRIA, 2006).

A *Vernonia condensata* Baker é um arbusto alto, que chega a atingir até 5 metros de altura, possui pouca ramificação, glabras (não possui pêlos), suas flores são discretas com aspecto esbranquiçado, apresenta folhas alternas, alongadas ou lanceoladas, possui sabor amargo, porém doce quando mastigadas (LORENZI; MATOS, 2002; SOUSA et al., 2011).

Vernonia condensata Baker, conhecida popularmente como alumã, falso boldo, boldo da Bahia, figatil e assa peixe, é uma das espécies mais usada na medicina popular. É encontrada nas Regiões do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (CARIBÉ et al., 2013; VICENTE; ALMEIDA; CARVALHO, 2009; PIZZILO et al., 2011).

Na composição química de *Vernonia condensata* Baker são documentadas as presenças de saponinas, o glicosídeo cardiotônico “vernonia”, flavonoides, óleos essenciais e substâncias amargas (lactonas sesquiterpênicas) (IGANCI et al., 2006; LORENZI; MATOS, 2002).

Para fins terapêuticos, o alumã é popularmente cultivado em hortas e jardins domésticos de todo leste e sudeste do Brasil. Apenas as folhas são aproveitadas, onde sua utilização pode ser feita em qualquer período do ano, de preferência antes das flores aparecerem (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie *V. condensata* Baker já faz parte da Farmacopéia Brasileira, onde a folha é a sua parte utilizada, através da Infusão (3 g em 150 mL, três vezes ao dia), antes das principais refeições. Sua via de administração é oral, o uso é adulto, em casos de dor e dispepsia (BRASIL, 2011).

As folhas dessa espécie são usadas em infusão, apresentando propriedades analgésica, sedativa, anti-ulcerogênica, anti-bacteriana, antifúngica e, além disso,

possui benéficas funções digestivas, atualmente sendo testada como antitumoral (CARIBÉ et al., 2013; SOUSA et al., 2011). No entanto, estudos apontam que esta espécie medicinal pode vir a gerar efeitos embriotóxico, teratogênico e abortivo, devendo ser evitada na gravidez (RODRIGUES et al., 2011).

Uma pesquisa realizada por Costa e Marinho (2016), em comunidades de Picuí-PB revelou que a espécie medicinal mais utilizada pela população (41,67%) foi a *V. condensata* Baker, sendo utilizada como chá para sanar problemas relacionados a doenças do fígado e estômago, gases e barriga inchada. A *V. condensata* Baker é uma planta medicinal utilizada na medicina popular e possui várias finalidades terapêuticas, podendo ser preparada de diversas formas como infusão, macerações, etc. O principal uso da planta se dá pelas folhas, contra problemas gastrointestinais, tais como diarreia, constipação, dor de estômago, vermes intestinais e infecções bacterianas. A planta também é comumente utilizada na terapêutica de infecções urinárias, inflamação, diabetes e malária (TOYANG; VERPOORTE, 2013).

Alguns estudos apontam as propriedades terapêuticas da espécie *V. condensata* Baker. Silva et al. (2013) sustentam que esta espécie possui substâncias bioativas com atividades antioxidantes. Já Boeing et al. (2016) apontam que a planta pode ser utilizada como fonte natural, apropriada para prevenção e tratamento de lesões gástricas. Thomas et al. (2016) relataram que o uso da espécie no tratamento de câncer em ratos, ocasionou regressão do tumor, proporcionando um aumento significativo no tempo de vida dos ratos tratados, onde não foram observados efeitos colaterais.

2.2 AS PLANTAS MEDICINAIS NO CENÁRIO DAS POLÍTICAS PÚBLICAS

No Brasil, a validação e institucionalização das abordagens de atenção à saúde iniciaram a partir da década de 80, principalmente após a criação do Sistema Único de Saúde (SUS). Logo após, estados e municípios obtiveram maior autonomia na elucidação de suas políticas e ações de saúde, graças à descentralização e participação popular, resultando na implantação de experiências inovadoras (BRASIL, 2005).

De acordo com Ceolin et al. (2011) a OMS preconiza políticas públicas para a prática da medicina alternativa nos serviços de saúde. Existe uma predisposição

mundial de aumento de práticas não convencionais no âmbito da saúde e de legislação para a sua consistência nos sistemas nacionais de saúde (BRASIL, 2008).

No campo da saúde, na década de 90 após a criação do SUS no Brasil, foram instituídos programas e políticas no sentido de atender à população de forma integral e completa. Discussões referentes ao incentivo de estudos científicos buscando validação sobre políticas voltadas para o reconhecimento de plantas medicinais são responsáveis pela aplicação deste tipo de terapêutica nas variadas situações de saúde (DI STASI, 2007).

Nesta perspectiva, surge no Brasil um destaque nesse âmbito, a Portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006 que consente a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS. Essa política trouxe entre suas diretrizes para plantas medicinais e fitoterapia, a organização da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, como também o fornecimento de fácil acesso aos usuários do SUS (BRASIL, 2006a).

Souza e Luz (2009) relatam que o uso de práticas complementares para fins terapêuticos, como as plantas medicinais, provém de um conjunto de mudanças chamado de contracultura que aconteceu ao final da década de 60 onde a juventude revolucionária seguia a procura de novas opções terapêuticas, usando tais práticas não exclusivamente como terapias, mas como marcos de um período cultural.

Também em 2006, o Decreto Federal de nº 5.813 de 22 de junho de 2006 estabeleceu a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” (PNPMF), que estimula os estudos, as pesquisas e dá diretrizes para inserção de serviços em esfera nacional pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e dos Municípios (BRASIL, 2006a).

A referida política também recomenda que devam ser adotadas medidas que possibilitem a acessibilidade e entrega de produtos (plantas medicinais, fitoterápicos) nas unidades de saúde de forma complementar, salientando que poderá se estender não apenas aos atendimentos nas Estratégias de Saúde da Família, como também nos serviços de média e alta complexibilidade (Ambulatório e Hospitais). Deste modo, a própria PNPMF aponta caminhos para implantá-la (BRASIL, 2006a).

Em conformidade com a PNPMF, também foi estabelecida a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), integrada por 71

plantas medicinais com finalidades terapêuticas, cujo objetivo é nortear estudos que possam dar suporte para a elaboração do elenco de fitoterápicos a serem disponibilizados para a população através do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009).

Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2008) tais políticas supracitadas surgiram de uma necessidade populacional, devido ao modelo hegemônico de saúde atual não conseguir suprir todas as necessidades de saúde da população brasileira.

Através da Portaria GM/MS nº 886, de 20 de abril de 2010 institui, no âmbito do SUS, a Farmácia Viva, sob gestão estadual, municipal ou do Distrito Federal, regulamentada pela vigilância sanitária da ANVISA, onde são definidas as normas de cultivo e manejo das espécies de plantas medicinais, como também, foi incluída através da Portaria SAS nº 470, de 19 de agosto de 2011 nos serviços/classificação do Sistema de Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (SCNES), no serviço de código 125- serviço de farmácia, a classificação 007- Farmácia Viva (BRASIL, 2012b).

No Brasil alguns projetos de caráter social se sobressaem com o uso de plantas medicinais, podendo apontar como referência, o Projeto "Farmácias Vivas" da Universidade Federal do Ceará (UFC), o qual conta com mais de 50 espécies legitimadas cientificamente como medicinais (MATOS, 1998), o Programa de Fitoterapia da Prefeitura Municipal de Curitiba (CORREA Jr.; GRAÇA; SCHEFFER, 2000) e o Programa Municipal de Fitoterapia de Vitória- ES (SACRAMENTO, 2000).

Um estudo realizado por Camargo (2010) evidencia a implantação de programa de plantas medicinais no SUS em diversos Estados do Brasil, como o Programa Farmácia Verde de Ipatinga-MG, implantado desde 1995; Vitória- ES implantado nos anos 90; Programa do IEAP- Instituto de Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Amapá, implantado em 2003; Programa de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Rio de Janeiro-RJ, implantado em 1992; Farmácia Botica da Família em Campinas-SP (Farmácia de Manipulação de Fitoterápicos), criada em 2004; Programa Fitoviva do município de Cuiabá- MT, implantado em 2004 pela Secretaria Municipal de Saúde e o Programa do CEPIC- Centro de Práticas Integrativas e Complementares do município de Pindamonhangaba-SP em 2006.

Com o intuito de suprir a insuficiência de medicamentos sintéticos, e ofertar tratamentos alternativos para além do alopático, outros municípios brasileiros

realizaram nas últimas décadas a Implantação de Programas de Plantas Medicinais na atenção primária à saúde como Londrina/PR, Maringá/PR, Belo Horizonte/MG, Piumhi/MG (DANTAS-BARROS, 2005; OGAVA et al., 2003; RIBEIRO; LEITE; LONDRINA, 2006).

Neste cenário, o uso das plantas medicinais no cuidado à saúde passa a ser reconhecido não apenas pelo saber popular, mas também por instituições governamentais através das esferas Federal, Estadual e Municipal e pelo âmbito científico, que procura, através de pesquisas, constatação dos efeitos atribuídos (CEOLIN et al., 2009a).

Através da escuta qualificada, muitos profissionais que atuam nas Unidades de Saúde da Família (USF), diariamente apreciam relatos de experiências com o aprendizado do saber popular, entretanto é necessário realizar uma escuta sem atribuir o conhecimento literário (BRASIL, 2012a).

O Conselho Federal de Enfermagem/BRASIL (COFEn), através do Parecer Normativo nº 004/95, reconhece que as terapias complementares e/ou alternativas tais como acupuntura, iridologia, fitoterapia, reflexologia, quiropraxia, massoterapia, não estão atreladas a qualquer classe profissional, sendo provenientes de culturas orientais. Sendo assim, o COFEn institui e distingue essas terapias como especialidade e/ou qualificação do profissional de enfermagem através da Resolução 197/97, desde que tenha realizado uma especialização reconhecida, com uma carga horária de 360 horas no mínimo e que seja certificado por esse curso. Assim, poderá prescrever as plantas medicinais, caso contrário, tão somente poderá indicar as plantas medicinais na comunidade (COFEn, 1997).

As práticas complementares são utilizadas ao longo dos anos pelas mais variadas culturas, e amparadas por instituições como a Organização Mundial da Saúde (OMS), que apoia diversos países, a empregar novas estratégias e políticas públicas de saúde, que englobem as práticas complementares no âmbito da saúde, com o intuito de assistir o indivíduo de forma integral (COSTA, 2011).

Diante do que foi exposto, é notório que é dever do próprio enfermeiro, conquistar este novo campo, amparando-se com respaldo legal e qualificando-se cada dia mais na sua área de atuação.

2.3 MICROPOPAGAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

A cultura de células e tecidos vegetais representa uma estratégia de relevância para propagação e preservação de plantas medicinais, em decorrência de suas potencialidades e de resultados expostos para uma elevada quantidade de espécies vegetais. Tal técnica tem facilitado a clonagem e a multiplicação em grande escala de espécies vegetais, as quais, quando multiplicados através de técnicas convencionais, apresentam baixo percentual de produtividade (NOLETO; SILVEIRA, 2004).

Através do ilustre botânico alemão Gottlieb Haberlandt, no início do século passado, tornou-se possível cultivar células isoladas como uma estratégia capaz de concretizar os conceitos introduzidos na teoria celular sugerida por Schwann e Schleider por volta de 1839. Segundo esta teoria, a célula vegetal seria apta, a princípio, de gerar um organismo completo portando-se como uma célula ovo ou zigoto (KERBAUY, 1997).

A micropopagação é a técnica biotecnológica de maior aplicação na cultura de tecidos, sendo utilizada para produzir centenas de espécies medicinais, cujos protocolos permitem estabelecer padrões para a multiplicação massal de várias espécies. Esta técnica é usada frequentemente para multiplicar genótipos selecionados, ou para renovar acessos que apresentem características indesejáveis, como baixa qualidade na produção e vulnerabilidade a doenças. Plantas que são cultivadas em grande escala, fora de seu meio de origem, também têm sido micropropagadas (FIDELIS et. al., 2000; JUNGHANS; SOUZA, 2013). Além disso, essa ferramenta biotecnológica favorece a produção de metabólitos secundários *in vitro*, garantindo, assim, outras opções para a exploração sustentável de algumas espécies, especialmente em ecossistemas ameaçados (MORAIS, 2012).

Corroborando com os autores supracitados, Monfort et al. (2012), destacam que em se tratando de preservação dos recursos vegetais, a micropopagação é um dos métodos mais propícios para garantir a perpetuação de espécies.

O sucesso da micropopagação depende da análise de alguns fatores, tais como explantes, assepsia do material vegetal, meio nutritivo, condições controladas de densidade de fluo de fótons, fotoperíodo, temperatura, dentre outros (BARRUETO CID, 2010; CARVAHO et al., 2011).

Para escolha do meio de cultura deve-se levar em consideração aquele que melhor supra a necessidade celular básica da planta, tais como sais minerais, fonte de carbono, vitaminas e aminoácidos. Caso seja necessário, esse meio ainda

poderá ser suplementado com reguladores vegetais (GONÇALVES; FERNANDES; ROMANO, 2010).

Os reguladores vegetais exógenos são hormônios sintéticos, produzidos em laboratório, que possuem funções idênticas aos hormônios vegetais (endógeno/natural). Estes são administradas em dosagens controladas com a finalidade de instigar, inibir ou modificar as plantas em relação ao seu crescimento e desenvolvimento. Atualmente, existem seis classes de hormônios/reguladores amplamente conhecidos: as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o ácido abscísico, o etileno e os brassinoesteroides (FREITAS, 2009).

Entre as citocininas mais utilizadas na cultura de tecidos, destaca-se a 6-benzilaminopurina- BAP, por favorecer o aumento das taxas de brotações (BARRUETO CID, 2010).

Vicente, Almeida e Carvalho (2009) verificaram que a multiplicação *in vitro* de *Vernonia condensata* Backer constitui-se em um processo possível e viável, sendo que o maior número de brotações foi alcançado adicionando-se 1,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), gerando 4,0 brotações/explante, embora tenha sido necessário a adição de 1,0 mg L⁻¹ GA₃, para alongamento e 1,0 mg L⁻¹ GA₃ e 1% de carvão ativado para o enraizamento dos brotos.

Outros trabalhos alcançaram resultados satisfatórios na micropropagação de espécies vegetais, inclusive medicinais, com o uso da citocinina BAP na fase de multiplicação *in vitro* (ASMAR et al., 2012; FERMINO JUNIOR et al., 2014; MONFORT et al., 2012; NAVROSKI et al., 2014).

Outros dois fatores que são considerados imprescindíveis para o cultivo *in vitro*, são a sacarose, a composição do meio de cultura e a temperatura do ambiente de cultivo. Entre os componentes do meio de cultura, visando o estabelecimento da condição de crescimento mínimo, a sacarose é considerada um dos carboidratos mais utilizados no preparo de meios nutritivos por ser um composto relevante para o desenvolvimento das plantas, uma vez que a fotossíntese de plantas/explantes nestas condições é limitada. Já a temperatura é considerada um fator ambiental que regula o crescimento das plantas, no que se diz respeito ao cultivo *in vitro*, as condições experimentais são padronizadas em ambiente laboratorial (BARRUETO CID, 2010).

Dentre as vantagens de maior importância da micropopagação destacam-se a utilização de um número pequeno de explantes para regenerar milhares de plantas de muitas espécies de alto valor econômico; os clones regenerados são idênticos à planta de origem; tempo reduzido para produzir grande quantidade de plantas; o espaço utilizado no laboratório é bem menor em relação ao utilizado de forma convencional para produção de plantas; eliminação de microrganismos patogênicos da planta; os germoplasmas podem ser preservados *in vitro* por um longo período de tempo, onde é mantida a fidelidade genética dos acessos; como também, predispõe a propagação bem mais rápida de genótipos aprimorados, mais produtivos e resistentes aos patógenos, doenças e outros fatores bióticos e abióticos (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

Neste contexto, a cultura de células e tecidos pode sanar ou reduzir pontos críticos na multiplicação sistematizada de plantas elites, com propriedades medicinais e ou produtoras de óleos essenciais, através da micropopagação (ASMAR et al., 2011; MORAIS, 2012). Após a etapa de multiplicação da espécie de interesse medicinal, pode-se prosseguir com a etapa de enraizamento *in vitro*, posterior aclimatização e finalizar com a comercialização das mudas micropopagadas (MORAIS, 2012).

Souza et al. (2011) ressalta que os sistemas de produção e cultivo de plantas medicinais ainda são incipientes ou até mesmo inexistentes para a maioria das espécies e a continuidade do extrativismo tem exposto espécies nativas de áreas prioritárias para conservação aos processos de erosão genética. Nesta perspectiva, técnicas que favoreçam a produção de plantas medicinais em escala comercial são certamente alternativas sustentáveis que podem reduzir o impacto da destruição da flora ambiental.

Nesse contexto, a micropopagação vem sendo estabelecida no âmbito comercial em várias regiões do mundo, em evidência para a Europa Ocidental, América do Norte, Ásia, Austrália e Israel (CARVALHO; RODRIGUES; SANTOS, 2012). No entanto, muitas Plantas com elevado valor comercial necessitam do estabelecimento de protocolo eficiente de micropopagação que viabilizem a multiplicação em larga escala (NORTH; NDAKIDEMI; LAUBSCHER, 2010).

Alguns trabalhos que mencionam a aplicação desta técnica (multiplicação *in vitro*) em espécies do mesmo gênero (*Mentha x gracilis* Sole e *Mentha piperita* L.) são encontrados na literatura (ASMAR et al., 2011; BEDUHN, 2016; GARLET;

FLORES; MESSCHMIDT, 2011; MORAIS; ASMAR; LUZ, 2014). Porém, em relação à espécie *Mentha x villosa* Huds, não foi encontrado nenhuma publicação sobre micropopagação, como também conservação *in viro* das espécies em estudo (*Mentha x villosa* Huds e *Vernonia condensata* Backer), reforçando a necessidade e importância de realização de estudos e pesquisas neste sentido, na perspectiva de perpetuação da espécie, principalmente, diante de suas funções medicinais e alimentícias.

Em função das ponderações apresentadas, fica evidente a importância da cultura de tecidos, especialmente através da micropopagação, no desenvolvimento de protocolos eficientes de propagação *in vitro* de espécies de interesse medicinal (ALMEIDA et al., 2016), para contribuir na perpetuação dessas espécies, assim como possibilitar estudos farmacológicos em relação aos princípios ativos.

Neste sentido, a comercialização de mudas micropopagadas favorece consideravelmente a preservação de plantas medicinais existentes, já que as espécies em circunstância natural estão correndo risco de desaparecer, sobretudo em decorrência da coleta indiscriminada e da devastação do seu ambiente de origem (KÄMPF, 2000).

Acredita-se que o uso destas plantas seja a principal opção terapêutica para a maioria da população. Em relação à comercialização, estima-se que cerca de US\$ 44 bilhões movimentam o mercado mundial de fitoterápicos. No Brasil a comercialização de fitoterápicos varia entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões (BRASIL, 2012a).

Um novo panorama biotecnológico em termos vegetais se vislumbra, transformando-se em grandes conquistas científicas, agronômicas e comerciais em muitas espécies vegetais. Não restam dúvidas de que nos próximos anos teremos grandes transformações ocasionadas pela cultura de plantas *in vitro* que favorecerão a sociedade como um todo (MARTINS; CARVALHO, 2012).

2.4 CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta biotecnológica que vem sendo aplicada e aperfeiçoada como alternativa aos problemas da conservação *ex situ*. Este tipo de manuseio supera as mais variadas barreiras decorrentes aos métodos

tradicionais de conservação, além de favorecer o intercâmbio de recursos genéticos vegetais livres de patógenos (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

Na conservação *in vitro*, os acessos são submetidos a ambientes físico-químicos que diminuem o metabolismo e reduzem o crescimento da planta, sem afetar a viabilidade, possibilitando intervalos maiores entre os subcultivos, reduzindo-se assim a mão de obra e o espaço necessários para a conservação. Além disso, através desta técnica é possível reduzir os custos com reagentes, como também, reduzir os riscos de contaminações por bactérias e/ou fungos (ALVES et al., 2010; LEMOS et al., 2002; MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010).

Em virtude do aumento ocupacional de áreas de vegetação naturais e da susceptível erosão genética notada em muitas espécies de plantas que denotam potencialidade medicinal ou alimentícia, torna-se notório a urgência de desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de conservação de germoplasma de plantas, de modo que ele esteja disponível para o aproveitamento futuro (SÁ; LÊDO; LÊDO, 2011).

No Brasil, uma das iniciativas pioneiras no que se refere à conservação de recursos genéticos de plantas medicinais *in vitro* foi à criação, em 1987, do banco de germoplasmas *in vitro* de plantas medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp). Em 2001, o banco foi ampliado visando à introdução *in vitro* de espécies medicinais da família Bignoniaceae com atividade antitumoral. Em 2010, o banco de germoplasma conserva também espécies medicinais nativas de outras famílias, como por exemplo, Amaranthaceae, Asteraceae e outras (ALVES et al., 2010).

O interesse das indústrias farmacêuticas pelos fitoterápicos está cada vez maior, conseqüentemente apresenta uma ameaça à conservação de plantas medicinais, da forma convencional como vem sendo consentida através do extrativismo (CAMILLO et al., 2009).

Para os mesmos autores supracitados, os dados sobre a comercialização de plantas medicinais apontam que mais de 50% das plantas nativas exportadas pelo Brasil são extraídas do seu ambiente de origem sem que haja menor preocupação com a sobrevivência destas espécies coletadas, muito menos com os ecossistemas envolvidos, sendo necessária a conservação destas plantas, fora do seu habitat natural.

Entende-se como conservação *in vitro* a manutenção de plantas cultivadas em condições mínimas de crescimento através de vários fatores intervenientes, tais

como temperatura, radiação fotossintética ativa e fotoperíodo, e bem como a adição de retardantes osmóticos e hormonais ao meio de cultura (CANTO et al., 2004).

Nestas condições, a conservação de germoplasmas *in vitro* pode ser realizada a partir de mudanças no ambiente de cultivo, o qual é diferente do tradicionalmente utilizado para promover o crescimento de células, tecidos e órgãos. Portanto, os meios de cultivos apropriados para a conservação de germoplasma possuem composição diferente dos demais, a fim de atender o objetivo de manter os acessos nos bancos e coleções pelo maior tempo possível entre subcultivos, sem comprometer a sobrevivência e a integridade dos materiais (ALVES et al., 2010).

A maioria dos estudos sobre conservação *in vitro* refere à utilização de baixas temperaturas, considerando temperaturas igual ou inferior a 20 °C, como principal tática para o crescimento mínimo (CARVALHO, 2013).

Dentre as principais estratégias para limitar o crescimento das plantas *in vitro* estão a redução da temperatura e da intensidade luminosa, redução nas concentrações de sais do meio de cultura, omissão de elementos nutritivos e a adição de agentes osmóticos, como manitol e sorbitol e inibidores de crescimento como o ácido abscísico (ABA) (MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010; SOUZA et al., 2009).

Pesquisa realizada por Lima-Brito et al. (2011) revelou que a conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* subsp. *Mucugensis* (sempre-vivas) pode ser feita à 18°C em meio de cultura contendo a metade da concentração do meio MS, 15g L⁻¹ de sacarose, por até 180 dias, sem subcultivo.

As variações na concentração de sais e volume do meio de cultura são condições que têm sido avaliadas na micropropagação e conservação *in vitro* de distintas espécies (ALVES et al., 2010; ASSIS et al., 2012; DEZAN et al., 2012; FARIA et al., 2007).

A conservação *in vitro* do *Cochlospermum regium* (algodão-do-campo), realizado por Camillo et al. (2009), foi possível desenvolver um protocolo eficiente para a conservação *in vitro* da espécie, mostrando-se viável desde que a espécie seja mantida em câmara de crescimento a 20°C em meio de cultivo WPM com metade da sua concentração. Sob estas condições os explantes mantiveram um crescimento mínimo e percentual de sobrevivência de 100%, após três meses de avaliação.

Estudo sobre propagação e conservação *in vitro* de vetiver, realizado por Santos, Arrigoni-Blank e Blank, (2012) constatou que a conservação *in vitro* da espécie é possível em meio MS semissólido com 25% dos sais MS e temperatura de 18°C por um período de 270 dias.

Pesquisa realizada por Carvalho et al. (2014) mostrou que a utilização do meio de cultura WPM na concentração normal e volume de 20 mL mostraram-se mais adequados para redução do crescimento das plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' conservadas *in vitro*.

Santos et al. (2012) afirmam que a redução das concentrações de sais do meio básico de cultivo é uma estratégia amplamente empregada para a conservação sob crescimento lento. No entanto, é necessário que as plantas conservadas estejam com vigor suficiente para restabelecer seu crescimento e potencial de propagação normal quando transferidas para o meio de propagação.

Para os mesmos autores supracitados, a redução dos sais contribui para redução de gastos devido à quantidade reduzida de sais empregada e uma potencialização no trabalho de manutenção do banco de germoplasma, uma vez que o mesmo meio de cultura pode ser aproveitado para outros acessos (SANTOS et al., 2012).

Inúmeros fatores afetam o cultivo *in vitro*, sendo os reguladores de crescimento um dos fatores mais importantes quando se trata de plantas medicinais, pois além de alterarem a morfogênese, também influenciam na produção de metabólitos secundários (ALVES et al., 2010). No entanto, na conservação *in vitro* não se faz necessário o uso dessas substâncias, uma vez que essa metodologia tem como principal objetivo o estabelecimento da condição de crescimento mínimo das plantas, visando prolongar o intervalo entre os subcultivos.

Com relação aos agentes osmóticos, tais como o manitol, sorbitol e sacarose, estes atuam sobre o crescimento das plantas, reduzindo o potencial osmótico do meio de cultura e, com isto, limitando a absorção de água e nutrientes para o explante e, conseqüentemente, o desenvolvimento das plantas (GARCIA, 2013).

Estudo realizado por Carvalho et al. (2016) para avaliar o desempenho de genótipos mantidos em diferentes ambientes de cultivo *in vitro*, relacionados a temperatura e a luminosidade, evidenciou que o ambiente de cultivo com 22±1°C, intensidade luminosa de 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 12h de fotoperíodo foi o mais

recomendado para reduzir o crescimento das plantas conservadas *in vitro* prolongando o tempo de subcultivo e mantendo as plantas viáveis.

Neste sentido, Carvalho (2013) considera as coleções de plantas *in vitro* como uma cópia de segurança promissora para o estabelecimento de germoplasma vegetal fora do seu habitat de origem (*ex situ*). Todavia, a diminuição do crescimento das plantas, sem afetar sua finalidade posterior de regeneração é uma das metodologias mais pesquisadas para tornar a conservação *in vitro* eficaz.

3 CAPÍTULO 1

MULTILICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Mentha x villosa* Huds

MULTILICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Mentha x villosa* Huds

Autora: Rafaela Fonseca Lopes

Orientador: Weliton Antônio Bastos de Almeida

RESUMO:

Mentha x villosa Huds, conhecida popularmente como hortelã miúda, é uma planta medicinal muito utilizada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. Através das metodologias de cultivo de tecidos vegetais tem sido possível a multiplicação e conservação *in vitro* de fontes vegetais, possibilitando o desenvolvimento comercial de várias espécies. Neste sentido, objetivou-se no presente trabalho estabelecer um protocolo de multiplicação e conservação *in vitro* da *Mentha x villosa* Huds, visando à disponibilização de mudas para gestores de saúde e estabelecimento de farmácias vivas. Para isso, segmentos nodais retirados de plantas cultivadas em campo foram devidamente desinfestados e inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e mantidos em sala de crescimento sob condições controladas. Após 21 dias, os explantes responsivos foram reintroduzidos em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, suplementado 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Com 45 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para frascos contendo o meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e BAP nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente causalizado, com 6 repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco contendo três segmentos nodais. Após 60 dias, foram avaliados o percentual de explantes responsivos (explantes com desenvolvimento de brotos) e o número de brotações por explantes. Posteriormente, as plantas foram aclimatizadas, por 30 dias, sendo avaliada a porcentagem de sobrevivência ao final da aclimatização. Algumas plantas oriundas da micropopagação foram utilizadas em ensaios de conservação *in vitro*, onde segmentos nodais com aproximadamente 1,5 cm, foram inoculados em meio de cultura MS em diferentes concentrações (MS, MS/2 e MS/4) e com distintas concentrações de sacarose (15 e 30 g L⁻¹), mantidos em câmara climatizada BOD sob temperatura de 20°C. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram avaliadas, utilizando as seguintes variáveis: altura da planta, número de folhas senescentes, número de ramificações e número de raízes. Após 120 dias, foi realizada outra avaliação para verificar a viabilidade das plantas em relação aos tratamentos, com as variáveis descritas anteriormente. A adição do BAP no meio de cultura proporcionou um aumento na multiplicação *in vitro* de brotos de hortelã, com máxima proliferação na concentração de 1,5 mg L⁻¹. Na aclimatização observou-se sobrevivência de 100% das plantas. Os resultados indicam que é possível a conservação *in vitro* de plantas de hortelã sem subcultivar por um período de 120 dias, utilizando o meio MS a 1/4 de sua concentração e adição de 30 g L⁻¹ de sacarose.

Palavras-chave: Hortelã Rasteira. Planta Medicinal. Micropopagação. Crescimento mínimo.

IN VITRO MULTIPLICATION AND CONSERVATION OF *Mentha x villosa* Huds

Author: Rafaela Fonseca Lopes

Advisor: Weliton Antônio Bastos de Almeida

Abstract:

Mentha x villosa Huds, commonly known in Brazil as *hortelã miuda* (small mint), is a medicinal plant widely used to treat gastrointestinal disorders. Vegetal tissue culture enables the *in vitro* multiplication and conservation of many species that are or might become commercially important. Thus this research aims to develop an *in vitro* multiplication and conservation protocol of *Mentha x villosa* Huds in order to supply health managers and pharmacies belonging to the *Farmácia Viva* project with seedlings. To achieve our objective nodal segments of plants growing in the fields were disinfected and transferred to Petri dishes containing MS culture medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, and kept under controlled conditions. After 21 days the responsive explants were transferred to Petri dishes containing the same culture medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ BAP. On the 45th day the explants were transferred to flasks with MS medium supplemented with sucrose and BAP in the concentrations of 0.0; 0.5; 1.0; and 1.5 mg L⁻¹. A completely randomized factorial experiment with 6 repetitions consisting of 6 flasks with 3 nodal segments each was designed. After 60 days the percentage of responsive explants (explants with shoot development) and the number of shoots per explant were evaluated. Plants were acclimatized for 30 days before survival assessment. Some micropropagated plants were used for *in vitro* conservation experiments during which nodal segments of approximately 1.5 cm were inoculated in different concentrations of MS medium (MS, MS/2 e MS/4) and sucrose (15 e 30 g L⁻¹). The flasks were kept in an acclimatization BOD chamber at 20°C. On the thirtieth culture day the following variables were evaluated: height, number of senescent leaves, and number of branches and roots. After 120 days plant feasibility in different treatments was determined using the same variables mentioned above. The addition of BAP to the culture medium increased the *in vitro* multiplication of mint shoots, maximum proliferation being obtained in the concentration of 1,5 mg L⁻¹. Hundred percent survival was observed during acclimatization. Our results show that *in vitro* conservation of mint plants without cultivars during 120 days is a feasible process when using MS medium a quarter of its concentration with addition of 30 g L⁻¹ sucrose.

Keywords: Mint. Medicinal Plant. Micropopagation. Minimum Growth.

INTRODUÇÃO

Mentha x villosa Huds é uma planta de fácil cultivo, porém não suporta deficiência de água (CARRIONDE, 1996; CASTRO; CHEMALE, 1995). O cultivo da hortelã rasteira se concentra no Brasil em regiões do Sul do país, onde os dias são longos e clima ameno (LORENZI; MATOS, 2008). A região sul do Brasil merece destaque devido à produção em larga escala de hortelã, conferindo ao país o título de maior exportador mundial de óleo essencial, entretanto passou a grande importador devido às baixas produções tecnológicas (LORENZI; MATOS, 2008).

A manutenção da variabilidade genética de espécies vegetais é de extrema importância, pois evita a erosão genética intensa causada pelo extrativismo ou mesmo pela seleção de poucos genótipos (SILVEIRA et al., 2009). No Brasil as plantas medicinais são colhidas através do extrativismo e as que estão sendo cultivadas encontram-se no estágio inicial de domesticação. Este extrativismo dispensa o cultivo sistematizado, provocando degradação do meio ambiente, gera baixa qualidade do material vegetal, ocasiona variação do produto e coloca em risco a perpetuação das espécies (CHAVES, 2001).

Considerando-se tais limitações, torna-se fundamental o desenvolvimento de estratégias, que tenham como propósito a produção de mudas homogêneas, gerando biomassa em larga escala para estudos químicos e farmacológicos, além de servir para proteger o germoplasma existente (LIMA et al., 2007; OKSMAN-CALDENTEY et al., 2004). Neste contexto, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais tem se mostrado uma estratégia promissora na exploração sustentável das espécies medicinais (MORAIS et al., 2012).

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a micropopagação vegetal, merece destaque pela produção rápida de materiais propagativos, livres de doenças e pragas, com elevada qualidade genética em tempo reduzido. Por meio dessa técnica é possível produzir grandes quantidades de plantas uniformes ao longo de todo o ano, sob condições controladas, sem a influência das variações climáticas (GRIOLLI, 2008; LEVY; LEVY, 1991; ROCHA, 2009). Em virtude das limitações aos métodos convencionais de conservação *ex sito* e *in sito*, tecnologias alternativas, como a conservação *in vitro* tem sido desenvolvidas e aperfeiçoadas (BARRUETO CID, 2010).

A conservação *in vitro* é uma técnica eficaz de preservação de germoplasmas em médio período de tempo, de baixo custo, de simples manuseio e que expressa como principais vantagens, comparando com a conservação no campo, o reduzido espaço de armazenamento, rápida multiplicação de material vegetal livre de pragas e patógenos presentes no campo e independência das circunstâncias climáticas (SANTOS et al., 2011).

Tendo em vista a inserção de terapias alternativas através das plantas medicinais no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, assim como o interesse das indústrias farmacêuticas pela *Mentha x villosa* Huds, não só pela produção de óleo essencial, como também pelo seu valor medicinal, apontam a necessidade de produção em larga escala e conservação desta planta. Dessa forma, objetivou-se no presente trabalho estabelecer um protocolo de multiplicação e conservação *in vitro* da *Mentha x villosa* Huds, visando à disponibilização de mudas para gestores de saúde e estabelecimento de farmácias vivas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da Faculdade Maria Milza-FAMAM. Como material vegetal, foram utilizados segmentos nodais proveniente de plantas de *Mentha x villosa* Huds.

Estabelecimento *in vitro*

Os segmentos nodais foram lavados em água corrente e posteriormente passaram por um processo de desinfestação, onde inicialmente foram imersos em álcool a 70% durante 1 minuto, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOH) e água na proporção de 1:1, sob agitação durante 15 minutos e, em seguida, passaram por uma tríplice lavagem em água estéril em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, os explantes foram introduzidos em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ do fungicida Carbomax[®] solidificado com ágar (0,7%) e pH ajustado em 5,8. Foram utilizados 3 a 4 explantes por placa. Após a inoculação, os explantes foram mantidos, durante 21 dias, em sala

de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas e $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

Multiplicação *in vitro*

Os explantes responsivos que não apresentaram contaminação foram reintroduzidos em placas de Petri contendo meio de cultura MS, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP). Após 45 dias de cultivo, segmentos nodais das plantas oriundas das brotações, com aproximadamente 1,5 cm de tamanho, foram transferidos para frascos contendo o meio de cultura MS, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e BAP nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Ao final dos 60 dias, foram avaliados o percentual de explantes responsivos (explantes com desenvolvimento de brotos) e o número de brotações por explantes. Após a etapa de multiplicação, os explantes foram transferidos para meio de cultura MS sem adição de BAP durante 30 dias, visando o desenvolvimento de raízes e posterior aclimatização dos materiais.

Aclimatização

Nesta etapa, as plantas foram retiradas dos frascos e as raízes lavadas em água corrente com o objetivo de retirar o excesso do meio de cultura. Posteriormente, foram transferidas para garrafas plásticas do tipo PET (2 litro), com quatro pequenos furos na base para escoar o excesso de água. A transferência das plantas do ambiente *in vitro*, que apresenta alta umidade em decorrência do ar, assepsia, iluminação, temperatura e fotoperíodo controlados, para o ambiente *ex vitro* deve ser gradual (BRITO, 2007). Isso foi conseguido por meio da disposição das plantas dentro da garrafa PET, com abertura gradual das tampas. Para isso, as garrafas foram cortadas na metade de sua altura para facilitar a adição do substrato (terra vegetal autoclavada) e a inoculação da planta e, em seguida, foram novamente fechadas por sobreposição das metades. No primeiro dia após a aclimatização, no período matutino, retirou-se a tampa da garrafa por 10 minutos, no segundo dia por 20 minutos e foi aumentando-se o tempo gradualmente até a retirada completa da mesma, quando as mudas já estavam adaptadas ao meio ambiente. Após 30 dias, as mudas encontravam-se totalmente aclimatizadas.

Durante o período de aclimatização, as plantas foram irrigadas com auxílio de um borrifador, de forma a manter o substrato úmido. Esta exposição progressiva das plantas às condições ambientais teve o objetivo de minimizar o estresse e aumentar o número de plantas sobreviventes. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada ao final da aclimatização.

Conservação *in vitro*

Plantas oriundas da micropopagação foram utilizadas em ensaios de conservação *in vitro*, onde explantes nodais com aproximadamente 1,5 cm, foram inoculados em meio de cultura MS nas seguintes concentrações: MS, MS/2 e MS/4, com diferentes concentrações de sacarose (15 e 30 g L⁻¹) e mantidos em câmara climatizada BOD na temperatura de 20°C, com fotoperíodo de 16 horas e 40 µM m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa.

Após 30 dias de cultivo foi realizada a primeira avaliação utilizando as seguintes variáveis: altura de planta (AP), em cm, número de folhas senescentes (NFS), número de ramificações (NRF) e número de raízes (NR). Posteriormente, foi realizada uma segunda avaliação aos 120 dias de cultivo, para verificar a viabilidade das plantas em relação aos tratamentos, com as variáveis descritas anteriormente.

Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental utilizado no experimento da etapa de micropropagação foi inteiramente casualizado, analisando cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹), com 6 repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo três segmentos nodais.

Na conservação *in vitro*, o experimento foi estabelecido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 x 2 x 2) do tipo parcela subdividida no tempo, analisando três concentrações dos sais do meio de cultura (MS, MS/2 e MS/4), duas concentrações de sacarose (15 e 30 g L⁻¹) em duas épocas de avaliações (30 e 120 dias).

Os dados resultantes das avaliações das plantas foram submetidos à análise variância (ANAVA). As médias dos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste F e Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis NFS, NRF e NR foram

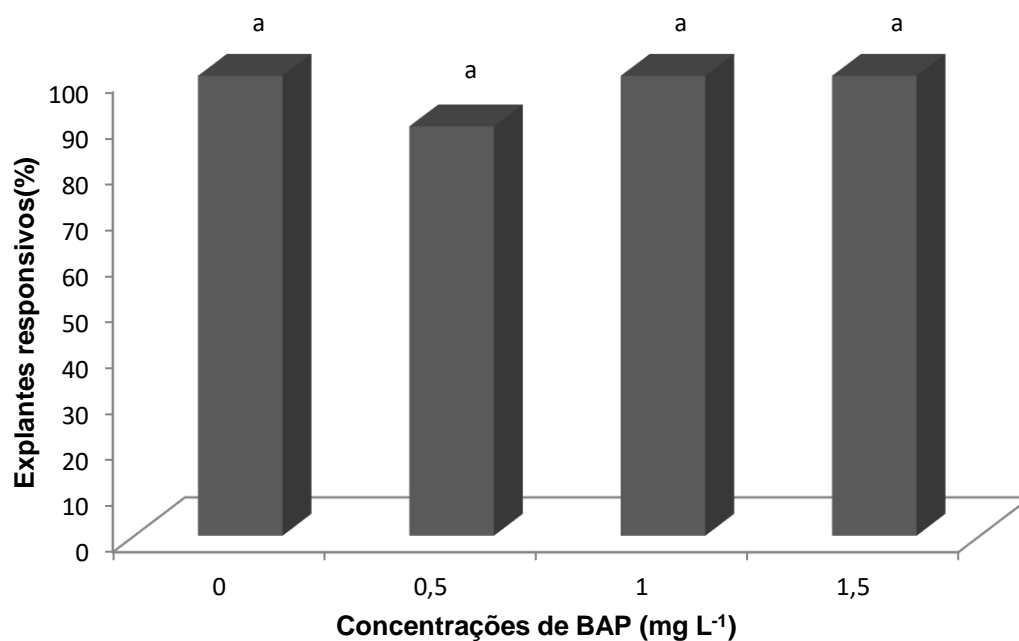
transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da ANAVA. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software estatístico SAS – statistical analysis system (SAS INSTITUTE, 2004).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Multiplicação *in vitro*

Na etapa de micropropagação, observou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos para o percentual de explantes responsivos (múltiplas brotações), sendo de 100% nas concentrações de 0,0; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹ de BAP (Figura 1). Este resultado sugere que o nível hormonal endógeno, em função da utilização da citocinina BAP na etapa de estabelecimento dos explantes foi suficiente para assegurar a retomada da diferenciação celular, com conseqüente desenvolvimento da parte aérea. Diferentemente desta resposta, Morais, Asmar e Luz (2014), trabalhando com plantas do mesmo gênero (*Mentha x piperita*) o BAP (principalmente na concentração de 4 mgL⁻¹). Da mesma forma, efeito relevante da citocinina BAP foi observado por Brito (2007), trabalhando com a babosa (*Aloe vera* L.), onde verificou que no processo de desenvolvimento *in vitro* da planta, as brotações apresentaram um bom desempenho tanto no desenvolvimento da parte aérea quanto no radicular, apresentando uma percentagem de 100% de plantas enraizadas. Apesar da resposta positiva, na ausência de BAP, para o desenvolvimento da parte aérea dos brotos, constatou-se que essa concentração (0,0 de BAP) não favoreceu à elevada formação de gemas adventícias, como verifica-se na Figura 2.

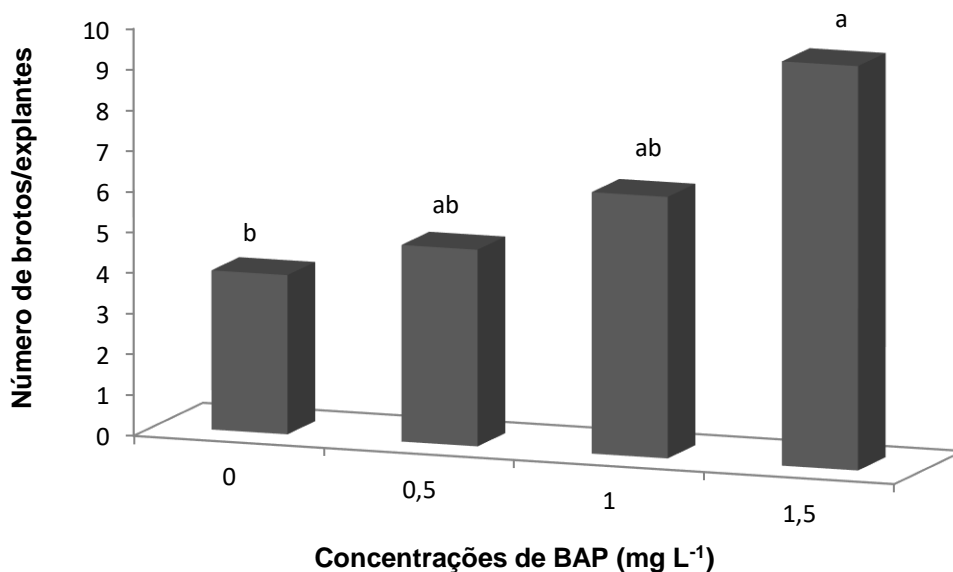
Figura 1: Porcentagem de explantes responsivos em função das concentrações de BAP.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

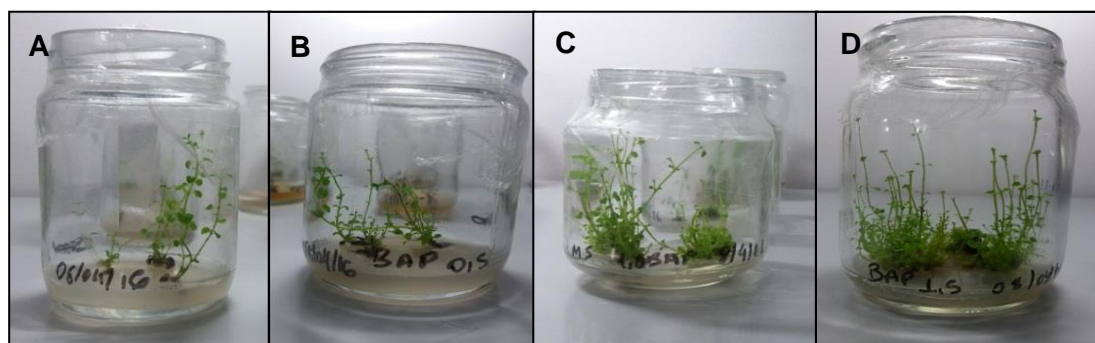
Em relação ao número de brotos por explantes, o meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP foi aquele que apresentou a melhor resposta, com média de 9,2 brotos. Por outro lado, a ausência deste regulador vegetal resultou em baixa produção de brotos (média de 4 brotos/explantes) (Figuras 2 e 3). Neste sentido, a adição da citocinina BAP foi um fator determinante para o incremento da taxa de multiplicação *in vitro* da espécie.

Figura 2: Número de brotos/explante em função das concentrações de BAP.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Figura 3: Plantas de *Mentha x villosa* Huds cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP: (A) 0,0 mg L⁻¹; (B) 0,5 mg L⁻¹; (C) 1,0 mg L⁻¹ e (D) 1,5 mg L⁻¹.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A citocinina BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para viabilizar a multiplicação *in vitro* em diversas espécies, sendo apontada em vários trabalhos como excelente fitoregulador. Pode-se citar como exemplo dessa eficácia a multiplicação de brotações de *Mentha arvensis* L. (PHATAK; HEBLE, 2002), *Amburana acreana* (FERMINO JÚNIOR; PEREIRA, 2012) e *Mimosa caesalpinifolia* (BEZERRA et al., 2014). Os resultados descritos nessas espécies, assim como no presente trabalho, indicam que o aumento na concentração desse regulador (BAP) foi decisivo para o aumento do número de brotações.

Resultado semelhante ao observado neste trabalho foi encontrado por Asmar et al. (2012), onde utilizou-se concentrações de BAP no cultivo *in vitro* de brotos de *Lippia alba* e evidenciaram que a concentração de 1,5 mg L⁻¹ de BAP promoveu a multiplicação da espécie. Estudo realizado por Navroski et al. (2014), constatou que na multiplicação *in vitro* da segurelha (*Satureja hortensis* L.), a citocinina BAP induziu o aumento de brotações da espécie. No que se refere ao efeito do BAP no cultivo *in vitro* de plantas medicinais, Vicente, Almeida e Carvalho (2009) trabalhando com *Vernonia condensata* Baker, constataram que a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP foi a que proporcionou a melhor resposta em relação ao número de brotos por explantes.

Nesta perspectiva, podemos verificar que o efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações está associado com a influência desse regulador de crescimento na divisão celular e na quebra de dominância apical (BRUM; SILVA; PASQUAL, 2002).

Na etapa de aclimatização, observou-se que 100% das plantas sobreviveram e apresentaram desenvolvimento satisfatório, independente da concentração de BAP utilizada na etapa de multiplicação (Figura 4), o que comprova a eficiência da metodologia utilizada neste trabalho para aclimatização das plantas.

Resultados semelhantes foram observados nas espécies medicinais alumã (*Vernonia condensata* Baker) e anador (*Justicia pectoralis* Jack), onde Vicente, Almeida e Carvalho (2009) observaram que na fase de aclimatização houve 100% de sobrevivência, independente da concentração de BAP utilizada. Da mesma maneira, Brito (2007) relatou que as mudas de babosa (*Aloe vera* L.) enraizadas *in vitro* apresentaram 100% de sobrevivência na etapa de aclimatização, porém não utilizou garrafas do tipo PET, mas copos plásticos descartáveis (30 mL). Além das espécies medicinais mencionadas, verificou-se que em palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) a taxa de sobrevivência das plantas levadas ao ambiente *ex vitro* na etapa de aclimatização foi de 100%, após um período de 30 dias (SILVA, 2017).

Conforme Rocha et al. (2008) a aclimatização é a etapa mais crítica do cultivo *in vitro* e pode comprometer a produção das mudas de algumas espécies, uma vez que as plantas são expostas às condições ambientais, sofrendo variações drásticas, sendo a perda de água um dos principais problemas. Nesse sentido, a obtenção de microplantas com as raízes bem desenvolvidas é de suma importância para a sua

existência e crescimento em novas condições ambientais, como as correspondentes na aclimatização (PIO et al., 2002).

A metodologia utilizada neste trabalho para a aclimatização das microplantas de hortelã mostrou-se eficiente e pode ser recomendada para plantas oriundas da micropopagação desta espécie medicinal. Além disso, constitui-se em uma alternativa de reciclagem para as garrafas do tipo PET, contribuindo assim para a sustentabilidade ambiental.

Figura 4: Plantas de *Mentha x villosa* Huds oriundas do cultivo *in vitro*, acondicionadas em garrafas do tipo PET, contendo terra vegetal, durante a etapa de aclimatização.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Conservação *in vitro*

Na tabela 1 encontram-se os efeitos dos fatores isolados e da interação entre eles: concentrações do meio de cultura MS, concentrações de sacarose e épocas de avaliação.

Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis: altura de planta (AP), em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de ramificações (NRF) e número de raízes (NR) de plantas de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio				
		AP	NFV	NFS	NRF	NR
Épocas (E)	1	6714,07 ^{ns}	1268,45 [*]	79,14 ^{ns}	522,68 ^{ns}	0,10 ^{ns}
Meios (M)	2	687,30 ^{ns}	148,44 ^{ns}	9,56 ^{ns}	48,90 ^{ns}	2,25 ^{ns}
Sacarose (S)	1	51,71 ^{ns}	17,47 ^{ns}	8,20 ^{ns}	9,36 ^{ns}	1,00 ^{ns}
erro 1	2	495,93	56,71	17,75	30,45	3,03
E x M	2	495,93 ^{**}	56,71 ^{**}	17,75 ^{**}	30,45 ^{**}	3,03 ^{**}
E x S	1	4,21 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,96 ^{ns}	2,80 ^{ns}	0,76 ^{ns}
M x S	2	154,65 ^{**}	36,31 ^{**}	2,23 ^{ns}	5,10 ^{**}	9,17 ^{**}
E x M x S	2	135,29 ^{**}	42,25 ^{**}	1,15 ^{ns}	11,24 ^{**}	0,08 ^{ns}
erro 2	206	23,03	2,83	1,00		0,37
CV (%)		39,73	19,42	41,46	28,37	19,52
Média Geral		12,08	86,03	7,09	15,74	9,83

GL grau de liberdade, **, * significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Para a característica altura de planta (AP), observou-se que com 30 dias de cultivo não houve diferença significativa entre as concentrações do meio de cultura MS, assim como entre as concentrações de sacarose analisadas. No entanto, após 120 dias a menor média de AP foi observada utilizando o meio de cultura MS a 1/4 de sua concentração e adição de 30 g L⁻¹ de sacarose, conforme podemos observar na tabela 2. Este resultado é um indicativo de que a menor concentração de nutrientes no meio de cultura MS associada a uma maior concentração de sacarose foi favorável para a condição de crescimento mínimo, o que é desejável, visto que um dos principais objetivos da conservação *in vitro* é aumentar o tempo de permanência da planta no mesmo meio de cultura, prolongando, conseqüentemente, o intervalo entre os subcultivos.

Tabela 2. Valores médios de altura de planta (cm) de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias.

Concentrações do meio MS	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	
	15	30
30 dias		
1/1	3,92 aA	5,25 aA
1/2	5,98 aA	7,24 aA
1/4	5,66 aA	6,64 aA
120 dias		
1/1	13,21 bB	16,90 bA
1/2	20,30 aB	24,15 aA
1/4	14,58 bA	9,02 cB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

O resultado obtido no presente trabalho, em relação a variável altura da planta, contrapõe com os encontrados por Lima (2016) na conservação *in vitro* de *Orthophtum mucugense* no qual aponta que quanto maior a concentração de sacarose utilizada no meio de cultura, maior será o comprimento da parte aérea das plantas cultivadas *in vitro*. Em estudo com a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), Oliveira (2011) também evidenciou maior incremento da parte aérea de plantas cultivadas *in vitro* quando aumentou a concentração do carboidrato. Carvalho et al. (2014) destaca que podem ocorrer variações entre plantas de um mesmo genótipo conservadas *in vitro*, por isso que são necessários estudos com outros genótipos para definir protocolos de conservação *in vitro*. Corroborando com os autores supracitados, Watt et al. (2000) ressaltam que espécies e cultivares possuem características genéticas próprias, dessa forma, o sucesso da tecnologia de crescimento lento requer o desenvolvimento de protocolos específicos para cada um deles.

Santos et al. (2012) observou que ao reduzir a concentração dos sais do meio MS para 1/4 da sua concentração total plantas de vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty] podem ser mantidas *in vitro* por um período de 270 dias, corroborando com os resultados evidenciados no presente estudo. Lima-Brito et al. (2011) confrontando os efeitos da sacarose, do sorbitol e do manitol na conservação *in vitro* de *Comanthera mucugensis* subsp. *mucugensis*, observaram que as menores médias para comprimento da parte aérea na espécie ocorreu em concentrações maiores de sacarose (45 e 60 g L⁻¹).

Visando estabelecer um banco de germoplasma *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, Alves et al. (2010) verificou que o meio MS na metade da sua concentração total, com 20 gL⁻¹ de sacarose e 40 gL⁻¹ sorbitol na temperatura de 16°C (±1°C) favoreceu o crescimento mínimo das plantas cultivadas *in vitro*, prorrogando o subcultivo por um período de seis meses. Assim como o autor supracitado, Amaral et al. (2007) verificou que plantas de amarílis (*Hippeastrum Herb.*) conservadas *in vitro* mantiveram-se vigorosas por um período de 90 dias utilizando metade da concentração do meio de cultura MS e 10 g L⁻¹ de sacarose quando mantidas na temperatura de 18°C. Neste sentido, observa-se que a redução das concentrações de sais do meio básico de cultivo e a redução da temperatura é uma estratégia amplamente empregada para a conservação sob regime de crescimento mínimo sendo utilizada por diversos autores conforme podemos verificar nos trabalhos citados anteriormente.

Vale destacar que as plantas cultivadas *in vitro* precisam estar vigorosas e em condições favoráveis para a propagação no final do período de conservação proposto. Neste sentido, com relação à variável número de ramificações, após 30 dias de cultivo as maiores médias para esta característica foram observadas utilizando o meio de cultura MS na sua concentração normal e na metade de sua concentração, com adição de 15 g L⁻¹, não ocorrendo diferenças entre os valores médios dessa característica com relação às concentrações do meio MS quando se utilizou 30 g L⁻¹ de sacarose. Já com 120 dias, as maiores médias de NRF foram observadas utilizando o meio MS na sua concentração total e metade da sua concentração com 30 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 3), o que é vantajoso, pois no que se refere ao objetivo proposto pela presente pesquisa, teoricamente as plantas de *Mentha x villosa* Huds oferecerão uma maior quantidade de explantes para serem utilizados quando houver a necessidade de realizar a propagação *in vitro* dessa espécie para disponibilizar mudas para gestores de saúde, assim como para implantação de farmácias vivas.

Tabela 3. Valores médios do número de ramificações de plantas de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias.

Concentrações do Meio MS	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	
	15	30
30 dias		
1/1	3,75 aA	2,25 aA
1/2	2,45 abA	3,65 aA
1/4	1,05 bA	3,10 aA
120 dias		
1/1	25,45 aB	38,75 aA
1/2	25,95 aB	42,75 aA
1/4	13,45 bA	10,60 bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Resultados encontrados por Rocha (2010) corroboram com os encontrados no presente estudo, pois verificou que ao final do período proposto de 360 dias o incremento do número de folhas verdes ocorreu quando utilizou-se o meio MS na metade de sua concentração total combinado com a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, na temperatura de 21°C (±2°C). Tal como o autor citado anteriormente, Lima (2016) observou que plantas de *Orthophytum mucugese* Wand. apresentaram maiores números de folhas verdes quando utilizando-se 1/3 da concentração de sais do meio de cultura MS e 45 g L⁻¹ de sacarose, utilizando a temperatura de 25°C por um período de 60 dias. Estes resultados corroboram com os encontrados na presente pesquisa, pois à medida em que a concentração de sais do meio de cultura MS foi reduzida as plantas necessitaram de concentrações maiores de carboidrato.

Na conservação *in vitro*, plantas mantidas por períodos de tempo prolongados, muitas vezes, iniciam a senescência, que pode ser ocasionada por vários fatores, tais como a exaustão do meio de cultura e produção de etileno ou mesmo devido ao efeito fitotóxico do inibidor de crescimento, que pode culminar na morte das plantas (NEPONUCENO, 2012).

De acordo com os resultados encontrados para número de folhas senescentes, podemos observar que após 30 dias de cultivo as menores médias do NFS ocorreu utilizando o meio de cultura MS na sua concentração normal. No entanto, após 120 dias de cultivo as menores médias do NFS foram observadas nas

plantas cultivadas em meio MS a 1/4 de sua concentração (Tabela 4). A análise da variável número de folhas senescentes é importante para os trabalhos de conservação *in vitro*, uma vez que serve como indicativo do estágio fisiológico da planta, pois expressa o processo de envelhecimento da planta (CARVALHO et al., 2016).

Tabela 4. Valores médios do número de folhas senescentes de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS durante 30 e 120 dias.

Concentrações do meio MS	Épocas de cultivo (dias)	
	30	120
1/1	1,60 bB	10,20 bA
1/2	2,80 abB	15,15 aA
1/4	4,02 aA	5,22 cA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Segundo Canto et al. (2004) e Neponuceno (2012) a senescência não é o que se espera na conservação *in vitro*, pois requer que seja efetuado o subcultivo para recuperação do vigor da planta, objetivando sua capacidade de regeneração. Uma vez que, a senescência foliar ocasiona depreciação e destruição de tecidos e órgãos foliar, provocando perda da energia potencial da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Com 30 dias de cultivo não houve diferenças entre as concentrações do meio MS com relação ao número de raízes. Entretanto com 120 dias as maiores médias observadas para esta característica foi quando se utilizou o meio MS na sua concentração total e metade de sua concentração (Tabela 5). Pesquisa realizada por Menezes (2014) sobre conservação *in vitro* de três espécies de orquídeas (*Catasetum macrocarpum*, *Oeceoclades maculata* e *Polystachya estrellensis*), onde avaliou-se as concentrações de sais do meio MS (100, 75, 50 e 25%) e temperatura (18 e 25°C) do ambiente de cultivo, verificou que não houve diferenças significativas com relação as concentrações do meio de cultura MS para a espécie *Polystachya estrelenses*, com 100% de enraizamento para todos os tratamentos.

Tabela 5. Valores médios do número de raízes de plantas de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de meio de cultura MS durante 30 e 120 dias.

Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	Épocas de cultivo (dias)	
	30	120
1/1	8,32 aB	10,95 aA
1/2	8,48 aA	9,48 aA
1/4	7,88 bB	9,00 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Em relação aos valores médios do número de raízes em função das concentrações do meio de cultura e de sacarose, observou-se as maiores médias do NR quando as plantas foram cultivadas em meio de cultura MS na metade de sua concentração e adição de 30 g L⁻¹ de sacarose, assim como quando utilizou-se 15 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura MS na sua concentração normal e a 1/4 de sua concentração (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios do número de raízes de plantas de *Mentha x villosa* Huds, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose.

Concentrações do Meio MS	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	
	15	30
1/1	10,52 aA	8,75 aA
1/2	7,25 bB	10,70 aA
1/4	10,35 aA	6,52 bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: dados da pesquisa, 2017.

Assim como no presente trabalho, Alves et al. (2010) pesquisando sobre a influência de diferentes meios de cultura no crescimento mínimo de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, constataram que nenhum tratamento utilizando combinações do meio de cultura MS, sacarose, sorbitol e pantotenato de cálcio inibiu a formação de raízes, ocorrendo 100% de enraizamento em explantes de *P. glomerata* nas condições do experimento.

Utilizando temperatura mais elevada (27°C ±1°C), Faria et al. (2006) verificaram que é possível conservar sob crescimento reduzido plantas de *Passiflora*

giberti N. E. Brow. com bom desenvolvimento radicular e número de folhas satisfatórias em meio de cultura MS suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 20 g L⁻¹ de sorbitol quando cultivadas por um período de 120 dias. Neste sentido, para Camolesi et al. (2010) a presença de raízes pode sugerir que as plantas estão se desenvolvendo normalmente ou que as condições de cultivo não estão gerando restrições que possam prejudicar seu desenvolvimento posteriormente.

A partir da conservação *in vitro* de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* via crescimento lento, Silva e Scherwinski-Pereira (2011) verificaram que as espécies podem ser conservadas durante seis meses em meio MS, sem perder a capacidade de regeneração e sem alterações morfológicas.

Os resultados observados no presente trabalho evidenciaram uma variação nas características das plantas em função dos fatores avaliados nas duas épocas (30 e 120 dias), sendo estes: meio de cultura e concentração de sacarose. No entanto, de forma geral, observou-se que a fonte de carbono utilizada no presente estudo influenciou significativamente a maioria das características estudadas. Neste sentido, conforme Carvalho (2013) as variáveis observadas nas plantas devem ser analisadas e correlacionadas paralelamente nas avaliações, com o objetivo de se estabelecer uma condição de crescimento mínimo. No entanto, estas condições podem sofrer variação de uma espécie para outra e dependerão, além disso, do genótipo utilizado, como também dos procedimentos adotados pelo pesquisador na conservação *in vitro*.

Em relação às concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, observou-se que o meio de cultura MS na metade da sua concentração e a 1/4 da sua concentração total acrescido 30 g L⁻¹ de sacarose proporcionaram o menor desenvolvimento *in vitro* da *Mentha x villosa* Huds. Neste sentido, é possível inferir que na presente pesquisa, mesmo com a diminuição das concentrações salinas do meio de cultura MS para 50 e 25%, o que favorece consideravelmente o aspecto econômico, as plantas necessitaram de uma concentração maior de carboidrato para se manterem viáveis nas condições de crescimento lento.

Embora não haja um protocolo específico para todas as espécies, o que se pretende no manejo das grades coleções de plantas *in vitro* é a possibilidade de se obter uma metodologia que possa ser utilizada para o maior número de acessos possíveis, favorecendo o planejamento dos subcultivos das plantas conservadas *in*

in vitro sem afetar sua estabilidade genética, como também otimizando o trabalho em ambiente laboratorial (CARVALHO et al., 2016).

CONCLUSÕES

- A adição de 1,5 mg L⁻¹ de BAP no meio de cultura MS, na fase de multiplicação, proporcionou a máxima proliferação de brotos.
- A aclimatização de plantas oriundas do cultivo *in vitro* de *Mentha x villosa* Huds, utilizando garrafas do tipo PET possibilitou 100% de sobrevivência das plantas.
- Nas condições em que o trabalho foi executado o meio de cultura MS a 1/4 de sua concentração total, associado à adição de 30 g L⁻¹ de sacarose é uma condição viável para conservação *in vitro* de plantas de *Mentha x villosa* Huds por um período de 120 dias.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. B. N. et al. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.4, p.510-515, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000400016>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

AMARAL, L. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma indexado d três cultivares de amaríli (*Hippeastrum* Herb.). **Revista de Horticultura Ornamental**, v.13, n.2, p. 113-120, 2007. Disponível em: <<https://ornamentalhorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/viewFile/214/110>>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

ASMAR, S. A. et al. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) N. E. Brown]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.esp., p.149-153, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000500004>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In*: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-49, 2010.

BEZERRA, R. M. de F. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.38, n.5, Sept./Oct. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622014000500001>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

BRITO, C. F de. **Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.)**. Cruz das Almas, 2007. 43f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007. Disponível em: <<https://www1.ufrb.edu.br/pgcienciasagrarias/teste/category/18-ano-2007?download=23>>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de bap e ana na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p.1403-1409, dez., 2002. Disponível em: <<http://www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/53-edicao-especial-e2?download=966:edicooespecial2>>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

CAMOLESI, M. R. et al. Enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* sp.) em diferentes meios de cultivo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1446-1451, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1413-70542010000600013&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n.7, p.717-720, 2004. Disponível em: <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/6830>>. Acesso em: 07 mai. 2016.

CARVALHO, M. de J. S. **Adequação Da Condição De Crescimento Mínimo Para A Conservação *In Vitro* De Germoplasma De Citros**. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, BA, 2013. Disponível em: <<http://www.repositório.ufrb.edu.br/bitstream/123456789/795/1/Mariane%20de%20Jesus%281%29.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

CARVALHO, M. de J. da S. de . et al. Fatores que afetam a conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'. **Magistra**, Cruz das Almas- BA, v. 26, n. 2, p. 178-185, abri./jun. 2014. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/123456789/795/1/Mariane%20de%20Jesus%281%29.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2017.

CARVALHO, M. de J. da S. de . et al. Univariate and multivariate statistical analyses for *in vitro* conservation of citrus genotypes. **Acta Science Agronomy**, Maringá, v.38 n.1, jan./mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212016000100129>. Acesso em: 19 fev. 2017.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas; descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, p.180-183, 1995.

CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte**. Tese (doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, p.144, 2001. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/103304>>. Acesso em: 9 mai. 2015.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brow. **Revista Brasileira Fruticultura**, São Paulo, v.28, n. 2, p.267-270, ago. 2006. Disponível em: < <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=644644&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22C.%22&qFacets=autoria:%22C.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=2862>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; PEREIRA, J. E. S. Germinação e propagação *in vitro* de Cerejeira (*Amburana acreana* (ducke) a.c. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, v.22, n.1, p.1-9, 2012. Disponível em: < <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=929811&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22FERMINO%20JUNIOR,%22&qFacets=autoria:%22FERMINO%20JUNIOR,%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

GRIOLLI, P. R. Propagação de plantas ornamentais. In: PETRY, C. **Plantas ornamentais: aspectos para a produção**. 2ª. ed. Passo Fundo. Ed. Universidade de Passo Fundo, p. 59-69, 2008.

LEVY, L. W.; LEVY, P. E. Propagation masiva de piretro y guanto mediante el cultivo de tejidos. In: ROCCA W. M.; MROGISKI, L. A. **Cultivo em la agricultura**. Cali: CIAT, cap.29, p.651-662, 1991.

LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.669-71, 2007. Disponível em: < www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/download/577/487>. Acesso em: 10 mai. 2017.

LIMA, A. P. P. S. **Micropropagação e conservação *in vitro* de *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição**. Feira de Santana, 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Estadual de Feira de Santana, 2016. Disponível em: < <http://tede2.uefs.br:8080/handle/tede/358> >. Acesso em: 10 mai. 2017.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1354-1361, ago. 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000500007>. Acesso em: 10 mai. 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª. ed. Nova Odessa-SP. Instituto Plantarum. 2008. 544p.

MENEZES, T. S. A. **Conservação *in vitro* e Aclimação de Epidendroideae (orchidaceae) do Estado de Sergipe**. São Cristóvão, 2014. 43f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade)- Universidade Federal de Sergipe, 2014. Disponível em: <https://btdt.ufs.br/bitstream/tede/541/1/THAYS_SAYNARA_ALVES_MENEZES.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2017.

MORAIS, T.P.; ASMAR, S.A.; LUZ, J.M.Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.16, n.2, supl. I, p.350-355, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000500007>. Acesso em: 19 abr. 2017.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.1, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000100016>. Acesso em: 19 abr. 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

NAVROSKI, M. C. I. et al. Multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.16, n.1, p.117-121, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722014000100017&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 02 abr. 2017.

NEPONUCENO, C. F. **PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Martianthus leucocephalus* (MART. ex BENTH.) J.F.B. PASTORE**. 2012. 179f. Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica. Feira de Santana, 2012. Disponível em: <<http://www.ppgbot.uefs.br/teses-dissertacoes/downloads/68/propagacao-e-conservacao-in-vitro-de-martianthus-leucocephalus-mart-ex-benth-jfb-pastore.pdf>>. Acesso em: 15 Mai. 2017.

OKSMAN-CALDENTY K, I. D. Plant cell factories in the post-genomic era: newways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v.9, n. 9, p.433-440, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15337493>>. Acesso em: 15 Mai. 2017.

OLIVEIRA, T. G. de. **MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *CROTON ANTISYPHILITICUS* MART.** Botucatu. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/93500>>. Acesso em: 05 abr. 2017.

PIO, R. et al. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citros Tangerina sunki x Trifoliata English 63- 256 com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.1, p.66-70, 2002. Disponível em: < <http://www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/7-numero-1?download=38:volume-26-numero-1>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

ROCHA, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In JUNGHANS, T. G.: SOUZA, A. da S. (Ed). **Aspectos práticos da micropopagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p.121-152. Disponível em: < >. Acesso em: 15 abr. 2017.

ROCHA, M. A. C. **Multiplicação e conservação de Bromeliáceae Ornamentais**. Cruz das Almas, 2010. 99f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2010. Disponível em: < <https://www.repositorio.ufrb.edu.br/handle/123456789/548> >. Acesso em: 15 abr. 2017.

ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.3, p.769-774, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452008000300035>. Acesso em 14 dez. 2016.

SANTOS, M. C. et al . Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronomia**, v.42, n.3, p.735741, 2011. Disponível em: < <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/1205>>. Acesso em: 22 abr. 2017.

SANTOS, T. C. et al. CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ACESSOS DE VETIVER, *Chrysopogon zizanioides* (L.) ROBERTY (Poaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.6, p.963-970, nov./dec. 2012. Disponível em: < <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/14006>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.177-234, 2010. Disponível em: < <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=880901&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22COSTA,%20F.%22&qFacets=autoria:%22COSTA,%20F.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=8>>. Acesso em: 11 mai. 2016.

SILVA, M. M. de A. Micropropagação da palma forrageira variedade Miúda em meio de cultura simplificado. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.11,

n.2, p.25-29, jun. 2017. Disponível em: < <http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-11-2017/v-11-n-2-junho-2017/tca11205.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

SILVEIRA, D. G. **MICROPROPAGAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE CAROÁ [Neoglaziovia variegata (Arruda) Mez]**. 2009. 172f. Tese (Doutorado em Botânica)-Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-Ba, 2009. Disponível em < <http://www.ppgbot.uefs.br/teses-dissertacoes/downloads/64/micropropagacao-e-variabilidade-genetica-de-populacoes-naturais-de-caroa-neoglaziovia-variegata-arruda-mez.pdf>>. Acesso em 18 abr. 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª. ed. São Paulo: Artmed, 2013.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151605722009000200011&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 14 dez. 2016.

WATT, M. P. et al. *In vitro* storage of Eucalyptus grandis germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, n.2, p.161-164, 2000. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006447506869>>. Acesso em 14 dez. 2016.

4 CAPÍTULO II

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Vernonia Condensata* Baker

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Vernonia Condensata* Baker

Autora: Rafaela Fonseca Lopes

Orientador: Weliton Antônio Bastos de Almeida

RESUMO:

A espécie *Vernonia condensata* Baker, conhecida popularmente como alumã, é uma planta medicinal muito utilizada para sanar problemas gastrointestinais, tais como diarreia, constipação, dor no estomago e gases. Na realidade brasileira, as plantas medicinais não são cultivadas de modo conservacionista, aumentando o extrativismo das espécies. O uso de diferentes estratégias de conservação deve ser considerado como uma importante forma de preservar a biodiversidade. A conservação *in vitro* é uma estratégia que possibilita a manutenção de elevado número de acessos em um pequeno espaço físico, livre das intempéries e riscos que existem no campo. Dessa maneira, este trabalho tem por objetivo estabelecer condições de crescimento mínimo, visando o desenvolvimento de um protocolo de conservação *in vitro* da *Vernonia condensata* Baker, para serem utilizadas em pesquisas e inserção na saúde pública do Recôncavo da Bahia. Foram utilizados como explantes segmentos nodais de aproximadamente 1,5 cm de tamanho, provenientes de plantas de alumã previamente cultivadas *in vitro*. Estes explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS em diferentes concentrações (1/1, 1/2 e 1/4), suplementado com 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ de sacarose, mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C e em câmara BOD com temperatura de 20 ± 1°C. Em ambas as situações, o fotoperíodo foi de 16 h e 40 µmol⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições, em esquema fatorial (3 x 2 x 2 x 2) do tipo parcela subdividida no tempo. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram avaliadas, utilizando as seguintes variáveis: altura da planta, número de folhas verdes, número de folhas senescentes e número de raízes. Após 120 dias foi realizada outra avaliação para verificar a viabilidade das plantas em relação aos tratamentos, com as variáveis descritas anteriormente. Os melhores resultados foram observados no ambiente de cultivo com temperatura de 25°C, considerando a concentração do meio de cultura, o meio MS a 1/4 da sua concentração total e adição de 30 g L⁻¹ de sacarose foi o mais favorável à conservação *in vitro* da *Vernonia condensata* Baker, possibilitando a manutenção de plantas com número de folhas verdes satisfatórios e menor altura.

Palavras-chave: Alumã. Planta Medicinal. Cultivo *in vitro*. Crescimento Mínimo.

IN VITRO CONSERVATION OF *Vernonia Condensata* Baker

Author: Rafaela Fonseca Lopes

Advisor: Weliton Antônio Bastos de Almeida

ABSTRACT:

Vernonia condensata Baker, commonly known in Brazil as *alumã*, is a medicinal plant used to treat gastrointestinal disorders such as diarrhea, constipation, stomachache and flatulence. Medicinal plants in Brazil are not grown in a conservationist way and this behavior fosters extractivism. The use of different conservation strategies is an important tool for biodiversity preservation. *In vitro* conservation is a strategy that allows to grow a high number of accesses in a reduced, protected and free-of-risk space. Thus, the objective of this study was to assess minimum growth conditions in order to develop an *in vitro* conservation protocol for *Vernonia condensata* Baker to be used in research and in the public health system of the Recôncavo da Bahia. Explants consisted of 1.5 cm long nodal segments obtained from *in vitro* cultivated plants. They were inoculated in test tubes containing different MS culture medium concentrations (1/1, 1/2 e 1/4), and implemented with 15 g L⁻¹ and 30 g L⁻¹ sucrose. The test tubes were kept in a growth room at 25 ± 1°C and in a BOD chamber at 20 ± 1°C with a 16 hour light period of 40 μM m⁻² s⁻¹. The experimental design was completely randomized with 15 repetitions and a 3 x 2 x 2 x 2 factorial treatment. After 30 days the following variables were assessed: plant height, number of green leaves, number of senescent leaves and number of roots. After 120 days the influence of different treatments on plant feasibility was determined using the above listed variables. *In vitro* conservation of *Vernonia condensata* Baker, in terms of number of leaves and height, was best at 25°C with 1/4 MS medium and 30 g L⁻¹ sucrose.

Keywords: Medicinal Plant. *In Vitro* Culture. Minimum Growth.

INTRODUÇÃO

Vernonia condensata Baker, pertencente à família Asteracea, é popularmente conhecida como “boldo-baiano”, uma das espécies mais cultivadas em jardins e hortas no Brasil. Algumas plantas são chamadas de boldos, por isso o boldo-baiano apresenta alguns nomes que são conhecidos em diferentes regiões e são confundidos com algumas plantas já conhecidas tais como o alumã, figatil, boldo-do-chile, necroton e alcachofra (DA SILVA et al., 2013; LORENZI; MATOS, 2002; PIZZILO et al., 2011).

O gênero *Vernonia* pertence à família Asteracea e possui aproximadamente 1.500 espécies que têm sido utilizadas popularmente para tratar vários tipos de doenças, incluindo doenças de origens inflamatórias, verminoses, dor, diurese, câncer, e distúrbios gastrointestinais (DA SILVA et al., 2013). A espécie em estudo possui várias finalidades terapêuticas, podendo ser preparada de diversas formas como infusão, macerações, etc. O principal uso da planta se dá pelas folhas através dos chás (BRASIL, 2014).

Existe uma relevância econômica a cerca desta espécie medicinal, uma vez que faz parte da lista do “RENISUS”, que contém espécies vegetais com potencial para avanços na cadeia produtiva e gerar produtos fitoterápicos de interesse para o Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, é encontrada no formulário da Farmacopéia brasileira, onde está indicada para o tratamento de úlcera gástrica e dispepsia (BRASIL, 2009; BRASIL, 2011).

Em virtude da crescente ocupação de áreas de vegetação nativa e da sensível erosão genética notada em muitas espécies de plantas medicinais torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de conservação de germoplasma dessas espécies, de forma que ele esteja acessível para utilização futura (SÁ; LEDO; LEDO, 2011).

Neste sentido, a biotecnologia proporciona algumas vantagens e possibilidades de grande interesse como complemento ou alternativa de preservar espécies de plantas medicinais, a exemplo da conservação *in vitro*, que implica na manutenção de plantas sob crescimento mínimo (SOUZA et al., 2009).

A conservação *in vitro* de germoplasma vegetal, o material vegetal é mantido em condições controladas de temperatura, fotoperíodo e em meio de cultura que favoreça o crescimento lento dos acessos. É um método eficiente de preservação de

germoplasma em médio prazo, de baixo custo e que apresenta como principais vantagens, em comparação com a conservação no campo, o reduzido espaço de armazenamento, rápida multiplicação de material vegetal livre de pragas e patógenos presentes no campo e independência das condições climáticas (SANTOS et al., 2011).

Dentre as principais estratégias para reduzir o desenvolvimento das plantas *in vitro* está a redução da temperatura e da intensidade luminosa, redução nas concentrações salinas do meio de cultura, redução de nutrientes, a adição de agentes osmóticos como o manitol e sorbitol, assim como inibidores de crescimento como o ácido abscísico (ABA) (MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010; SOUZA et al., 2009).

Para muitas espécies a associação de diferentes fatores se faz necessário para a obtenção de um resultado satisfatório (CARVALHO et al., 2009). Entre os fatores de grande importância para o estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro* destacam-se concentração do meio de cultura e concentração de sacarose (ALMEIDA et al., 2012; ALVES et al., 2010; LIMA-BRITO et al., 2011; MENEZES, 2014; OLIVEIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

Tendo em vista a crescente demanda da técnica de conservação *in vitro* para preservação de germoplasma de diferentes espécies, a exemplo de plantas medicinais, assim como o interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) pela espécie em estudo, este trabalho teve por objetivo estabelecer condições de crescimento mínimo, visando o desenvolvimento de um protocolo de conservação *in vitro* da *Vernonia condensata* Baker.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da Faculdade Maria Milza-FAMAM. Como material vegetal foram utilizados segmentos nodais oriundos de plantas de alumã previamente cultivadas *in vitro*.

Os seguimentos nodais com aproximadamente 1,5 cm foram inoculados em tubos de ensaios contendo o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) nas seguintes concentrações: MS, MS/2 e MS/4, com diferentes concentrações de

sacarose (15 e 30 mg L⁻¹), mantidos em câmara climatizada BOD (temperatura de 20°C±1°C) e sala de crescimento (temperatura de 25°C±1°C), ambos com fotoperíodo de 16 horas e 40 μM m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa.

Após 30 dias de cultivo foi realizada a primeira avaliação utilizando as seguintes variáveis: altura de planta (AP), em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de raízes (NR). Com 120 dias de cultivo foi realizada uma segunda avaliação para verificar a viabilidade das plantas em relação aos tratamentos com as variáveis descritas anteriormente.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (3 x 2 x 2 x 2) do tipo parcela subdividida no tempo, analisando três concentrações de meio de cultura, duas concentrações de sacarose, duas temperaturas do ambiente de cultivo e duas épocas de avaliações.

Os dados resultantes das avaliações das plantas foram submetidos à análise variância (ANAVA). As médias dos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste F e Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis NFV, NFS e NR foram transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da ANAVA. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software estatístico SAS – statistical analysis system (SAS INSTITUTE, 2004).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os efeitos dos fatores isolados e da interação entre os fatores épocas de avaliação, concentrações do meio de cultura, concentrações de sacarose e temperatura do meio de cultivo.

Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis: altura de planta (AP), em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de raízes (NR) de plantas *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, em ambientes com temperaturas de 20°C e 25°C, durante 30 e 120 dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		AP	NFV	NFS	NR
Dias (D)	1	6204,25 ^{ns}	3,93 ^{ns}	199,70 ^{ns}	12,00 ^{ns}
Meios (M)	2	56,11 ^{ns}	4,00 ^{ns}	4,08 ^{ns}	2,19 ^{ns}
Sacarose (S)	1	3,99 ^{ns}	37,79 ^{ns}	0,23 ^{ns}	7,46 ^{ns}
Temperaturas (T)	1	1729,66 ^{ns}	100,71 ^{ns}	5,16 ^{ns}	21,05 ^{ns}
D x M	2	94,09 ^{ns}	6,13 ^{ns}	2,44 ^{ns}	0,90 ^{ns}
D x S	1	240,26 ^{ns}	10,07 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,18 ^{ns}
D x T	1	0,34 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,28 ^{ns}
erro 1	1	6204,25	3,93	199,70	12,002
M x S	2	38,81 ^{**}	0,73 ^{ns}	2,12 ^{**}	3,26 ^{**}
M x T	2	207,64 ^{**}	0,69 ^{ns}	1,91 ^{**}	2,34 ^{**}
S x T	1	1277,28 ^{**}	7,42 ^{**}	21,25 ^{**}	20,94 ^{**}
D x M x S	2	28,31 ^{**}	0,19 ^{ns}	5,03 ^{**}	0,27 ^{ns}
D x M x T	2	97,56 ^{**}	0,13 ^{ns}	3,32 ^{**}	0,20 ^{ns}
D x S x T	1	355,81 ^{**}	1,32 ^{ns}	19,74 ^{**}	0,22 ^{ns}
M x S x T	2	71,50 ^{**}	0,55 ^{ns}	1,12 ^{**}	0,73 ^{ns}
D x M x S x T	2	59,61 ^{**}	0,25 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,22 ^{ns}
erro 2	335	0,86	0,44	0,16	0,33
CV (%)		12,41	26,52	24,40	28,97
Média Geral		7,50	6,77	3,78	3,96

GL grau de liberdade, **, * significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Com 30 dias de cultivo a menor altura foi observada utilizando 15 g L⁻¹ de sacarose no meio MS na sua concentração normal. Porém, após 120 dias, a menor altura foi observada quando utilizou-se o meio MS a 1/4 de sua concentração e 30 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 2). Neste sentido, foi possível observar que na fase inicial as plantas se desenvolveram mais em meios com menos nutrientes e maior concentração de sacarose e com 120 dias precisaram de uma quantidade intermediária de nutrientes e de menor quantidade de sacarose para o desenvolvimento.

Resultado semelhante foi observado por Santos et al. (2012) em que acessos de vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty] foram conservados sob o regime de crescimento lento por um período de 270 dias, reduzindo-se a concentração dos sais do MS para 25% de sua concentração total, na temperatura de 18°C. Ainda

para os autores supracitados, a redução das concentrações de sais do meio básico de cultivo é outra estratégia amplamente empregada para a conservação sob regime de crescimento mínimo.

Santa-Rosa (2010) pesquisando sobre a conservação *in vitro* de bromélias, obteve resultados que permitiram conservar três espécies de *Aechmea* por um período de 12 meses utilizando o meio MS com 1/3 da sua concentração de sais com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose.

Porém no estabelecimento *in vitro* de um banco de germoplasma da espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pederson, Alves et al. (2010) observaram que a redução de 50% dos sais do meio de cultura MS foi mais indicado para conservação *in vitro* da espécie por ter promovido menor crescimento das plantas além do alto índice de sobrevivência.

Tabela 2. Valores médios de altura de planta de *Vernonia condensata* Baker (cm), cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias.

Concentrações do meio MS	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	
	15	30
30 dias		
1/1	1,85 cB	3,98 abA
1/2	2,64 bB	3,76 Ba
1/4	3,42 aB	4,44 Aa
120 dias		
1/1	11,73 cA	10,37 Bb
1/2	13,40 aA	13,30 aA
1/4	12,58 bA	8,52 cB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

No que se refere à temperatura, com 30 dias de cultivo as menores alturas foram observadas no ambiente com 20°C, independente da concentração do meio de cultura. Entretanto, com 120 dias de cultivo os explantes apresentaram menor altura quando foram conservados em meio MS a 1/4 de sua concentração e mantidos em ambiente com 20°C (Tabela 3).

A partir da conservação *in vitro* de amoreira-preta via crescimento lento, Formoso (2016) ressalta a importância de ajustar às concentrações das substâncias osmorreguladoras objetivando promover o crescimento lento e facilitar a recuperação de explantes após o período de conservação *in vitro* recomendado.

Pesquisando sobre a conservação *in vitro* de três espécies de orquídeas (*Polystachya estrelenses*, *Oeceoclades maculata* e *Catasetum macrocarpum*) por um período de 459 dias, Menezes (2014) concluiu que para crescimento mínimo das espécies deve-se utilizar 25% dos sais MS à temperatura de 25°C ou com 20 g L⁻¹ de sacarose e 25°C.

Fernandes (2014) objetivando o estabelecimento das melhores condições para a conservação *in vitro* por crescimento mínimo de duas espécies de bromélias observou-se que para ambas as espécies os tratamentos mais indicados para conservação *in vitro* foram o meio MS, com metade das concentrações dos macronutrientes, suplementado com 10, 15 ou 20 g L⁻¹ de manitol na temperatura de 25°C.

Estudos relacionados à conservação *in vitro* de algodão-do-campo permitiram concluir que a temperatura de 20°C associada ao meio de cultura WPM a 1/4 de sua concentração é uma condição eficiente para a manutenção e conservação de explantes de *Cochlospermum regium* em regime de crescimento mínimo (CAMILLO et al., 2009).

Tabela 3. Valores médios de alturas de plantas de *Vernonia condensata* Baker (cm), cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento) durante 30 e 120 dias.

Concentrações do meio MS	Temperaturas dos ambientes de cultivo	
	20°C	25°C
30 dias		
1/1	1,14 aB	4,69 cA
1/2	0,97 aB	5,42 bA
1/4	1,26 aB	6,60 aA
120 dias		
1/1	11,42 aA	10,68 cB
1/2	10,23 bB	16,47 aA
1/4	6,82 cB	14,28 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P <0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P <0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A temperatura de 20°C favoreceu a condição de crescimento mínimo das plantas, uma vez que nesta temperatura as plantas apresentaram menor altura quando comparadas a temperatura de 25°C. Após 120 dias de cultivo as plantas

mantidas em temperaturas de 20°C apresentaram menor altura, quando cultivadas em meio com 30 g L⁻¹ de sacarose, já quando mantidas em ambiente com 25°C a concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose foi mais eficiente na redução do desenvolvimento das plantas (Tabela 4 e 5). Nesta perspectiva podemos perceber que as concentrações de sacarose utilizadas como regulador osmótico e fonte de carbono tiveram influência significativa no que se refere à altura da planta.

Tabela 4. Valores médios de altura de planta de *Vernonia condensata* Baker (cm), cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e 25°C (sala de crescimento) durante 30 e 120 dias.

Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	Temperaturas dos ambientes de cultivo	
	20°C	25°C
30 dias		
15	1,30 aB	3,97 bA
30	0,95 aB	7,15 aA
120 dias		
15	13,29 aA	11,86 bB
30	5,67 bB	15,77 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Tabela 5. Valores médios de altura de planta de *Vernonia condensata* Baker (cm), cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento).

Concentrações do meio MS	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	
	15	30
20°C (BOD)		
1/1	8,73 Aa	3,82 aB
1/2	7,25 Ba	3,99 aB
1/4	5,90 cA	2,18 bB
25°C (Sala de crescimento)		
1/1	4,85 Cb	10,52 bA
1/2	8,78 bB	13,11 aA
1/4	10,10 aB	10,78 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Baixas temperaturas estão relacionadas à restrição na absorção de água e de nutrientes (SHARMA et al., 2005), pois há uma redução das reações químicas ocasionando em menos energia metabólica acessível (LARCHER, 2006). No

entanto, os resultados evidenciaram que plantas cultivadas em 20°C necessitaram de uma maior concentração da fonte de carbono no meio de cultura, quando comparadas aquelas cultivadas em ambiente com 25°C.

Em pesquisa realizada por Vettorazzi et al. (2014), objetivando a conservação *in vitro* de plantas de batata doce, visando a formação de um banco de germoplasma, os autores constataram que utilizando o meio de cultura MS em diferentes concentrações (0, 10, 50 e 100%), suplementado com distintas doses de sacarose (0, 10, 20 e 30 g L⁻¹) e mantendo os explantes nas temperaturas de 18±2°C e 27±2°C foi possível evidenciar que para subcultivos a cada 90 dias, todos os tratamentos podem ser utilizados, entretanto os tratamentos com redução da temperatura e dos sais do meio MS e da sacarose proporcionaram menor crescimento, devendo ser testados para subcultivos superiores há 90 dias.

Resultado semelhante foi observado por Pedroso et al. (2010) ao avaliar a influencia da temperatura sobre o crescimento e morfologia de plantas de *Vriesea inflata* mantidas *in vitro*. Esses autores evidenciaram que plantas da espécie mencionada podem ser mantidas *in vitro* em baixas temperaturas (15°C), com o objetivo de estabelecer uma coleção *in vitro* visando à preservação da espécie. Da mesma maneira, estudo desenvolvido por Lima (2009) constatou que a conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxizeiro pode ser feito em temperatura de 15°C sem problemas de perda de material.

Independente da temperatura do ambiente de cultivo, o maior número de folhas verdes foi observado na concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose. O maior número de folhas verdes é um indicativo de uma planta vigorosa e com maior chance de sobrevivência após os subcultivos. Considerando a concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose, o ambiente de cultivo com temperatura de 25°C foi aquele que apresentou plantas com o maior valor para esta característica, conforme podemos observar na Tabela 6. Neste sentido, foi possível constatar que o aumento na concentração de sacarose não foi um fator determinante para o aumento do número de folhas verdes, uma vez que os maiores valores foram observados em concentração menor, esses resultados estão de acordo com Carvalho (2013), visto que o aumento nas concentrações de sacarose não foi um fator decisivo para o aumento no numero de folhas verdes.

Tabela 6. Valores médios do número de folhas verdes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (Sala de crescimento).

Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	Temperaturas dos ambientes de cultivo	
	20°C	25°C
15	6,16 aB	10,33 aA
30	2,34 bB	8,24 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Lima-Brito et al. (2011), comparando duas temperaturas (18 e 25°C) na conservação *in vitro* de sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*), observaram que as maiores médias para o número de folhas verdes foram obtidas na temperatura de 18°C, independente da concentração de carboidrato utilizado. Assim como o autor supracitado, Menezes (2014) ao comparar duas temperaturas de cultivo (18 e 25°C) observou que a temperatura de 18°C proporcionou maiores médias atribuídas ao número de folhas verdes na conservação *in vitro* das espécies *Polystachya estrelenses* e *Oeceoclades maculata*, contudo verificou que para a espécie *Catasetum macrocarpum* independente dos reguladores osmóticos observados, a temperatura de 25°C foi a mais adequada para a variável analisada.

A retenção de folhas verdes é uma variável de extrema importância na conservação *in vitro*, visto que é indicadora de um bom desenvolvimento da planta nas condições estabelecidas e uma garantia de sobrevivência em caso de aclimação do material (MACIA, 2011).

Carvalho (2013) e Carvalho et al. (2016) destacaram a importância de verificar a correlação existente entre essas variáveis, constatando uma baixa correlação entre AP e NFV ($r = 0,17^*$; $r = 0,25^{**}$, respectivamente) em plantas de citros cultivadas *in vitro*, ressaltando a possibilidade de obtenção de materiais com menor altura e com um número adequado de folhas verdes como condição fundamental para a conservação *in vitro*, resultado semelhante foi observado no presente trabalho ($r = 0,45^{**}$, dados não apresentados).

Em relação à característica número de folhas senescentes, após 30 dias de cultivo observou-se que não houve diferença entre as concentrações de sacarose, independentemente da concentração do meio de cultura MS. Entretanto, em relação à concentração do meio de cultura, houve diferença apenas quando utilizou 15 g L⁻¹

de sacarose, com menor valor atribuído às plantas cultivadas em meio MS na sua concentração normal. Após 120 dias de cultivo, quando se utilizou meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose, os menores valores de folhas senescentes foram observados na concentração normal do meio MS ou em meio MS na metade de sua concentração. Já quando foram adicionados 30 g L⁻¹ de sacarose aos meios de cultura, o meio MS na sua concentração total foi aquele que favoreceu a redução da senescência foliar, ou seja, teve menor número de folhas senescentes (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios do número de folhas senescentes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias.

Concentrações do meio MS	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	
	15	30
30 dias		
1/1	0,13 bA	0,57 aA
1/2	0,87 aA	0,47 aA
1/4	0,27 abA	0,67 aA
120 dias		
1/1	5,30 bA	5,70 cA
1/2	6,40 bB	9,20 aA
1/4	9,33 aA	6,50 bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F(P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Santos et al. (2012) afirmam em relação a coloração das folhas das plantas conservadas *in vitro* deve-se ponderar plantas mais vigorosas, ainda que estas aparentam ser um pouco menor do que se deseja.

Segundo Divakaran et al. (2006), altas concentrações de sacarose contribuem para o crescimento acelerado da planta e a exaustão de outras substâncias no meio de cultura faz com que as folhas amareleçam e até mesmo caiam. Porém, no presente estudo, a maior concentração de sacarose (30 g L⁻¹) não acelerou a senescência foliar de forma significativa. Contudo, pode ser justificado pela utilização dessa concentração de sacarose no meio MS mais concentrado ter proporcionado uma nutrição mais rica às plantas, não comprometendo o desenvolvimento das mesmas e evitando a senescência foliar. Contudo, plantas cultivadas em meios com déficit de nutrientes podem ficar mais vulneráveis à senescência, quando o meio nutritivo não conseguir suprir as necessidades nutricionais de que a planta precisa.

Estudo realizado por Ahmed e Anjum (2010), sobre a cultura da pêra (*Pyrus* sp.) evidenciou resultado positivo em relação as taxas de sobrevivência com a redução dos sais do meio de cultura por um período de seis meses. Contudo, observou que após o período proposto ocorreu morte das brotações devido à falta de nutrientes no meio de cultivo, sendo que a conservação *in vitro* por longos períodos pode exigir maiores concentrações de nutrientes dos meios básicos, para garantir boas taxas de sobrevivência e posterior regeneração.

Outro aspecto observado em relação ao número de folhas senescentes com 30 dias de cultivo foi que não houve diferenças entre as concentrações do meio de cultura, independente da temperatura do ambiente de cultivo. No entanto, foi observada diferença significativa no número de folhas senescente das plantas quando em função da temperatura dos ambientes de cultivo, com os menores valores de senescência foliar naquelas plantas cultivadas em ambientes com temperatura de 25°C (Tabela 8). Resultado este que contradiz a maioria dos trabalhos relacionados à conservação *in vitro* (CONCEIÇÃO; FORTES; SILVA, 1999; LEMOS et al., 2002; MOLLO, 2009; LIMA-BRITO et al., 2011; SANTOS; ARRIGONI-BLANK; BLANK, 2012). Após 120 dias de cultivo, em relação às concentrações do meio de cultura, foi possível observar diferenças entre os meios apenas na temperatura de 25°C com menor valor observado quando utilizou-se o meio MS na sua concentração total (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios do número de folhas senescentes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de meio de cultura MS, em ambientes com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento) durante 30 e 120 dias.

Concentrações do Meio MS	Temperaturas dos ambientes de cultivo	
	20°C	25°C
30 dias		
1/1	0,60 aA	0,10 aB
1/2	1,23 aA	0,10 aB
1/4	0,87 aA	0,07 aB
120 dias		
1/1	7,13 aA	3,87 cB
1/2	7,80 aA	7,80 bA
1/4	7,03 aB	8,80 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Com 30 dias de cultivo não houve diferenças entre as concentrações de sacarose utilizadas nos meios de cultura com relação ao número de folhas senescentes, observou-se diferença entre as temperaturas dos ambientes de cultivo, com os menores valores de folhas senescentes na temperatura de 25°C. Já com 120 dias de cultivo, houve diferenças entre as concentrações de sacarose, com menores valores de folhas senescentes quando se utilizou 30 g L⁻¹ de sacarose nos meio de cultura, sendo que o ambiente de cultivo que teve o menor valor de senescência foliar foi aquele com temperatura de 25°C (Tabela 9).

Tabela 9. Valores médios do número de folhas senescentes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose, em ambientes com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento) durante 30 e 120 dias.

Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	Temperaturas dos ambientes de cultivo	
	20°C	25°C
	30 dias	
15	0,84 aA	0,00 aB
30	0,96 aA	0,18 aB
	120 dias	
15	9,29 aA	4,73 bB
30	5,36 bB	8,91 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Estudando sobre efeito dos agentes osmóticos (sacarose, manitol e sorbitol) na conservação *in vitro* de *Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C. SMITH. Alvin (2012) constatou que os menores valores para o número de folhas senescentes foram obtidos nos tratamentos contendo a maior concentração de sacarose (90,66 g L⁻¹) isolada, na temperatura de 25±2°C.

No que se refere ao efeito dos reguladores osmóticos do ambiente de cultivo para estabelecimento da condição de crescimento mínimo, Formoso et al. (2012), constataram que houve redução do crescimento com a adição da sacarose como fonte de carbono (30 g L⁻¹ de sacarose, como também efeito positivo da temperatura de 25°C, não havendo necessidade de baixas temperaturas para conservação *in vitro* de uma cultivar de batata.

Pesquisa realizada por Carvalho et al. (2016) revelou que o ambiente de cultivo com temperatura de 22±1°C, intensidade luminosa de 10 µmol m⁻² s⁻¹ e 12h

de fotoperíodo mostrou-se mais eficiente para reduzir o crescimento de plantas de genótipos de citros conservados *in vitro*, prolongando o tempo de subcultivo e mantendo as plantas viáveis. Por outro lado, estudo realizado por Vettorazzi et al. (2014) evidenciaram que na conservação *in vitro* de batata-doce, à temperatura do ambiente de cultivo de 27°C é mais aconselhável quando comparada com a temperatura de 18°C.

Na temperatura de 20°C não houve diferenças significativas no número de folhas senescentes em relação às concentrações do meio de cultura, independente das concentrações de sacarose utilizada. Houve diferenças entre as concentrações de sacarose, com as menores médias do número de folhas senescentes na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. No entanto, quando as plantas foram cultivadas na temperatura de 25°C houve diferenças nas concentrações do meio de cultura, em ambas as concentrações de sacarose, sendo que o menor valor médio de folhas senescentes foi observado quando as plantas foram cultivadas no meio MS em sua concentração total, especificamente utilizando 15 gL⁻¹ de sacarose (Tabela 10).

Este resultado pode estar atrelado ao fato de que o meio MS na sua concentração normal pode apresentar concentrações de macro e micro nutrientes necessários ao desenvolvimento *in vitro* do alumiã. Além disso, concentração ótima de sacarose no meio de cultura é fundamental para o estabelecimento da condição de crescimento mínimo, uma vez que o objetivo da conservação é retardar o desenvolvimento da planta sem afetar sua vitalidade.

Tabela 10. Valores médios do número de folhas senescentes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento).

Concentrações do meio MS	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	
	15	30
20°C (BOD)		
1/1	4,73 aA	3,00 aB
1/2	5,27 aA	3,77 aB
1/4	5,20 aA	2,70 aB
25°C (Sala de crescimento)		
1/1	0,70 cB	3,27 cA
1/2	2,00 bB	5,90 aA
1/4	4,40 aA	4,47 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Resultados semelhantes aos observados neste trabalho foram evidenciados por Almeida et al. (2012), onde verificaram que o meio MS suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e o meio MS com metade da sua concentração e a adição de 15 g L^{-1} de sacarose foram recomendados para estratégias de conservação *in vitro* de *Genipa americana* L. por crescimento lento. Carvalho et al. (2014) utilizando outro tipo de meio de cultura (WPM) para conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida', verificou que o meio WPM na concentração original e complementado com 25 g L^{-1} de sacarose foi eficiente para a redução do metabolismo das plantas mantidas *in vitro*.

Neste sentido, no que se refere a esta característica, observou-se que com a redução da temperatura do ambiente de cultivo, assim como da concentração do meio MS, as plantas apresentaram maior número de folhas senescente, sugerindo que baixas temperaturas associadas à redução dos nutrientes do meio de cultura podem provocar efeito negativo para a conservação da espécie, pois estes fatores interferem diretamente na vitalidade das plantas cultivadas *in vitro* (Figura 1).

Figura 1. Plantas de *Vernonia condensata* Baker com 120 dias de conservação *in vitro* em meio de cultura MS na sua concentração normal (A, D), na metade da sua concentração (B, E) e a 1/4 de sua concentração (C, F), com doses de 15 g L^{-1} e 30 g L^{-1} de sacarose mantidas na temperatura de $20 \text{ e } 25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente.



cultivadas em meio MS a 1/4 da sua concentração, utilizando 15 g L^{-1} de sacarose no meio de cultura (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios do número de raízes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose.

Concentrações do meio MS	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	
	15	30
1/1	3,15 bA	3,33 aA
1/2	4,12 bA	4,22 aA
1/4	5,55 aA	3,37 aB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Resultado similar foi encontrado por Santos, Arrigoni-Blank e Blank (2012) em pesquisa sobre propagação e conservação *in vitro* de vetiver, onde identificaram que a conservação *in vitro* da espécie é possível em meio MS semissólido com 25% dos sais MS e temperatura de 18°C por um período de 270 dias. Por outro lado, Alves et al. (2010) pesquisando sobre a influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen para conservação *in vitro* verificou que nenhum tratamento utilizando diferentes concentrações de meio MS e fonte de carbono (sacarose e sorbitol) inibiu a formação de raízes, ocorrendo 100% de enraizamento em explantes da espécie sob temperatura 16±1°C no período proposto (seis meses).

Lima-Brito et al. (2011) constataram resultados semelhantes aos observados no presente trabalho, quando avaliaram o efeito de agentes osmóticos e da temperatura na conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. Subsp. *mucugensis*. Os resultados obtidos por esses autores demonstraram o potencial da técnica de cultivo *in vitro* para a espécie em estudo, destacando que a utilização de meio de cultura MS na metade de sua concentração, contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e mantendo as plantas em temperatura de 18°C possibilita a conservação dessa espécie por até 180 dias, sem subcultivo.

Com o intuito de avaliar o efeito de diferentes concentrações dos reguladores osmóticos, sacarose, manitol ou sorbitol na conservação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* Garcia (2013) verificou que é possível conservar sob condições de

crescimento reduzido, plantas da espécie por doze meses em meio de cultura MS a 1/3 de sua concentração e suplementado com manitol.

Ao reduzir a concentração do meio MS para metade e a 1/4 da sua concentração, observou-se um maior número de raízes quando as plantas foram cultivadas no ambiente de 25°C (Tabela 12). Avaliando as concentrações de sais do meio MS (100, 75, 50 e 25%) e temperatura (18 e 25°C) do ambiente de cultivo, Menezes (2014) verificou que na temperatura de 25°C não houve diferenças significativa entre as três espécies, dentro de cada tratamento. Além disso, observou que houve melhor enraizamento na temperatura de 18°C para a espécie *Catasetum macrocarpum*, em todas as concentrações de sais do meio MS avaliadas, enquanto que para a espécie *Polystachya estrelenses* não houve diferenças significativas entre as concentrações de meio, com 100% de enraizamento em todos os tratamentos. Já na espécie *Oeceoclades maculata* houve diferença na porcentagem de enraizamento apenas quando utilizou-se 100% dos sais do meio MS.

Tabela 12. Valores médios do número de raízes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento).

Concentrações do meio MS	Temperaturas dos ambientes de cultivo	
	20°C	25°C
1/1	3,03 aA	3,45 bA
1/2	3,02 aB	5,32 aA
1/4	3,28 aB	5,63 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Em relação especificamente ao fator concentração de sacarose em função das temperaturas do ambiente de cultivo, o maior valor médio do número de raízes foi observado no ambiente com temperatura de 25°C utilizando 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura (tabela 13).

Trabalhando com espécies de orquídeas, Menezes (2014) verificou que a porcentagem de plantas enraizadas atingiu valores de 90% para todas as espécies de orquídeas estudadas, independente da fonte de carbono utilizada, tanto na temperatura de 18°C como 25°C, exceto para a espécie *Catasetum macrocarpum*,

com 24,6% de enraizamento quando mantidas em 18°C. Além disso, verificou aos 360 dias de cultivo que houve 100% de enraizamento na espécie *Vanilla planifolia*, com a redução da temperatura para 22°C.

Tabela 13. Valores médios do número de raízes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20°C (BOD) e de 25°C (sala de crescimento).

Concentrações sacarose (g L ⁻¹)	Temperaturas dos ambientes de cultivo	
	20°C	25°C
15	4,29 aA	4,26 Ba
30	1,93 bB	5,34 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A sacarose, assim como outros agentes osmóticos, quando empregada em altas concentrações na conservação *in vitro*, reduz o potencial hídrico do meio de cultura, o que dificulta a absorção de água e nutrientes pelo explante, restringindo o crescimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998; ENGELMANN, 1991). Neste sentido, Alvin (2012) afirma que a utilização de elevadas concentrações de sacarose favorecem a conservação *in vitro* de *Amburana cearensis*, proporcionando altas taxas de sobrevivência ao final de 300 dias.

Em relação às coleções de germoplasma vegetal *in vitro*, observa-se que na coleção de bananeiras da Bioversity, cujo intervalo médio de subcultivos é de 12 meses, se utiliza 30 g L⁻¹ de sacarose, enquanto que para mandioca no CIAT a concentração utilizada é de 20 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ no IITA com intervalos de subcultivos que variam de 4 a 19 meses (CGIAR, 2012).

A partir dos resultados observou-se uma variação nas características das plantas em função dos fatores avaliados nas duas épocas (30 e 120 dias) sendo estes: meio de cultura, concentração de sacarose e temperatura do ambiente de cultivo. No entanto, de forma geral, observou-se que o ambiente com temperatura de 25°C foi o mais favorável para a maioria das características estudadas.

Apesar de alguns trabalhos (citados anteriormente) estarem relatando a redução de temperatura para conservação *in vitro*, observou-se no presente trabalho que as melhores respostas para o estabelecimento de condições de crescimento mínimo de plantas de alumiã foram observadas em temperaturas comumente utilizadas nas salas de crescimento.

Segundo Faria et al. (2007) e Flores et al. (2011), as espécies possuem características únicas, determinadas por fatores genéticos, levando a diferentes respostas *in vitro* e, portanto, as condições necessárias para o cultivo *in vitro* são diferenciadas e dependentes da espécie. Neste sentido, estudo realizado por Macia (2011) descreve a especificidade de resposta e dependência em relação ao genótipo na definição de um protocolo de conservação e manejo de uma coleção *in vitro*. Neste sentido Carvalho et al. (2014) afirma que embora seja possível conservar plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' sem subcultivar por um período de 12 meses, utilizando o meio de cultura WPM em sua concentração original e volume de 20 mL, serão necessários estudos com outros genótipos para definir o protocolo de conservação *in vitro* para as espécies de citros, visto que pode ocorrer variação entre as plantas de um mesmo genótipo conservadas *in vitro*. De acordo com os trabalhos citados anteriormente, é possível observar que espécies e cultivares possuem características genéticas específicas, dessa maneira, o sucesso da conservação *in vitro* sob crescimento mínimo demanda o desenvolvimento de protocolos específicos para cada uma delas (WATT et al., 2000).

Em relação às concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, observou-se que o meio de cultura MS a 1/4 da sua concentração acrescido 30 g L⁻¹ de sacarose, assim como o meio de cultura MS na sua concentração normal com adição de 15 g L⁻¹ de sacarose proporcionaram o menor desenvolvimento *in vitro* da *Vernonia Condensata* Baker. Supõe-se então que mesmo nas condições *in vitro* com a diminuição dos nutrientes do meio de cultura MS para 25% de sua concentração, as plantas necessitaram de uma concentração maior de sacarose para se manterem vigorosas na condição de crescimento mínimo.

CONCLUSÃO

- O meio de cultura MS a 1/4 de sua concentração e adição de 30 g L⁻¹ de sacarose, associado à temperatura do ambiente cultivo de 25°C favorece a conservação *in vitro* da *Vernonia condensata* Baker a partir plantas com número de folhas verdes satisfatórios e menor altura, por um período de 120 dias.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.; ANJUM, M. A. *In vitro* storage of some pear genotypes with the minimal growth technique. **Turkish Journal Agriculture and Forestry**, Ankara, v.34, p.25-32, 2010. Disponível em: <

<http://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=1300011X&AN=49758388&h=val%2bw07o%2fW194BnxF9l6xryr%2fRUXtfeQwompl0dQ4n5CFpP1%2bmrj3kMdyQ3%2fheidfg5KBvKvp1x3TLooumEbPA%3d%3d&crl=f&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrlNotAuth&crlhashurl=log in.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d1300011X%26AN%3d49758388>>. Acesso em: 17 mai. 2017.

ALMEIDA, C. S. et al. **Efeito da Concentração de Sais MS e da Sacarose na Conservação *In Vitro* de *Genipa Americana* L.** II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos. 24 a 28 de setembro de 2012, Belém-PA, 2012. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao/946273/efeito-da-concentracao-de-sais-ms-e-da-sacarose-na-conservacao-in-vitro-de-genipa-americana-l>>. Acesso em: 17 mai. 2017.

ALVES, R. B. N. et al. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.4, p.510-515, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000400016>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

ALVIN, B. F. M. **Multiplicação e Conservação *in vitro* de *Amburana cearenses* (ALLEMÃO) A. C. SMITH.** Feira de Santana, 2012. 84f. Mestrado (Dissertação em Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, 2012. Disponível em: < <http://rgv.web2207.uni5.net/dissertacoes/42.pdf>>. Acesso em: 17 mai. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS-Relação de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS.** Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

_____. Ministério da Saúde. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília: Anvisa, p.126, 2011. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 9 mai. 2016.

_____. Ministério da Saúde. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Vernonia condensata* (“BOLDO-BAIANO”).** Organização: Ministério da Saúde e Anvisa. Natal, 2014. Disponível em: <http://200.214.130.94/consultapublica/display/dsp_download_arquivo.php?arquivo=214.> Acesso em: 11 de mai. 2016.

CALDAS, L. S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p.87-132.

CAMILLO, J. et al. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, p.184-189, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151605722009000200012&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 07 mai. 2016.

CARVALHO, M. de J. S. **Adequação Da Condição De Crescimento Mínimo Para A Conservação In Vitro De Germoplasma De Citros**. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, BA, 2013. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/123456789/795/1/Mariane%20de%20Jesus%281%29.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

CARVALHO, M. de J. da S. de . et al. Fatores que afetam a conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'. **Magistra**, Cruz das Almas- BA, v.26, n.2, p.178-185, abri./jun. 2014. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/123456789/795/1/Mariane%20de%20Jesus%281%29.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2017.

CARVALHO, M. de J. da S. de . et al. Univariate and multivariate statistical tools for *in vitro* conservation of citrus genotypes. **Acta Science Agronomy**, Maringá, v.38, n.1, jan./mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212016000100129>. Acesso em: 19 fev. 2017.

CONCEIÇÃO, A. M. da; FORTES, G. R. de L.; SILVA, J. B. da. Influência do ácido acetilsalicílico, da sacarose e da temperatura na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p.182-185, novembro, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05361999000300002&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 10 abr. 2017.

CGIAR. 2012. Disponível em: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=547&Itemid=742. Acesso em: 19 de junho de 2017.

DA SILVA, J. B., et al. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A Promising source of Antioxidants. **Oxidative Medicine and cellular Longevity**, v.13, p.9, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/698018/>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. Conservation of *Vanilla species*, *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.110, p.175-180, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423806002792>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

ENGELMANN, F. *in vitro* conservation of tropical plant germoplasma: a review. **Euphytica**, v.57, p.227-243, 1991. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/k2gw613l48g6637n/>>.

FARIA, G. A. et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.535-543, 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052007000400002 >. Acesso em: 12 abr. 2017.

FERNANDES, F. de P. R. **Conservação *in vitro* de *Bromelia reversacantha* Mez e *Aechmea tocontina* Baker (BROMELIACEAE) sob regime de crescimento mínimo**. Goiás, 2014, 59f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas- Universidade Federal de Goiás, 2014. Disponível em: < https://pgmp.agro.ufg.br/up/237/o/Fernanda_de_Paula.pdf >. Acesso em: 10 abr. 2017.

FORMOSO, R. S. et al. **Concentrações de agentes osmóticos na conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) CV. MACACA**. IV Encontro de Iniciação Científica e Pós-graduação da Embrapa Clima Temperado. Ciência e Inovação para 2050: Qual futuro que queremos? 11 a 13 de dezembro de 2012. Pelotas-RS. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao/948214/concentracoes-de-agentes-osmoticos-na-conservacao-in-vitro-de-batata-solanum-tuberosum-l-cv-macaca> >. Acesso em: 12 abr. 2017.

FORMOSO, R. S. **Conservação *in vitro* de amoreira-preta via crescimento lento**. Pelotas, 2016, 53f. Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/handle/prefix/3254>>. Acesso em: 9 abr. 2017.

FLORES, A. V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**. v.21, n.1, p.175-182, 2011. Disponível em: < <https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/2760> >. Acesso em: 9 abr. 2017.

GARCIA, F. R. **Micropropagação e conservação *in vitro* de bromeliáceas**. Feira de Santana, 2013, 80 f. Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2013. Disponível em: < <http://rgv.web2207.uni5.net/dissertacoes/60.pdf> >. Acesso em: 23 mai. 2017.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Rima, São Carlos, 2006.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1354-1361, ago, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000500007 >. Acesso em: 10 mai. 2017.

LEMOS, E. E. P. de. Et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.10, oct. 2002. Disponível em: < <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/108774/1/1359.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª. ed. Instituto Plantarum, v.13, p. 382-383, 2002.

MACIA, R. J. **Conservação *in vitro* de cultivares de Mandioca (*Manihot Esculenta Crantz*)**. Cruz das Almas, 2011. 67f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas- BA, 2011. Disponível em: < https://www1.ufrb.edu.br/pgrecvegetais/images/phocadownload/RICARDO_JOSU%C3%89_MACIA.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2017.

MENEZES, T. S. A. **Conservação *in vitro* e Aclimação de Epidendroideae (orchidaceae) do Estado de Sergipe**. São Cristóvão, 2014. 43f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade)- Universidade Federal de Sergipe, 2014. Disponível em: < https://bdtd.ufs.br/bitstream/tede/541/1/THAYS_SAYNARA_ALVES_MENEZES.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2017.

MOLLO, L. **Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na composição de carboidratos não-estruturais de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro***. 2009. 90f. Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidades)- Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2009. Disponível em : <http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2013/09/Luciana_Mollo_MS.pdf> . Acesso em 25 ago. 2017.

MOOSIKAPALA, L; TE-CHATO, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, v.6, p.401-407, 2010. Disponível em: < <http://natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/paper/Application%20of%20in%20vitro%20conservation%20in%20Vetiveria%20zizanioides%20Nash.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

OLIVEIRA, L. N. P de. **Verde Saúde Curitiba: plantas medicinais**. 20ª. ed. Curitiba: Prefeitura Municipal de Curitiba. p.60, 1999.

OLIVEIRA, M. B. et al. **Efeito de concentrações de sacarose e de meio de cultura (8s) sobre a taxa de crescimento da mandioca variedade bgm 0043 (riqueza) conservadas *in vitro***. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2011, Búzios. Panorama atual e perspectivas do melhoramento de

plantas no Brasil: [anais]. Búzios: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2011. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/899099/efeito-de-concentracoes-de-sacarose-e-de-meio-de-cultura-8s-sobre-a-taxa-de-crescimento-da-mandioca-variedade-bgm-0043-riqueza-conservadas-in-vitro>>. Acesso em: 15 Mai. 2017.

PEDROSO, A. N. V. et al. *In vitro* culture at low temperature and ex vitro acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.3, p.407-414, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-84042010000300004&script=sci_abstract>. Acesso em: 05 abr. 2017.

PIZZIOLO, V. R. et al. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000100015>. Acesso em: 05 abr. 2017.

SÁ, A. de J.; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.4, n.1, p.57-62, jan. 2011. Disponível em <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33118933010>>. Acesso em: 10 mai. 2016.

SANTA-ROSA, S. **Propagação e conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental**. Feira de Santana, 2010. 86f. (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010. Disponível em: < <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=862583&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22S%22&qFacets=autoria:%22S%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=98>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

SANTOS, M. C. et al . Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronomia**, v.42, n.3, p.735741. 2011. Disponível em: < <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/1205>>. Acesso em: 22 abr. 2017.

SANTOS, T. C. et al. CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ACESSOS DE VETIVER, *Chrysopogon zizanioides* (L.) ROBERTY (Poaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 963-970, nov./dec. 2012. Disponível em: < <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/14006>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

SANTOS T. C.; ARRIGONI-BLANK M.F.; BLANK A.F. Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v.30, n.3, jul/set. 2012. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362012000300025>. Acesso em: 11 mai. 2016.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.177-234, 2010. Disponível em: < <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=880901&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22COSTA,%20F.%22&qFacets=autoria:%22COSTA,%20F.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=8>>. Acesso em: 11 mai. 2016.

SHARMA, P.; SHARMA, N.; DESWAL, R. The molecular biology of the low-temperature response in plants. **Bioessays**, v.47, p.1048-1059, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163711>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

SOUZA A. S. et al. Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedade de mandioca. **EMBRAPA: Cruz das Almas**. 24p. (Circular Técnica 90), 2009. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/711805/preservacao-de-germoplasma-vegetal-com-enfase-na-conservacao-in-vitro-de-variedades-de-mandioca>>. Acesso em: 05 abr. 2017.

VETTORAZZI, R. G. et al. Estabelecimento de condições de cultivo mínimo *in vitro* de Batata-Doce (*Ipomoea Batatas* L. Lam). **II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 18 a 2 de novembro de 2014**, Santos-SP, 2014. Disponível em: < http://www.cbrg.net.br/cd/Resumos/ResumoCBRG_008.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2017.

VIEIRA, J. L. et al. Use of multivariate analysis to evaluate the effect sucrose on *in vitro* cassava conservation. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.5, p.419-424, 4 february, 2015. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/281505467_Use_of_multivariate_analysis_to_evaluate_the_effect_of_sucrose_on_in_vitro_cassava_conservation>. Acesso em 18 jun. 2017.

WATT, M. P. et al. *In vitro* storage of Eucalyptus grandis germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, n.2, p.161-164, 2000. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006447506869>>. Acesso em 14 dez. 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente pesquisa buscou-se identificar a concentração da citocinina BAP que favorecesse a proliferação de brotos visando o estabelecimento de um protocolo de micropopagação de *Mentha x villosa* Huds, assim como estabelecer condições de crescimento mínimo para conservação *in vitro* das espécies *Mentha x villosa* Huds e *Vernonia condensata* Baker.

O primeiro Capítulo deste trabalho abordou a multiplicação e a conservação *in vitro* da *Mentha x Villosa* Huds. No que se refere à multiplicação *in vitro* do hortelã, através da metodologia utilizada neste trabalho foi possível constatar que a citocinina BAP na concentração de 1,5 mg L⁻¹ proporcionou a maior proliferação de brotos, o que favorece a produção de mudas em larga escala. Já em relação à conservação *in vitro* do hortelã, considerando as variáveis altura da planta e número de folhas senescentes, tal como fator econômico, constatou-se que o meio de cultura MS a 1/4 de sua concentração total, acrescido a 30 g L⁻¹ de sacarose é uma condição viável para a conservação *in vitro* dessa espécie.

A partir dos resultados obtidos no Capítulo 2, em relação à conservação *in vitro* da *Vernonia condensata* Baker, nas condições em que o trabalho foi executado, observou-se que a composição do meio de cultura favorável à condição de crescimento mínimo das plantas foi semelhante àquela descrita para conservação *in vitro* de plantas de hortelã.

O efeito redutor dos sais do meio de cultura MS na condição de crescimento mínimo das plantas de ambas as espécies estudadas ficou evidente na presente pesquisa. Além disso, confirma-se a importância da adição da sacarose no meio nutritivo para a conservação *in vitro* de plantas de hortelã e alumã, uma vez que a semelhança dos resultados obtidos nos capítulos 1 e 2 evidenciam que a ausência dessa fonte de carbono praticamente inviabiliza a conservação *in vitro* das plantas, considerando as concentrações do meio de cultura MS e as características analisadas nas plantas após o período de cultivo *in vitro*. No entanto, os resultados demonstraram que a concentração de sacarose (30 g L⁻¹), corriqueiramente utilizada no meio MS para conservação *in vitro*, pode ser uma estratégia eficiente para a conservação de cultivares de hortelã e alumã em médio prazo.

Outro fator avaliado na conservação *in vitro* do alumã (capítulo 2) foi a temperatura do ambiente de cultivo, onde a temperatura de 25°C foi a mais favorável

para a condição de crescimento mínimo das plantas cultivadas *in vitro*, aspecto este que divergem com outros de estudos relacionados a conservação *in vitro*.

Nesta perspectiva, os resultados deste trabalho serão utilizados como subsídio nas pesquisas relacionadas a multiplicação e conservação *in vitro* de plantas medicinais em larga escala e posterior estabelecimento de uma coleção *in vitro* de espécies de interesse ao SUS (Sistema Único de Saúde) na Faculdade Maria Milza-FAMAM. Dessa maneira, esse trabalho contribuirá com o desenvolvimento biotecnológico da região do Recôncavo Baiano e, além disso, irá permitir parcerias com os gestores municipais de saúde, que desejam implantar farmácias vivas nas Estratégias de Saúde da Família- ESF, tal como, dinamizar pesquisas científicas para o Recôncavo, no sentido de conservação, distribuição e comercialização de plantas medicinais oriundas do cultivo *in vitro*.

Em função dos aspectos mencionados, o estabelecimento de uma coleção *in vitro* de plantas medicinais na FAMAM permitirá um destaque da região do Recôncavo, pelo reconhecimento da importância de se preservar a biodiversidade de plantas com finalidade terapêutica (a exemplo da *Mentha x villosa* Huds e *Vernonia condensata* Baker), além de estimular a criação de empresas no setor de biotecnologia e possibilitar estudos farmacológicos em relação aos princípios ativos produzidos por essas plantas.

REFERÊNCIAS

- ADJUNTO, E. N. P. **Caracterização morfológica e do óleo essencial de seis acessos de hortelanzinho (*Mentha ssp.*)**. Brasília, 2008. 73f. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/3718/1/2008_EricaNeivaPracaAdjuto.pdf>. Acesso em: 9 mai. 2016.
- ALMEIDA, M. Z. de. **Plantas Mediciniais**. 3ª. ed. Salvador: EDUFBA, p.221, 2011.
- ALMEIDA, L. V. da S. et al. As plantas medicinais e a micropropagação como ferramenta para sua expansão e utilização. **Textura**, Governador Mangabeira-BA, v. 9, n. 16, p. 001-014, jan - jul, 2016. Disponível em: <<http://www.famam.com.br/revistatextura/PDF-edicoes/edicao-16/001.pdf>>. Acesso em 14 dez. 2016.
- ALVES, R. B. N. et al. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.4, p.510-515, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000400016>. Acesso em: 20 de fev. 2017.
- ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n.spe, 2011. Disponível em: <<http://vufind.uniovi.es/Record/oai%3Aadoaj.orgarticle%3Af6792c6ce5b14627973ca4fdb2eff070>>. Acesso em 14 dez. 2016.
- ASMAR, S. A. et al. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) N. E. Brown]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.esp., p.149-153, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000500004>. Acesso em: 20 de fev. 2017.
- ASSIS, K. C. de. et al. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.34, n.1, p. 77-83, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212012000100011>. Acesso em 14 dez. 2016.
- BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In*: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-49, 2010.
- BATTISTI, C. et al. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira. Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 338-348, jul./set. 2013. Disponível em: <

<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2457> >. Acesso em 14 dez. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares**. PMNPC. Resumo Executivo. Brasília: MS. 2005. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ResumoExecutivoMedNatPratCompl1402052.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/legislacao/decreto5813_22_06_06.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS-PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Práticas Integrativas e Complementares em Saúde: uma realidade no SUS. **Revista Brasileira de Saúde da Família**, ano X, edição especial. Brasília –DF, 2008. Disponível em <http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/revistas/revista_saude_familia18_especial.pdf>. Acesso em 10 de mai. 2015.

_____. Ministério da Saúde. **RENISUS-Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

_____. Ministério da Saúde. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: ANVISA, p.126, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 9 mai. 2016.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Atenção Básica (PNAB)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012a. Disponível em: <<http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/pnab.pdf>>. Acesso em: 9 mai 2016.

_____. Ministério da Saúde. **Práticas Integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012b. Disponível em: <

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf >. Acesso em: 15 Mai. 2015.

BEDUHN, F. A. et al. Propagação *in vitro* e aclimatização de *Mentha piperita* L. Congrega. **Urcamp: 13ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa, 2016**. Disponível em: <trabalhos.congrega.urcamp.edu.br/index.php/jpgp/article/download/816/1015>; Acesso em: 20 mai. 2017.

BOEING, T. et al. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacol**, v.184, p.196-207, mai. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956376>>. Acesso em: 11 de mai. 2016.

BORNHAUSEN, R. L. **As ervas do sítio**. Bei Comunicação. 12ª. ed. São Paulo. p.176, 1998.

CAMARGO, E. E. S. **Diagnóstico dos programas de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, visando subsidiar a distribuição no Sistema Único de Saúde**. São Paulo, 2010. 222f. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêutica)- Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/104777>>. Acesso em: 07 mai. 2016.

CAMILLO, J. et al. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.2, p.184-189, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151605722009000200012&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 07 mai. 2016.

CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004. Disponível em: <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/6830>>. Acesso em: 07 mai. 2016.

CARIBÉ, R. A. et al. Bioensaio da *Vernonia condensata* Baker. **Natural Resources**, Aquidabã, v.3, n.2, 01 September 2013. Disponível em: <<http://sustenere.co/journals/index.php/naturalresources/article/view/ESS2237-9290.2013.002.0028>>. Acesso em 14 dez. 2016.

CARRICONDE, C. et al. **Plantas medicinais e plantas alimentícias**. v.1, Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular, UFPe, 1995, 153p.

CARVALHO, L. M.; COSTA, J. A. M. da; CARNELOSSI, M. A. G. **Qualidade em plantas medicinais**. 1ª. ed. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Aracaju, SE, 2010. 56p. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_162.pdf>. Acesso em 14 dez. 2016.

CARVALHO, A. C. P. P. de; RODRIGUES, A. A. de J.; SANTOS, E. de O. **Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.43, 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/951860/panorama-da-producao-de-mudas-micropropagadas-no-brasil>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

CARVALHO, M. de J. S. **Adequação Da Condição De Crescimento Mínimo Para A Conservação *In Vitro* De Germoplasma De Citros**. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, BA, 2013. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/123456789/795/1/Mariane%20de%20Jesus%281%29.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

CARVALHO, M. de J. da S. de . et al. Fatores que afetam a conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'. **Magistra**, Cruz das Almas- BA, v. 26, n. 2, p.178-185, Abri./Jun. 2014. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufrb.edu.br/bitstream/123456789/795/1/Mariane%20de%20Jesus%281%29.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2017.

CARVALHO, M. de J. da S. de . et al. Univariate and multivariate statistical tools for *in vitro* conservation of citrus genotypes. **Acta Science Agronomy**, Maringá, v.38 n.1, jan./mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212016000100129>. Acesso em: 19 fev. 2017.

CEOLIN, T. et al. La inserción de las terapias complementarias en un Sistema Único de Salud visando lo cuidado integral en la asistencia. **Enfermería Global**, v.16, p.1-10, 2009a. Disponível em: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1695-61412009000200017>. Acesso em: 9 mai. 2015.

CEOLIN, T. et al. Plantas medicinais: transmissão do conhecimento nas famílias de agricultores de base ecológica no Sul do RS. **Revista Escola de Enfermagem da USP, São Paulo**, v.45, n.1, p.47-54, 2011. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v45n1/07.pdf>>. Acesso em 15 Mai. 2015.

COFEN. Conselho Federal de Enfermagem. **Resolução 197/1997**. Dispõe sobre as terapias alternativas. Disponível em <<http://www.portalcofen.gov.br/2007/materias.asp?ArticleID=7041§ionID=34>>. Acesso em 5 jun. 2015.

CORREA JÚNIOR, C., GRAÇA, C., SCHEFFER, M. C. Produção de plantas medicinais para programas de fitoterapia em rede de saúde pública: a experiência de Curitiba – PR. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.48-50, suplemento, 2000. Disponível em: <http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=569_8>. Acesso em: 15 mai. 2016.

COSTA, C. O. D'S. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de Myracrodruon urundeuva Allemão e Schinus terebinthifolius Raddi**. 2011. 64 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia,

Instituto de Ciência da Saúde, Salvador-BA, 2011. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufba.br:8080/ri/handle/ri/15632>>. Acesso em 14 dez. 2016.

COSTA, J. C.; MARINHO, M. G. V. Etnobotânica de plantas medicinais em duas comunidades do município de Picuí, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais** [online], Botucatu, v.18, n.1, p.125-134, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722016000100125>. Acesso em: 15 mai. 2016.

DESCHAMPS, C. et al. Avaliação de genótipos de *Mentha arvensis*, *Mentha x piperita* e *Mentha* spp. para a produção de mentol. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v.31, n.2, apr./june 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362013000200002>. Acesso em 14 dez. 2016.

DEZAN, L.F. et al. Crescimento in vitro de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. **Idesia**, v.30, n.2, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292012000200007>. Acesso em: 21 abr. 2017.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais- Verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: UNESP, p.133, 2007.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; PEREIRA, J. E. S. Germinação e propagação *in vitro* de Cerejeira (*Amburana acreana* (ducke) a.c. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, v.22, n.1, p.1-9, 2012. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=929811&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22FERMINO%20JUNIOR,%22&qFacets=autoria:%22FERMINO%20JUNIOR,%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

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

FIALOVAA, S. et al. Water Extract of *Mentha x villosa*: Phenolic Fingerprint and Effect on Ischemia-Reperfusion Injury. **Nat Prod Commun**, v.10, n.6, p. 937-40, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197521>>. Acesso em: 10 mai. 2016.

FIDELES, I. et al. Características Anatômicas De Estruturas Vegetativas De *Brosimum Gaudichaudii* Tréc. Desenvolvidas *In Vitro* E *In Vivo*. **Ciência e Agroecologia**. Lavras, v. 24, n.2, p. 327-336, abr./jun., 2000. Disponível em: <<http://www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/30-volume-24-numero-2?download=236:vol24numero2>>. Acesso em: 20 de nov. 2015.

GARCIA, F. R. **Micropropagação e conservação in vitro de bromeliáceas**. Feira de Santana, 2013, 80 f. Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2013. Disponível em: <<http://rgv.web2207.uni5.net/dissertacoes/60.pdf>>. Acesso em: 23 mai. 2017.

GARLET, T. M. B.; FLORES, R.; MESSCHMIDT, A. A. Influência de citocininas na micropropagação de *Mentha x gracilis* Sole. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, p.30-34, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13n1/v13n1a05.pdf>>. Acesso em: 9 abr. 2017.

GIACOMETTI, D. C. **Ervas condimentares e especiarias**. São Paulo: Nobel, 1999.

GONÇALVES, S.; FERNANDES, L.; ROMANO, A. High-frequency *in vitro* propagation of the endangered species *Tuberaria major*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.101, n.3, p.359-363, 2010. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-010-9683-y>>. Acesso em 14 dez. 2016.

GUEDES, A. da S. **Contribuição ao estudo farmacognóstico das espécies medicinais *Averrhoa bilimbi* L. e *Poiretia bahiana* C. Muller**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 62 f.: Salvador-BA, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/9868>>. Acesso em 14 dez. 2016.

GUERRA, K. S. da S. et al. Embryo and fetal toxicity of *Mentha x villosa* essential oil in Wistar rats. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.7, p.871-7, jul.2012. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880209.2011.641024>>. Acesso em: 18 mai. 2016.

IGANCI, J. R. V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p. 79- 82, 2006. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/265820648_Efeito_do_extrato_aquoso_de_diferentes_especies_de_boldo_sobre_a_germinacao_indice_mitotico_de_Allium_cepa_L>. Acesso em 14 dez. 2016.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A da S. **Aspéctos práticos da micropopagação de plantas**. Editores técnicos, 2ª. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Porto Alegre: ed. Agropecuária, p. 45-71, 2000.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*- uma realidade. **Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.1, p. 30-33, 1997.

KUMAR, P. et al. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. **Industrial crops and products**, v.34, p.802-817, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011000604>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1354-1361, Ago, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000500007>. Acesso em: 10 mai. 2017.

LEMOS, E. E. P. de. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.10, Oct. 2002. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/108774/1/1359.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª. ed. Instituto Plantarum, 2002.

LONDRINA. Prefeitura do Município. Autarquia Municipal de Saúde. **Protocolo de fitoterapia**. 1ª. ed. Londrina: Prefeitura do Município, p.89, 2006. Disponível em <http://www1.londrina.pr.gov.br/dados/images/stories/Storage/sec_saude/protocolos_clinicos_saude/prot_fitoterapia.pdf >. Acesso em 15 Mai. 2015.

MARINHO, M. J. M. et al. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.2, p.246-252, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000200019>. Acesso em 14 dez. 2016.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. 4ª. ed. Viçosa: UFV, p. 220, 2002.

MARTINS, C. R. CARVALHO, A. C. P. P. de. Avanços da cultura de tecidos na micropopagação de tecidos. **Anais do III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas**. Aracaju- SE, Brasil, 11 e 12 de setembro de 2012. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/III_ciclo_de_palestras_final.pdf>. Acesso em: 07 de dez. de 2015.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 3ª. ed. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p.220, 1998.

MILAN, P.; HAYASHI, A. H.; GLÓRIA, B. A. da. Folha comparativa morfologia e anatomia de três espécies de Asteraceae. **Arco de Braz. Biol regional**, Curitiba, v.49 n. 1, jan. 2006.

MONFORT, L.E.F. et al. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.14, n.3, 2012. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722012000300006&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em 14 dez. 2016.

MOOSIKAPALA, L.; TE-CHATO, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, v.6, p.401-407, 2010. Disponível em: <<http://nates.psu.ac.th/Department/PlantScience/paper/Application%20of%20in%20vitro%20conservation%20in%20Vetiveria%20zizanioides%20Nash.pdf>>. Acesso em 14 dez. 2016.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, 2012. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000100016>. Acesso em abr. 2017.

MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.16, n.2, supl. I, p.350-355, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000500007>. Acesso em: 19 abr. 2017.

MOREIRA, A. L. M. et al. Cultivo de *Mentha x villosa* Huds. na região litorânea do Ceará. **Revista Horticultura Brasileira**, Ceará, v. 28, n. 2 (Suplemento - CD Rom), p. 3569-3572, jul. 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34665/1/AT10020.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

NASCIMENTO, E. M. et al., Efeito anti-helmíntico de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematoides gastrointestinais bovinos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.3, p. 817-824, mai-jun, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2009nahead/a123cr901.pdf>>. Acesso em: 15 de mai. 2016.

NAVROSKI, M. C. I. et al. Multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.1, p.117-121, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722014000100017&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 02 abr. 2017.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. dos S. Micropropagação de copaíba. **Biociência**, n. 33, p. 109-120, jul./dez. 2004. Disponível em <<http://www.biociencia.com.br/revista/bio33/copaiba.pdf>>. Acesso em 21 de nov. 2015.

NORTH, J. J.; NDAKIDEMI, P. A.; LAUBSCHER, C. P. The potential of developing an *in vitro* method for propagating Strelitziaceae. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v.9, n.45, p.7583-7588, nov. 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228656533_The_potential_of_developing_an_in_vitro_method_for_propagating_Strelitziaceae>. Acesso em 14 dez. 2016.

NUNES, J. D. et al. O extrativismo da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) na região do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.2, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722012000200018&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em 14 dez. 2016.

OGAVA, S. E. N. et al. Implantação do programa de fitoterapia "Verde Vida" na secretaria de saúde de Maringá (2000-2003). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13 (supl. 01), p.58-62, 2003. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2003000300022>. Acesso em: 15 Mai. 2015.

OLIVEIRA, T. G. de. **MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE CROTON ANTISYPHILITICUS MART.** Botucatu. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/93500>>. Acesso em: 05 abr. 2017.

OLIVEIRA, M. F. S. de. Fitoterapia e biodiversidade no Brasil: saúde, cultura e sustentabilidade. **Revista Eletrônica Ideias Ambientales**, p.110-119, 2011. Disponível em: <<http://biotek.iesa.ufg.br/up/160/o/iaedicion2.pdf#page=110>>. Acesso em: 17 mai. 2015.

OMS. **Informe sobre la salud em el mundo 2008: La atención primaria de salud, más necesaria que nunca.** Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2008. Disponível em: < http://www.who.int/whr/2008/08_report_es.pdf >. Acesso em: 15 Mai. 2015.

PIZZIOLO, V. R. et al. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000100015>. Acesso em: 05 abr. 2017.

RADÜNZ, L. L. et al. Influência Da Temperatura Do Ar De Secagem No Rendimento Do Óleo Essencial De Hortelã-Comum (*Mentha X Villosa Huds*). **Revista Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v.14, n.4, p. 250-250 257, Out./Dez, 2006. Disponível em: < <http://secagemplanta.net/artigos/2006-artigo3.pdf>>. Acesso em: 16 mai. 2016.

REBOUÇAS, S. R. **Cultivo In Vitro De Plantas Mediciniais: Ocimum basilicum L. e Cissus sicyoides L.** Cruz das Almas, 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)– Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Universidade federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas, Ba, 2009. Disponível em: < <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp087659.pdf>>. Acesso em: 16 mai. 2016.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.65-70, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2005000100014>. Acesso em: 15 Mai. 2015.

RODRIGUES, A. C. C; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no Povoado de Sapucaia, Cruz das Almas-Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.2, p. 1-7, 2006. Disponível em: < http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06/artigo1_v8_n2.pdf>. Acesso em: 20 out. 2015.

RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.3, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000300016>. Acesso em 14 dez. 2016.

ROUQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. Salvador: EDUFBA, 2008, 73 p.

SÁ, A. de J.; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.4, n.1, p.57-62, jan. 2011. Disponível em <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33118933010>>. Acesso em: 10 mai. 2016.

SANTOS, T. C. et al. Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, p. 963-970, 2012. Disponível em: < <https://ri.ufs.br/bitstream/123456789/1592/1/VitroAcessosVetiver.pdf>>. Acesso em 14 dez. 2016.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, n. 3, jul - set. 2012. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362012000300025>. Acesso em: 11 mai. 2016.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.177-234, 2010. Disponível em: < <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=880901&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22COSTA,%20F.%22&qFacets=autoria:%22COSTA,%20F.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=8>>. Acesso em: 11 mai. 2016.

SERPELONI, J. M. et al. Avaliação *in vivo* da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. **Revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n.1, p. 47-56, jan./jun., 2008. Disponível em: <www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/download/3452/2807>. Acesso em: 14 dez. 2015.

SIDHU, Y. *In vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture. **The Plymouth Student Scientist**, v.4, n.1, p. 432-449, 2010. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/267683689_In_vitro_micropropagation_of_medicinal_plants_by_tissue_culture>. Acesso em 14 dez. 2016.

SILVA, D. et al. Levantamento Etnofarmacológico em Comunidades rurais do Recôncavo da Bahia/BA. **VI Congresso Brasileiro de Agroecologia/ II Congresso**

Latino Americano de Agroecologia. Curitiba, nov. 2009. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/arquivos/materias/%7B4BFE4525-0A4E-4A99-8C59-E124A2A2D80F%7D_2520.pdf>. Acesso em: 20 out. 2015.

SILVA, J. B. da. et al. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): uma promissora fonte de antioxidantes. **Oxid Med Longev celular**, 698018, 2013. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-24489987>>. Acesso em: 19 mai. 2016.

SOUZA, A. da S; JUNGHANS, T. G. **Introdução à Micropopagação de Plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA, p.152, 2006. Disponível em: <http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00077860.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SOUZA, E. F. A. A. de.; LUZ, M. T. Bases socioculturais das práticas terapêuticas alternativas. **Revista História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.16, n.2, abr./jun., p.393-405, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hcsm/v16n2/08.pdf>>. Acesso em: 5 de mai. 2015.

SOUZA A. S. et al. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedade de mandioca**. EMBRAPA: Cruz das Almas. 24p. (Circular Técnica 90), 2009. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/711805/preservacao-de-germoplasma-vegetal-com-enfase-na-conservacao-in-vitro-de-variedades-de-mandioca>>. Acesso em: 05 abr. 2017.

SOUZA, A. V. et al. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.3, p.319-327, 2011. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/908847/conservacao-e-enraizamento-in-vitro-de-infalivel-mandevilla-velutina-k-schum-uma-planta-medicinal-do-cerrado>>. Acesso em: 5 de mai. 2015.

TELES, N. S. B. et al. Evaluation os the therapeutic efficacy of *Mentha crisper* in the treatment of giardiasis. **Contemporary Clinical Trials**, v. 32, n. 6, p.809-813, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21872682>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

TOYANG, N. J, VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, n.3, p.681-723, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395623> >. Acesso em 14 dez. 2016.

THOMAS, E. et al. Extract of *Vernonia condensata*, Inhibits Tumor Progression and Improves Survival of Tumor-allograft Bearing Mouse. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23255, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep23255>>. Acesso em: 19 mai. 2016.

VALE N. B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v.52, n.3, may/june 2002.

Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rba/v52n3/v52n3a13.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

VANINI, M. **Uso de plantas medicinais em um território quilombola do município de mostardas – rio grande do sul**. 2010. 106f. Dissertação (mestrado em enfermagem) – programa de pós-graduação em enfermagem. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Disponível em: < <http://repositorio.ufpel.edu.br/handle/123456789/1884> >. Acesso em: 14 dez. 2016.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151605722009000200011&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 14 dez. 2016.