



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRARIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS:

Ocimum basilicum L. e *Cissus sicyoides* L.

FABÍOLA SANTANA REBOUÇAS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
FEVEREIRO – 2009**

CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS:

Ocimum basilicum L. e *Cissus sicyoides* L.

FABÍOLA SANTANA REBOUÇAS

**Engenheira Agrônoma
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia , 2007.**

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof.º Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRARIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

R289 Rebouças, Fabíola Santana.

Cultivo *in vitro* de Plantas Medicinais: *Ocimum basilicum L.* e *Cissus sicyoides L* / por Fabíola Santana Rebouças _ Cruz das Almas, 2009.

61 f.:

Orientador: Prof.. Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Curso Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Área de concentração Fitotecnia.

1. Plantas medicinais - *Ocimum basilicum L.* . 2 Calogênese – *Cissus sicyoides L*

I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. II. Título. III. Almeida, Weliton Antonio de

CDD: 581.634

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^o Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

Prof.^a Dr.^a. Rosely Pereira da Silva
Faculdade Maria Milza - FAMAM– Cruz das Almas

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em
Ciências Agrárias
em.....
Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias
em.....

DEDICO

Aos meus pais Antonio Nunes Rebouças e Cleomildes Santana Rebouças, pelo amor, honra, princípios morais, compreensão e educação que me deram.

OFEREÇO

Aos meus amados irmãos Sueli, Márcio, Marco Aurélio, Moisés e Rubens, as minhas queridas sobrinhas Êmile, Gabriela, Alice, Clara, Júlia e meus queridos sobrinhos Antonio Neto e Mateus (Somos uma família FELIZ!).

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus pelo dom da vida. “Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém”. Extraído da Bíblia. (Rm. 11. 36).

Aos meus pais pelo amor imensurável, exemplos de conduta e cuidado.

Aos meus inestimáveis irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram meus estudos.

A minha avó Enedina Souza Santana, matriarca da família, pelo carinho inefável.

Ao meu orientador, Professor Weliton Antonio Bastos de Almeida, pelo profissionalismo, atenção, amizade e exemplo de vida.

A professora Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, pelo acompanhamento profissional constante e terna amizade.

Ao meu noivo Jackson Menezes Rodrigues, pelo amor, respeito, compreensão e confiança transmitida em todos os momentos.

A família do meu noivo, pela atenção, força e acompanhamento incondicional.

A FAPESB pela concessão da bolsa

A Faculdade Maria Milza, diretor, professores, funcionários e alunos, sem a participação desta equipe, a condução e concretização deste trabalho não seria possível. Muito Obrigado a todos!

A UFRB pelo crescimento profissional.

Aos meus colegas do mestrado Darcilúcia (exemplo de força!), Nailson, Humberto, Cícera, Cássia, Vânia, Juliana, César Augusto, Ádila, Jeferson, Ubitaran, Denis e Orlando por todos os momentos compartilhados.

A Dr^a Rosely Pereira da Silva e Elma dos Santos Souza, pela parceria profissional e amizade estabelecida.

A Fabiana Moraes de Carvalho, Maria Alice Argôlo Vicente e Larissa Souza, pela atenção e respeito em todos os momentos compartilhados nos laboratórios.

Aos meus amigos (as) e irmãos em Cristo, membros da Primeira Igreja Batista em Cruz das Almas, pois também fazem parte da minha família e são bênçãos de Deus para mim. A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
Capítulo 01	
ORGANOGENESE <i>IN VITRO</i> EM <i>Ocimum basilicum</i> L. A PARTIR DE SEGMENTOS INTERNODAIS.....	15
Capítulo 02	
CALOGÊNESE EM <i>Cissus sicyoides</i> L. A PARTIR DE SEGMENTO FOLIAR.....	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS: *Ocimum basilicum*

L. e *Cissus sicyoides* L.

Autora: Fabíola Santana Rebouças

Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi induzir a multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L., e a obtenção de um protocolo de calogênese em *Cissus sicyoides* L., *in vitro*. Na organogênese *in vitro* de *Ocimum basilicum* L., foram utilizados como explantes, segmentos internodais de plantas *in vitro*. Estes foram cultivados em meio MT, e BAP: 0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹. Avaliou-se: porcentagem de explantes responsivos e número de gemas/explante. Para o enraizamento, brotos foram transferidos para meio MT contendo 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado e ANA nas concentrações: 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹. Avaliou-se: porcentagem de enraizamento; comprimento da maior raiz (cm); peso da matéria fresca (g) e peso da matéria seca (g). A adição de 2,0 mg L⁻¹ BAP promoveu a melhor resposta organogênica. No enraizamento, não se faz necessário o adicionamento de ANA. Para a calogênese de *Cissus sicyoides* L., foram utilizados como explantes, segmentos foliares de plantas oriundas do campo, que após desinfestação foram inoculados em meio MT + 1,0 mg L⁻¹ de ANA. Avaliou-se a % de explantes sobreviventes e % de contaminação. Para o cultivo utilizou-se o meio MT+ 1,0 mg L⁻¹ ANA e BAP: 2,0; 4,0; 6,0 e 12,0 mg L⁻¹. Avaliou-se o número de calos compactos e friáveis. Para o primeiro e segundo subcultivo o material foi introduzido em meio MT + 1,0 mg L⁻¹ ANA variando-se as mesmas concentrações de BAP, sendo avaliados o número de calos friáveis formados e a % de área coberta com calos. A quantidade de calos formados foi obtida ao longo dos subcultivos por meio do número de repetições formadas no decorrer dos mesmos, sendo também obtidos, peso da matéria fresca (g) e seca (g). Em seguida, fez-se os testes fitoquímicos. Para a calogênese de *Cissus sicyoides* L., a partir de segmento foliar faz-se necessário a adição de 6,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultivo. Identificou-se a presença de heterosídeos cardiotônicos em calos de *Cissus sicyoides* L.

Palavras-Chave: Manjeriçã, Cultivo *in vitro*, Insulina vegetal, heterosídeos cardiotônicos.

IN VITRO CULTURE OF MEDICINAL PLANTS: *Ocimum basilicum* L. and *Cissus sicyoides* L.

Author: Fabíola Santana Rebouças

Adviser: Weliton Antonio Bastos de Almeida

ABSTRACT: The objective of this study was to induce in vitro multiplication of *Ocimum basilicum* L., and achieving a protocol the callus in *Cissus sicyoides* L. *in vitro*. In *in vitro* organogenesis of *Ocimum basilicum* L., were used as explants, segments internodais plants *in vitro*. These were cultured in MT medium and BAP: 0.0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹. It was evaluated: percentage of responsive explants and number of buds / explant. For rooting, shoots were transferred to MT medium containing 0.5 g L⁻¹ of activated charcoal and NAA concentrations: 0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹. It was evaluated: percentage of rooting, length of the longest root (cm), weight of fresh matter (g) and dry matter (g). The addition of 2.0 mg L⁻¹ BAP promoted the best organogenic response. With roots, does not require the addition of NAA. For the callus of *Cissus sicyoides* L., were used as explants, leaf segments of plants from the field, after disinfection were inoculated into MT medium + 1.0 mg L⁻¹ NAA. We evaluated the % of explants % of survivors and contamination. For the cultivation using the MT medium + 1.0 mg L⁻¹ NAA and BAP: 2.0, 4.0, 6.0 and 12.0 mg L⁻¹. It was evaluated, the number of compact and friable callus. For the first and second subculture the material was introduced into MT medium + 1.0 mg L⁻¹ NAA was the same varying concentrations of BAP, and assessed the number of friable callus formed and the % of area covered with calluses. The amount of callus formed was obtained over the subcultures through the number of repeats formed during the same, and also obtained, the fresh matter weight (g) and dry (g). Then there was the testing phytochemicals. The disinfection was shown to be ineffective. For the callus of *Cissus sicyoides* L. from leaf segment it is necessary the addition of 6.0 mg L⁻¹ BAP to the medium of culture. It was the presence of cardiac heterosides in callus of *Cissus sicyoides* L.

Key words: Basil, *In vitro* culture, Vegetable insulin, Cardiac heterosides.

INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização, as plantas vêm sendo utilizadas pelo homem como fonte de alimento e com propósitos terapêuticos. No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está arraigada às culturas indígena, negra e dos imigrantes europeus. Nos dias atuais, as plantas representam uma valiosa fonte de metabólitos secundários, os quais são utilizados principalmente pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (RAO & RAVISHANKAR, 2002). Estima-se que cerca de 25% dos fármacos empregados, atualmente, nos países industrializados foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais, especialmente de plantas (YUNES & CALIXTO, 2001). A exemplo dos Estados Unidos, onde cerca de 25% de todos os medicamentos prescritos, dispensados por farmácias comunitárias, entre 1959 e 1980, continham substâncias ativas oriundas de plantas superiores (FARNSWORTH & SOEJARTO, 1985).

Os produtos derivados de plantas medicinais detêm uma importante parcela do mercado mundial, 14 bilhões de um total estimado de 280 bilhões de dólares (cerca de 5% do mercado mundial de produtos farmacêuticos), (CARVALHO et al., 2007). Para a Europa e Estados Unidos, o mercado fitoterápico foi estimado no ano de 2000, o equivalente a 8,5 e 6,3 bilhões de dólares, respectivamente (SIMÕES & SHENKEL, 2002).

No Brasil, o valor estimado de gasto em fitoterápicos é da ordem de 300 milhões de dólares, relativamente pequeno, representando cerca de 4% do total do mercado farmacêutico, da ordem de 7,4 bilhões de dólares (MARQUES, 1999). No entanto, estes valores indicam um mercado em potencial expansão, principalmente se considerarmos a biodiversidade brasileira. O Brasil possui a mais extensa e diversa flora, número superior a 55 mil espécies descritas, o que

corresponde a 22% do total mundial (BRASIL, 2008). Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação do uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (RODRIGUES, 2006). No entanto, apesar do Brasil ser rico em biodiversidade, a exploração predominantemente de caráter predatório das plantas medicinais e o desconhecimento das práticas de cultivo têm levado a reduções drásticas das populações naturais, culminando na perda de muitos metabólitos ainda não estudados pela química e pela farmacologia.

A eficácia e segurança de muitas plantas medicinais já foram comprovadas cientificamente o que as legitimizam como recurso terapêutico benéfico e indispensável à humanidade. Porém, a exploração ilegal das culturas medicinais prejudica o desenvolvimento de medicamentos utilizando os elementos tradicionais. Montanari Junior (2002) assinala que, como consequência da revalorização mundial do uso de plantas medicinais, a pressão ecológica exercida sobre alguns desses recursos naturais tem sido grande nos últimos anos. Acrescenta ainda que o valor econômico dessas plantas põe em perigo a sobrevivência de muitas espécies medicinais nativas.

Considerando a importância da participação do Brasil no mercado mundial de fitoterápicos, atrelado ao fato da necessidade da conservação da flora medicinal brasileira, duas importantes políticas foram estabelecidas em 2006, pelo governo federal brasileiro. A primeira foi a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada através da Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006 (BRASIL, 2006). A segunda foi a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006). Ambas as políticas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com qualidade, segurança e eficácia à população, priorizando a biodiversidade do país. Estas medidas apontam para maior valorização e reconhecimento deste recurso terapêutico como alternativa para a população brasileira.

Por essa razão, torna-se necessário estudar o comportamento de espécies medicinais perante as práticas agronômicas, por meio da domesticação e do cultivo (CHAVES et al., 2002). Além disso, o declínio no teor de princípios ativos ou de óleos essenciais em plantas medicinais é comum quando estas são

cultivadas por longos períodos e submetidas à vários cortes (PEREIRA, 1999). A cultura de tecidos vegetais tem sido considerada ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais, bem como a propagação comercial de plantas medicinais (ABREU, 1998).

1 Cultura de Tecidos em Plantas Medicinais

Esta técnica consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas apropriadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (GIACOMETTI, 1990). A regeneração de plantas através da cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira (FLORES, 2006). Além disso, os vegetais são capazes de produzir um grande número de metabólitos *in vitro* (RAO & RAVISHANKAR, 2002).

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

1.1 Multiplicação *in vitro* de Plantas Medicinais

França et al., (1995) desenvolveram a micropropagação a partir de segmentos nodais de *Eclipta alba* L. Hassk e estabeleceram um protocolo eficiente para produção em escala desta planta. Esse tipo de propagação promove o desenvolvimento de estruturas morfológicamente pré-existent e a exposição de segmentos nodais a concentrações adequadas de fitoreguladores e nutrientes que estimula a quebra de dormência das gemas axilares e promove uma rápida multiplicação de novas brotações (DEBERGH & READ, 1991).

Plantas micropropagadas de *Maytenus aquifolia* e *Maytenus ilicifolia*, apresentaram a mesma produtividade em fitomassa e o mesmo perfil químico das matrizes doadoras de explantes (PEREIRA et al, 1994; PEREIRA et al 1995). A mesma metodologia de propagação *in vitro* foi desenvolvida com o

Stryphnoclendron polyphythum (barbatimão) cuja atividade cicatrizante é atribuída aos taninos presentes na casca da árvore (FRANÇA et al, 1995).

Pothomorphe umbellata uma espécie medicinal também conhecida como caapeba ou pariparoba, está inscrita na farmacopéia brasileira devido sua ação anti-úlceras, colagoga e anti-hepatotóxica. Recentemente, foi isolado dessa espécie um composto denominado *N-benzoilmescalina* que tem atividade bactericida contra *Helicobacter pylori* (ISOBE, et al 2002). Micropropagação desta espécie, via organogênese direta a partir de segmento de folha foi estabelecida com objetivo de se obter plantas em escala para cultivo convencional, uma vez que as sementes apresentam graves problemas com a germinação (PEREIRA et al, 2000).

Em alguns casos, observa-se maior produção de determinado metabólito secundário em plantas micropropagadas em relação a planta matriz, como foi constatado por Yoshimatsu et al., (1994). De acordo com esses autores, o mais elevado teor de emetina (1,8%) encontrado em raízes de ipeca foi verificada em plantas propagadas por cultura de tecidos. Conforme Piatti et al., (1991), o alcalóide emetina é sintetizado a partir da descarboxilação do aminoácido tirosina.

1.2 Cultivo de Calos

O cultivo de calos, células e órgãos *in vitro* tem sido uma alternativa viável para o estudo e a produção de metabólitos secundários (KOLLÁVORÁ , 2004; ARIKAT., 2004; OKSMAN-CALDENTY & INZÉ, 2004). Em geral, o método mais utilizado para o estudo da produção de metabólitos é o cultivo de células em suspensão (BOTTA et al., 2001). Para isso, faz-se necessário determinar protocolos eficientes para a indução e manutenção de calos friáveis.

Adicionalmente, a constatação de que ocorrem modificações no teor de compostos de acordo com o grau de diferenciação dos tecidos, levou ao desenvolvimento de um grande número de pesquisas com o intuito de estudar a viabilidade de produção de compostos em calos com diferentes características, principalmente no que diz respeito à consistência e ao potencial morfogênico (FLORES, 2006).

Mansur (1994), trabalhando com calogênese a partir de diversos explantes de *Pfaffia paniculata*, verificaram a formação de calos friáveis a partir de

segmentos de folhas na presença do 2,4-D e cinetina. Em outras espécies, como *Gomphrena macrocephala* (VIEIRA et al., 1995), *G. officinalis* (MERCIER et al., 1992) e *Amaranthus* (BENNICI et al., 1997) calos têm sido induzidos a partir de vários explantes, utilizando-se diferentes concentrações de ANA e BAP.

O crescimento de calos, permite em alguns casos o desenvolvimento de culturas de células que acumulam compostos em níveis mais elevados do que a planta da qual elas se originaram. Buffa Filho et al., (2001), ao comparar os dados obtidos da análise quantitativa de quinonametídeos de 5 genótipos de *Maytenus ilicifolia* e os resultados dos experimentos em culturas de células, concluíram que as células cultivadas *in vitro* produziram 3x mais maitenina e 100x mais 22b hidroximaitenina, do que as raízes de plantas cultivadas *in vitro*.

2 Manjeriço

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L., Lamiaceae) é planta anual ou perene, dependendo do local em que é cultivado. Nos Estados Unidos da América o cultivo é de média escala e para fins culinários, ornamentais e extração de óleo essencial (BLANK, et al., 2004).

Essa espécie é comercialmente cultivada para utilização de suas folhas verdes e aromáticas, usadas frescas ou secas como aromatizante ou tempero. De acordo com Lawrence (1993), a produção mundial de óleo essencial de manjeriço em 1992 foi de 43 toneladas, equivalendo a 2,8 milhões de dólares. Só os EUA importaram em 1988, 1.806 toneladas de manjeriço (folhas secas e óleo essencial), equivalente a 2,5 milhões de dólares (SIMON, 1990). Esse valor aumentou para 4.195 toneladas de matéria seca em 1996, equivalente a 5,5 milhões de dólares (USDA, 1998).

Como planta medicinal, age contra problemas nas vias respiratórias, contra infecções bacterianas e parasitas intestinais, além de melhorar a digestão dos alimentos (LORENZO & MATOS, 2003). Em sua constituição química apresenta: óleos essenciais (eugenol, estragol, linalol, lineol, alcanfor, cineol, pineno e timol), taninos, saponinas, flavonóides, ácido cafeíco e esculosídeo. (EMBRAPA, 2001). Foi demonstrado que esta espécie pode ser rica em antocianinas e outras espécies deste mesmo gênero, podem ser uma fonte potencial de antioxidantes (PHIPPEN e SIMON, 1998).

A disponibilidade e interação de auxinas e citocininas no meio de cultura levam ao crescimento e morfogênese *in vitro*, tendo uma importante influência na formação das raízes, parte aérea e calo em cultura de tecidos. O efeito fisiológico depende da concentração de cada regulador no meio, sendo que cada parte da planta tem uma resposta diferente às alterações das concentrações de auxinas e citocininas (POZO et al., 2005). Alguns estudos *in vitro* têm sido conduzidos com o gênero *Ocimum*, usando diferentes explantes, como segmento nodal (AHUJA, 1982), foliar (PHIPPEN e SIMON, 2000) inflorescência jovem (SINGH & SEHGAL, 1999) e botões axilares (BEGUN, 2002).

3 Insulina Vegetal

O objeto do presente estudo é a *Cissus sicyoides* L, uma trepadeira conhecida popularmente como anil trepador, uva brava, cipó-pucá ou insulina vegetal (AGRA et al, 2007). As inflorescências são de flores pequeninas, branco-pálidas e numerosas, partem de alturas diferentes, mas alcançam o mesmo nível superior, (inflorescência denominada "corimbo"), os frutos são pequenas bagas, denominadas pelo povo como uva-brava ou uva-de-mato, que quando maduras contém pigmentos, e extraídos podem ser utilizados como corante de alimentos (TOLEDO, 1983).

As folhas de insulina vegetal, são empregadas externamente contra o reumatismo e cura de abscessos e a infusão das folhas e do caule utilizadas na inflamação muscular e como ativadora da circulação sanguínea (SANTOS, et al., 2008). Esta espécie contém alcalóides, flavonóides (MOURA, 1986; ALBUQUERQUE, 1989), esteróides, saponinas, compostos fenólicos, mucilagem (SILVA,1995), dentre outros. As mucilagens apresentam, em diversas espécies, propriedades anti-inflamatórias, laxativas, anti-diarréicas e anti-diabéticas (TOMODA et al., 1987).

A literatura relata que tem sido investigado possível efeito hipoglicemiante com as folhas *Cissus sicyoides* L., havendo relatos contraditórios quanto a essa atividade. Silva et al. (1996), Beltrame et al. (2001), Beltrame et al. (2002), Vasconcelos, (2004) e Lima (2007) não observaram essa atividade diferentemente de Mori et al. (2001), Barbosa et al. (2002), Pepato et al. (2003) e Viana et al. (2004).

Diante da necessidade de estudos envolvendo técnicas de cultura de tecidos de espécies medicinais, com expressivo potencial farmacológico, o objetivo do presente estudo foi induzir a multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L., e a obtenção de um procololo de calogênese em *Cissus sicyoides* L., *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I. N. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 101f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - UFL, Lavras, 1998.
- AHUJA, A.; VERMA, M.; GREWAL, S. Clonal propagation of *Ocimum* species by tissue culture. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 20, p. 455-458, 1982.
- AGRA M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- ALBUQUERQUE, J.M.D. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS, 1989. 96p (Programa de agricultura nos Trópicos, 6).
- ARIKAT, N. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 193-202, 2004.
- BARBOSA, W. L. R. et al. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 12, p. 13-15, 2002. Suplemento.
- BEGUN, F.; AMIN, M.N.; AZAD, M.A.K. *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum*. **Plant Tissue Culture**, v. 12, n. 1, p. 27-35, 2002.
- BELTRAME, F. L. et al. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Quimica Nova**, v. 24, p.783-785, 2001
- BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. G. Coumarin glycoside from *Cissus sicyoides*. **Nat Prod Lett**, v.16, p. 213-216. 2002.
- BENNICI, A. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 29-33, 1997.

BLANK, A.F. et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p. 113-116, 2004.

BOTTA, B. et al. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p.354-379, 2001

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Riqueza de espécies**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/biodiv/brasil.html>>. Acesso em: 22 set. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN-PIC) no Sistema Único de Saúde. **D.O.U. Poder Executivo**. Brasília, 2006.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **D.O.U. Poder Executivo**. Brasília, 2006.

BUFFA FILHO, W. et al. Quantitative determination of cytotoxic firodo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemistry**. Anais, v.12, p. 1- 4, 2001.

CARVALHO, A C. B. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T & C Amazônia**, v. 5, n. 11, p.1-7, 2007.

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**. 2002. 153f. Tese (Doutorado em Agronomia) - UNESP, Botucatu, 2002.

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

EMBRAPA-HORTALIÇAS. **Manjeriço**: *Ocimum basilicum* L. Porto Velho, 2001. (Série: "Plantas Medicinais" do Subprojeto de horto-matriz de plantas medicinais em Porto Velho – Rondônia).

FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. **Economic Botany**, v. 39, p. 232-40, 1985.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE)**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria – Rio Grande do Sul, RS, 2006.

FRANÇA, S.C. et al. Micropagation of *Stryphnolobos polyphythum* (Barbatimão). **Plant Cell tissue & Organ Culture**, v. 42, p. 291- 293, 1995.

FRANÇA, S.C.; BERTONI, B.W.; PeEREIRA, A.M.S. Antihepatotoxic agent in micropropagated plantlets of *Eclipta alba*. **Plant Cell Tissue & Organ Culture**, v. 40, p. 297-299, 1995.

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

ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. **Yakugaku Zasshi**, v. 122, n.4, p. 291- 294, 2002.

LAWRENCE, B.M. A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavor and fragrance industries. In: JANICK, J.; SIMON, J.E. (Eds.). **New crops**. New York: Wiley, p.620-627, 1993.

LIMA, C. M. B. L. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L.** 2007. 108f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

LORENZO, H; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544p, 2003.

KOLLÁVORÁ, K. Effect of auxins on *Karrwinskia humboldtiana* root cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.79, p. 213-221, 2004.

MANSUR, E. Cultura *in vitro* de *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntke. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 45. , 1994, São Leopoldo, RS. **Anais...** São Leopoldo: SBB, p. 207,1994.

MARQUES, L. C. O mercado de produtos fitoterápicos. **Fármacos e Medicamentos**, n. 4, p. 43-46, 1999.

MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 249-254, 1992.

MONTANARI JUNIOR, I. Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (Orgs). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Senac, p. 35-54, 2002.

MORI, T. et al. Effect of insulina leaf extract on development of diabetes: comparison between normal, streptozotocininduced diabetic rats and hereditary diabetic mice. **J Jpn Society Nut Food Science**. v.54, p.197-203, 2001.

MOURA, B.A.S. **Estudo químico e farmacológico de espécie vegetal *Cissus sycioides* L.** Belém: Universidade do Pará, 1986. 98p. (Apostila do curso de especialização em química de produtos naturais).

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.

PEPATO, M. T. et al. *Cissus sycioides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biot Appl Bioch.** v.37, p.15-20. 2003.

PEREIRA, A.M.S.et al. Micropropagation of pothomorphe umbellata via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.60, p. 47-53, 2000.

PEREIRA, A.M.S.; CÂMARA, F.L.A.; FRANÇA, S.C. Vegetative propagation in *Mikania glomerata*: Micropropagation and Cuttings. **Acta Horticulturae**, v.3, n. 502, p. 357- 362, 1999.

PEREIRA, A.M.S. et al. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell tissue & Organ Culture**, v. 42, p. 295-297, 1995.

PEREIRA, A.M.S. et al. Micropropagation of *Maytenus aquilolia* . **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 2, n. 3, p.11 19, 1994.

PHIPPEN, W.B.; SIMON, J.E. Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.), **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.36, p.250-254, 2000.

PHIPPEN, W.B.; SIMON, J.E. Anthocyanins in basil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, DC., v. 46, p. 1734-1738, 1998.

PIATTI, T.; BOLLER, T.; BRODELIUS, P.E. Induction of Ethylen biosynthesis is correlated with but not required for induction of alkaloid accumulation in elicitor treated *Eschscholtzia* cells. **Phytochemistry**, Elmsford, v.30, n.7, p. 2151-54, 1991.

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

POZO, J.C.D. et al. Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, v. 123, p.173-183, 2005.

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

RODRIGUES, A. G. Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. JORNADA CATARINENSE ; I JORNADA INTERNACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS, 5., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: UNIVILLE, p. 68-69, 2006.

SANTOS, H. B. et al. Avaliação do efeito hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos fase II. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n 1, p. 70-76. 2008.

SILVA, G. A.; AKISUE, G.; OGA, S. Ensaio farmacológico de ação hipoglicemiante dos extratos fluidos de *Cissus sicyoides* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.5, p.144 -155, 1996.

SILVA, G.A. **Caracterização e padronização farmacológica da droga e extrato fluído de *Cissus sicyoides* L.** 1995. 82f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1995.

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

SIMON, J.E. Essential oils and culinary herbs. In: JANICK, J.; SIMON, J.E. (Eds.). **Advances in new crops**. Portland: Timber Press, p.472-483, 1990.

SINGH, N.K.; SEHGAL, C.B. Micropropagation of "Holy basil" (*Ocimum sanctum* L.) from young inflorescences of mature plants. **Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 161-166, 1999.

TOLEDO, M.C.F. Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides*). **Journal Food Science**, v. 48, p. 1368–1369, 1983.

TOMODA, M. et al. Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. **Planta Medica**, v. 20, p. 8-12, 1987.

USDA. **Tropical products**: world markets and trade. 1998. Disponível em <<http://ffas.usda.gov/hp/tropical/1998/98%2D03/troptoc.htm>>. Acesso em 18 dez. 2008.

VASCONCELOS, T. H. C. **Ensaio toxicológico pré-clínico e clínico com as folhas da *Cissus sicyoides* L.** 2004. 178f.. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

VIANA, G. S. B. et al. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharm**, v. 4, p. 1-7, 2004.

VIEIRA, C. C. J.; BRAGA, M. R.; FIGUEREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 233-238, 1995.

YOSHIMATSU, K.; KAIO, K.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha* (II): Characteristics of regenerated plants field-cultivated in two districts. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v.144, n.1, p.22-25, 1994.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química industrial**. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.

CAPÍTULO 1

ORGANOGENESE *IN VITRO* EM *Ocimum basilicum* L. A PARTIR DE SEGMENTOS INTERNODAIS¹

¹ Artigo ajustado a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico: Revista Ceres.

Organogênese *in vitro* em *Ocimum basilicum* L. a partir de segmentos internodais¹

Fabíola Santana Rebouças²; Weliton Antonio Bastos de Almeida³.

RESUMO

O manjeriço é um exemplo de aproveitamento da variabilidade genética de compostos secundários, contudo, uma das maiores dificuldades na utilização de espécies da família Lamiaceae para fins farmacêuticos é a variabilidade individual, devido à heterogeneidade genética e bioquímica. Objetivou-se neste trabalho a multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. via organogênese. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do CCAAB da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade Maria Milza em Cruz das Almas. Segmentos internodais de plantas de manjeriço cultivadas *in vitro* foram utilizados como explantes e introduzidos em meio de cultivo MT com BAP nas concentrações: 0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹. Após trinta dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de explantes responsivos e o número de gemas/explante. Para o enraizamento, brotos foram transferidos para meio MT contendo 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado e ANA nas concentrações: 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹. Após sessenta dias de cultivo avaliou-se: a) porcentagem de enraizamento; b) comprimento da maior raiz (cm); c) peso da matéria fresca (g) e d) peso da matéria seca (g). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa SISVAR sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A adição de 2,0 mg L⁻¹ BAP promoveu a melhor resposta organogênica. Para o enraizamento das microplantas de manjeriço, não se faz necessário o adicionamento de ANA.

Palavras-Chave: Micropropagação, Manjeriço, Explante.

- 1- Artigo extraído de dissertação a ser submetido ao Comitê Editorial da Revista Ceres
- 2- Engenheira Agrônoma – Mestranda em Ciências Agrárias – UFRB. Cruz das Almas – Ba. CEP. 44380-000. E-mail: fabyolasr@hotmail.com
- 3- Drº Professor Adjunto – UFRB. Cruz das Almas – Ba. CEP. 44380-000.

***In vitro* organogenesis in *Ocimum basilicum* L. from segments internodais**

ABSTRACT

The basil is an example of exploitation of the genetic variability of secondary compounds, however, one of the greatest difficulties in the use of the family Lamiaceae species for pharmaceutical use is the individual variability due to genetic and biochemical heterogeneity. The objective of this research the multiplication *in vitro* of *Ocimum basilicum* L. via direct organogenesis. The experiment was conducted at the Laboratory of Tissue Culture of Plants CCAAB Recôncavo Federal University of Bahia in partnership with the Biotechnology Laboratory of the Faculty in Maria Milza in Cruz das Almas. Internodais segments of seedlings of basil *in vitro* were used as explants and introduced on medium MT with BAP concentrations: 0,0; 2,0 and 4,0 mg L⁻¹. Thirty days after, the percentage of responsive explants and the number of shoots/explant were evaluated. For rooting shoots were transferred to MT medium containing 0.5 g L⁻¹ of activated charcoal and NAA concentrations: 0,0; 1,0; 2,0 and 3,0 mg L⁻¹. Sixty days after it was evaluated: Percentage of rooting; length of the largest root (cm) Weight of the fresh matter (g) and weight of dry matter (g). The data were statistically analyzed by the program SISVAR and the averages compared by Tukey test at 5% probability. The addition of 2.0 mg L⁻¹ BAP promoted the best organogenic response. For the rooting of the micro basil, does not need the addition of NAA.

Keywords: Micropropagation, Basil, Explants.

INTRODUÇÃO

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta aromática, pertencente à família Lamiaceae, rica em óleos essenciais, cujas propriedades medicinais estão consagradas pelo uso popular e que vem sendo usada desde os tempos antigos. Provavelmente chegou à Europa vinda da Índia, passando pelo Oriente Médio, sendo subespontâneo em todo o Brasil (Ribeiro *et al.*, 2007).

Planta herbácea anual, de polinização cruzada, resultando em grande número de subespécies, variedades e formas. Muito ramificada, aromática e perfumada, atingindo cerca de 0,5 a 1m de altura. Possui haste reta com muitas folhas carnosas, ovaladas, sem pêlos e de cor verde brilhante, sendo muito utilizadas na culinária por serem saborosas e decorativas. Suas flores são brancas ou avermelhadas, formando espigas e seus frutos são aquênios (fruto minuto, seco e indeiscente) (Embrapa, 2001).

Devido a suas propriedades como estimulante, expectorante e carminativa é uma planta muito utilizada popularmente como medicinal, sendo indicada para o tratamento de febre, infecções respiratórias, pneumonia, tosse, diarreias, entre outras doenças. Em sua constituição química apresenta: óleos essenciais (eugenol, estragol, linalol, lineol, alcanfor, cineol, pineno e timol), taninos, saponinas, flavonóides, ácido cafeico e esculosídeo (Embrapa, 2001). Foi demonstrado que esta espécie pode ser rica em antocianinas e outras espécies deste mesmo gênero, podem ser uma fonte potencial de antioxidantes (Phippen & Simon, 1998).

O manjeriço é um exemplo de aproveitamento da variabilidade genética de compostos secundários, do qual existem mais de 40 tipos descritos, a maioria comercializada nos Estados Unidos e Europa, com fins culinários, ornamentais e aromáticos (Simon *et al.*, 1999). Contudo, uma das maiores dificuldades na

utilização de espécies da família Lamiaceae para fins farmacêuticos é a variabilidade individual, devido à heterogeneidade genética e bioquímica (Shetty, 1997; Vieira *et al.*, 2001), além disso, o declínio no teor de princípios ativos ou de óleos essenciais em plantas medicinais é comum quando estas são cultivadas por longos períodos e submetidas à vários cortes (Pereira *et al.*, 1999).

Considerando-se tais limitações, torna-se fundamental o desenvolvimento de estratégias alternativas, que tenham como propósito a produção de mudas homogêneas, gerando biomassa para estudos químicos e farmacológicos, além de servir para proteger o germoplasma existente. Neste contexto, diversas estratégias biotecnológicas têm se constituído em novas ferramentas para a produção de biomassa e metabólitos de interesse medicinal, incluindo a cultura de células e tecidos vegetais e, mais recentemente, a engenharia genética (Oksman-Caldentey *et al.*, 2004).

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a micropropagação e a embriogênese somática possibilitam a propagação clonal em larga escala de genótipos superiores quanto às qualidades agronômicas e composição química. A aplicação dessas técnicas depende de fatores associados à indução e ao controle da morfogênese em suas duas rotas de regeneração: organogênese (regeneração de brotos e raízes) e embriogênese. A organogênese *in vitro* ocorre com a formação de gemas adventícias, que são assim denominadas por terem origem em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta (Moura *et al.*, 2001). Esta via de regeneração pode ser indireta ou direta, dependendo da formação ou não de calos, respectivamente.

O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os fitorreguladores se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (Moura *et al.*, 2001). O uso de reguladores vegetais quando empregados no manejo da planta podem modificar seu comportamento, alterando não só a produtividade desta, como o seu metabolismo secundário, obtendo-se às vezes um aumento do teor de óleo essencial (Shukla & Farooqi, 1990). As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores vegetais mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores vegetais (Skoog & Miller, 1957).

Alguns estudos *in vitro* têm sido conduzidos com o gênero *Ocimum*, usando diferentes explantes, como segmento nodal (Ahuja, 1982), foliar (Phippen & Simon, 2000) inflorescência jovem (Singh & Sehgal, 1999) e botões axilares (Begun, 2002).

Tendo em vista a crescente demanda da utilização da técnica de micropropagação em plantas aromáticas e medicinais, bem como o fato do grande interesse das indústrias farmacêuticas pelo *O. basilicum*, não apenas pelas propriedades medicinais desta planta, mas também pelo valor como planta aromática e produtora de óleo essencial utilizado em perfumes, o que tem necessitado produção em larga escala desta planta, então objetivou-se no presente trabalho a multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. via organogênese.

MATERIAL E METÓDOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade Maria Milza (FAMAM), Cruz das Almas, Bahia.

Indução de Brotações Adventícias

Segmentos internodais de plantas de *Ocimum basilicum* L. cultivadas *in vitro*, com comprimento aproximado de 1cm, foram utilizados como explantes. Os segmentos foram introduzidos em placas de Petri (100 x 15 mm), contendo meio de cultivo MT (Murashige & Tucker, 1969) acrescido de 25 g L⁻¹ de sacarose, suplementado com BAP nas concentrações: 0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ e solidificado com fitagel (0,2%) com pH ajustado para 5.8 antes da autoclavagem a 127 °C por 20 minutos. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura de 27 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas e 40 μM m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Após trinta dias avaliou-se a porcentagem de explantes responsivos e o número de gemas por explante responsivo. O delineamento experimental utilizado

foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e sete repetições, sendo cada repetição constituída por uma Placa de Petri com cinco explantes cada. Posteriormente, as brotações de *O. basilicum* L. (manjeriço) obtidas via organogênese direta, foram introduzidos em meio MT fixando-se a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, mantendo-se identificadas a origem da concentração advinda, para multiplicação das brotações *in vitro*, durante trinta dias.

Indução de Enraizamento dos Brotos

Após este período, brotos com altura 3,5 a 4,0 cm foram transferidos para os seguintes meios visando o enraizamento: MT + 25 g L^{-1} de sacarose + 0,2% fitagel + $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado acrescido de 0,0; 1,0, 2,0 e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco com cinco brotos. Os frascos contendo os brotos foram cultivados nas mesmas condições anteriormente citadas durante sessenta dias. Após este período avaliou-se: a) porcentagem de enraizamento; b) comprimento da maior raiz (cm); c) peso da matéria fresca (g) e d) peso da matéria seca (g). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa SISVAR sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a concentração $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP foi aquela que promoveu o maior percentual de explantes responsivos, cerca de 82,85%, (Figura 1), embora não diferindo significativamente da concentração $4,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em trabalho com híbrido de orquídea *Brassavola flagerallis* x *Cattleya harrisoniana*, constatou-se que segmentos internodais são recomendáveis para a organogênese *in vitro* deste híbrido sem a adição do regulador vegetal BAP (Nascimento, 2007). Em micropropagação de *Ocimum basilicum* L. a partir de cotilédones de sementes germinadas *in vitro*, obteve-se maior porcentagem de explantes responsivos (66,7%) em meio MS com 5 mg L^{-1} BAP e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ANA

(Dode, 2003). Admite-se que estas diferentes expressões morfogênicas podem ser reflexões, da natureza e do grau de diferenciação destes tecidos (Torres et al., 1999). Além disso, a indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas em culturas de células, tecidos e órgãos *in vitro*, são dependentes de fatores externos, químicos e físicos, como o meio de cultura, reguladores vegetais além das condições de cultivo como temperatura e luminosidade e também de fatores inerentes ao material vegetal, como os fatores hereditários ou genéticos e o estado fisiológico da planta mãe doadora do explante (Grattapaglia & Machado 1998). Dos fatores externos pode-se destacar os meios de cultura, que além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas et al., 1990),

Em trabalho com *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), avaliou-se o efeito do BAP e KIN na indução de regeneração *in vitro* de segmentos nodais e apicais, sendo que os melhores resultados quanto à porcentagem de regeneração foi obtido utilizando BAP independente do tipo de explante (Flores et al., 1998)

A suplementação de auxina-citocinina é necessária na regulação da divisão celular, alongamento celular, diferenciação celular e formação de órgãos (Dodds & Roberts, 1999). Destaca-se a utilização dos reguladores de crescimento como as citocininas, pois estas, são indispensáveis à quebra da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e proliferação de gemas adventícias (Preece, 1995).

Neste trabalho, observou-se inicialmente um intumescimento das extremidades dos explantes, onde ocorreu a formação de múltiplas gemas adventícias, a partir do décimo dia de cultivo *in vitro*, sendo a partir do vigésimo dia de cultivo, observada a formação de brotações (Figura 2).

Semelhantemente, quanto ao número médio de brotações por explante, verificou-se que as concentrações 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ foram aquelas que apresentaram o melhor resultado, com médias de 7,71 e 4,57 respectivamente, não diferindo significativamente entre si (Figura 3). Trabalho realizado por Dodde (2003) a partir de cotilédones de sementes de *Ocimum basilicum* L. germinadas *in vitro*, verificou que a maior média de brotos por explante, com cerca de 3,46 foi obtido quando se utilizou meio MS suplementado com 5 mg L⁻¹ BAP e 0,2 mg L⁻¹ ANA (Dodde, 2003).

O número de brotos obtidos neste trabalho é similar ao obtido por Rathore *et al.*, (1992) na multiplicação *in vitro* de *Maytenus emarginata*, que utilizaram meio MS acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de AIA e 2,5 mg L⁻¹ de BAP e aos de Pereira *et al.*, (1995), que regeneraram plantas a partir de gemas axilares de *M. ilicifolia* no meio MS suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de BAP. Trabalho com regeneração *in vitro* de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma*), utilizando segmentos nodais, a maior média de brotações (6,85), foi obtida com adição de BAP em uma concentração menor, cerca de 0,1 mg L⁻¹ BAP em combinação com GA₃ (Mantovanni, 2001). No entanto, este autor utilizou explantes que são mais totipotentes, uma vez que apresentam células meristemáticas. No presente trabalho, na indução de manjerição *in vitro*, 7,71 brotos foram obtidos após trinta dias de cultivo em meio MT com 2,0 mg L⁻¹ de BAP. Estas brotações, assim como as brotações obtidas nos outros tratamentos, foram transferidas para meio MT fixando-se a concentração de BAP que promoveu a melhor resposta organogênica (2,0 mg L⁻¹) durante trinta dias (Figura 4).

Posteriormente foi induzido o enraizamento das brotações *in vitro*, onde avaliou-se a porcentagem de enraizamento. Observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados (Figura 5), sendo que foi obtido 100% de enraizamento para as concentrações de 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ ANA. Em trabalho com multiplicação *in vitro* de anador (*Justicia pectoralis* Jack), concluiu-se que para o enraizamento das microplantas desta espécie, não foi necessário o adicionamento de auxina exógena AIB (Vicente, 2008). Em *Aloe vera* foi obtido 90 e 100% de enraizamento *in vitro* com brotos cultivados em meio MS suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de AIB ou ausência de reguladores, respectivamente (Aggarwal & Barna, 2004). Em trabalho com diferentes concentrações de ANA e AIB, observou-se que o AIB induziu melhores resultados de enraizamento em brotações de louro-pardo, com média de 73% de brotações enraizadas quando foi utilizado AIB combinado com carvão ativado (Mantovani *et al.*, 2001). Estes mesmos autores relataram o excesso de calosidade obtido quando utilizaram ANA, inibindo a multiplicação e o desenvolvimento das brotações de louro-pardo. Resultados similares à ação calogênica do ANA, também foram observados em goiabeira serrana (Dal Vesco & Guerra, 1999).

As auxinas são um grupo de reguladores vegetais fundamentais na indução da divisão celular e diferenciação de raízes (Mantovani & Franco, 1998).

A suplementação de auxinas ao meio de enraizamento é usual, entretanto, há espécies que enraízam com facilidade e não necessitam da presença destes reguladores, o que pode ser explicado pelo elevados níveis endógenos desses fitohormônios (Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001). A presença do carvão ativado no meio de cultivo, também favorece o enraizamento de brotações *in vitro*. O carvão ativado em concentrações de 0,2 a 3% pode ser utilizado para o enraizamento de diversas culturas (Pasqual *et al.*, 2001). Fisicamente, ele simula a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor, quimicamente, retém substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes além de compostos orgânicos como auxinas e citocininas.

Com relação ao comprimento da maior raiz, peso da matéria seca e fresca, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos utilizados (Tabela 1) e (Figura 7). Diferentemente deste trabalho, na micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), foram obtidas raízes de até 17 mm de comprimento médio, quando utilizou 4,8 μM de ANA (Andrade *et al.*, 2000). Na multiplicação *in vitro* de *Ocimum gratissimum* L., a partir de explantes nodais, foi observado, maior número de raízes em meio MS contendo 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,25 mg L⁻¹ AIA (Gopi *et al.*, 2006). Aplicações de GA₃ em *Ocimum basilicum* L., aumentaram a massa fresca das plantas e a massa seca, sendo 100 ppm a melhor concentração (Shedeed *et al.*, 1990).

A formação de raízes nas brotações de *O. basilicum*, quando cultivadas em meio de cultura sem regulador vegetal, provavelmente ocorreu devido ao acúmulo de auxinas endógenas em partes aéreas da planta (Figura 07). As partes aéreas são fontes de intensa produção de auxina que, ao ser translocada para a base, estimularia a rizogênese (Coll *et al.*, 1988). Assim, em algumas espécies, pode ser dispensado o uso de auxinas no enraizamento, como foi observado em *Aloe vera* (Silva *et al.*, 2007), ou até mesmo ser dispensada a etapa do enraizamento, como foi constatado em trabalho com micropropagação de babosa, onde concluiu-se que não houve necessidade da fase de enraizamento com o adicionamento de auxinas para esta espécie. (Brito, 2007).

CONCLUSÕES

- A adição de BAP ao meio de cultura MT na concentração de 2,0 mg L⁻¹ influenciou positivamente, sendo fundamental para promover melhor resposta organogênica.
- Para o enraizamento das microplantas de *Ocimum basilicum* L. não se faz necessário o adicionamento de ANA como fonte de auxina exógena ao meio MT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal D, Barna, KS. Tissue culture propagation of elite plant of Aloe vera Linn. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, 13:77-79, 2004.
- Ahuja A, Verma, M, GREWAL S. Clonal propagation of *Ocimum* species by tissue culture. **Indian Journal Experimental Biology**, 20: 455-458, 1982.
- Andrade MW de, Luz JMQ, Lacerda AS, Melo PRA de. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 174-180, 2000.
- Begun F, Amin MN, Azad MAK. *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum*. **Plant Tissue Culture**, 12: 27-35, 2002.
- Brito, C. F de. **Micropropagação de babosa (Aloe vera L.)**. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007.
- Caldas LS, Haridasan P, Ferreira ME. Meios Nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. **Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPQ, p. 37-70, 1990.
- Coll JB, Rodrigo GN, García BS, Tomes RS. Morfogêneses. **Fisiologia Vegetal**, Cap.8, p.569-570, 1998.
- Dal Vesco LL, Guerra MP. Organogênese e micropropagação de goiabeira serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 21: 60-64, 1999.
- Dode LB, Bobrowski VL, Braga EJB, Seixas FK, Schuch MW. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, 25: 435-437, 2003.
- Dodds JH, Roberts LW. **Experiments in plant tissue culture**. Cambridge University Press, 256p, 1999.

- Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manjeriço**: *Ocimum basilicum* L. Embrapa Hortaliças: Rondônia, 2001 (Série: "Plantas Medicinais" do Subprojeto de horto-matriz de plantas medicinais em Porto Velho – Rondônia).
- Flores R, Stefanello S, Franco ETH, Mantovani N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência** v. 4, p. 201-205, 1998.
- Gopi C, Sekhar N, Ponmurugan P. *In vitro* multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.723-726, 2006.
- Grattapaglia D, Machado MA. Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.
- Mantovani NC, Franco ETH, Vestena S (2001) Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (VELOZO) ARRABIDA EX STEUDEL). **Ciência Florestal**, v. 11, p. 93-101, 2001.
- Mantovani NC, Franco ETH. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, CEPEF, FATEC, 1998.
- Moura TL de, Almeida WAB de, Mendes BMJ, Mourão Filho FAA (2001) Organogênese *in vitro* de Citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 240-245, 2001.
- Nascimento MA de A. **Morfogênese in vitro do híbrido de orquídea Brassavola flagerallis x Cattleya harrisoniana**. 2007. 42f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007.

Oksman-Caldentey K, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.

Pasqual M, Ramos JD, Dutra LF. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. 2001. 79f. Monografia – (Especialização). Universidade Federal de Lavras, 2001.

Pereira MAS, Câmara FLA, França SC. Vegetative propagation in *Mikania glomerata*: Micropropagation and Cuttings. **Acta Horticulturae**, v.3, p.357-362, 1999.

Phippen WB, Simon JE. Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 36, p. 250-254, 2000.

Phippen WB, Simon JE. Anthocyanins in basil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 1734-1738, 1998.

Pinto JEB, Lameira AO. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

Preece JE. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1, p. 26-37, 1995.

Rathore TS, Deora NS, Shekhawat NS. Cloning of *Maytenus emarginata* (Willd.) Ding Hou-atre of the Indian Desert, through tissue culture. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 9, p. 449-451, 1992.

Ribeiro M de F, Donini LP, Souza JA de, Guisso AP, Moura IF, Bobrowski VL, Viéguas J. Influência de Diferentes Concentrações de Sais de MS e Açúcares

no Cultivo *in vitro* de Manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 57-59, 2007.

Shedeed MR, El-Gamassy RM, Hashim ME, Kandeel AM Physiological studies on the growth, oil yield and chemical constituents in basil plant, *Ocimum basilicum* L. 1. Effect of some growth regulators on the vegetative growth. **Annals Agricultural Science**, Cairo, v. 35, p. 971-979, 1990. (CAB on CD-ROM, v. 3 B, 1992. Abstract 06841).

Shetty K. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenols: focus on Lamiaceae. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 6, n. 3, p. 162-171, 1997.

Shukla A, Farooqi AHAE. Review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research Medicinal & Aromatic Plants**, v. 12, n. 3, p. 152-7, 1990.

Silva, CG, Debiasi C, Pescador R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, p.29-35, 2007.

Simon, JE, MR Morales, WB Phippen RF, Vieira, and Z. Hao. 1999. Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. p. 499–505. In: J. Janick (ed.), Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA.

Singh, NK, Sehgal, CB. Micropropagation of “Holy basil” (*Ocimum sanctum* L.) from young inflorescens of mature plants. **Plant Growth Regulation**, v. 29, p.161-166, 1999.

Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, New York, v. 11, p. 118-131, 1957.

Torres, AC, Caldas LS, Buso JA. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, 1999. v.2, p.524.

Vicente MAA. **Multiplicação in vitro e aclimatação de plantas medicinais (Vernonia condensata: Justicia pectoralis)** 2008. 52f Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2008.

Vieira RF. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochem. Syst. Ecol., Kidlington**, v. 29, n. 3, p.287-304, 2001.

FIGURAS E TABELA

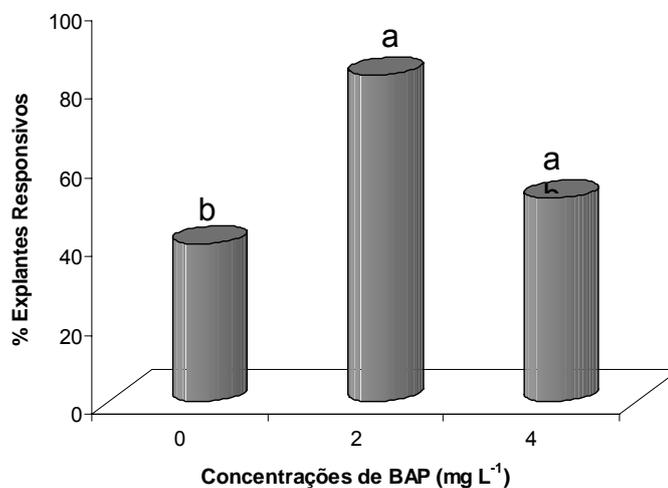


Figura 1: Percentual de explantes responsivos em função de concentrações de BAP em segmentos internodais de *Ocimum basilicum* L. *in vitro* aos trinta dias de cultivo. Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey 0.05).

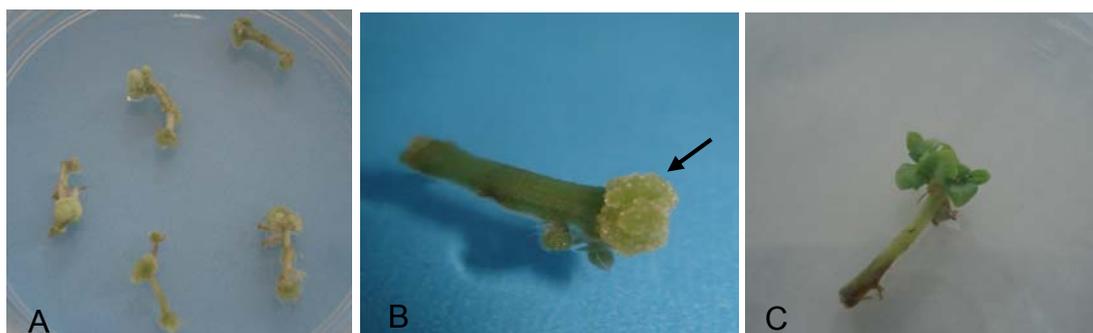


Figura 2: Organogênese *in vitro* em *Ocimum basilicum* L. a partir de segmentos internodais. **A-** Segmentos internodais de *O. basilicum* aos cinco dias de cultivo. **B-** Detalhe do início da formação das gemas com 10 dias de incubação. **C-** Broto de *O. basilicum* L. *in vitro* aos vinte dias de cultivo.

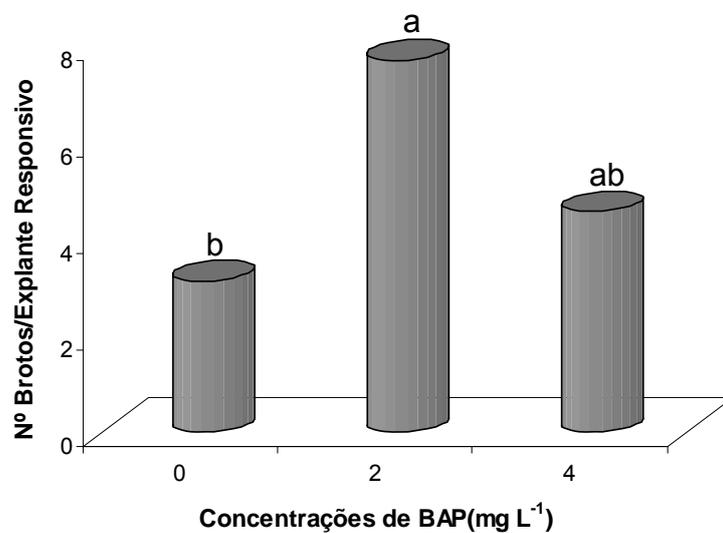


Figura 3: Número de brotos por explante responsivo a partir de segmentos internodais de plantas de *Ocimum basilicum* L., em função de concentrações de BAP aos trinta dias de cultivo. Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey 0.05).

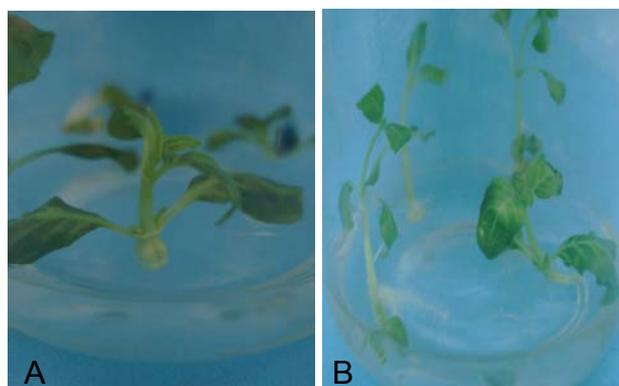


Figura 4: Plântulas de *Ocimum basilicum* *in vitro*. (A) Brotos com quinze dias de cultivo. (B) Brotos com trinta dias de cultivo.



Figura 5: Enraizamento de *Ocimum basilicum* in vitro. A) 0,0 mg L⁻¹ ANA. B) 1,0 mg L⁻¹. C) 2,0 mg L⁻¹ ANA. D) 3,0 mg L⁻¹ ANA.

TABELA 1: Comprimento, matéria fresca e matéria seca de raízes de plântulas de *Ocimum basilicum*, em função de diferentes concentrações de ANA.

Concentrações de ANA (mg L ⁻¹)	CMR (cm)	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)
0	5.25a*	1.25a	0.087a
1	5.00a	1.00a	0.1a
2	3.20a	1.20a	0.062a
3	3.20a	2.20a	0.116a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0.05).
CMR – Comprimento da maior raiz (cm).



Figura 7: Raízes de microplantas de *Ocimum basilicum* L., em ausência de regulador vegetal.

CAPÍTULO 2

CALOGÊNESE EM *Cissus sicyoides* L. A PARTIR DE SEGMENTO FOLIAR¹

¹ Artigo ajustado a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmento foliar

Rebouças, F.S.¹; Almeida, W.A.B.²

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas – BA. CEP: 44380 - 000. E-mail: fablly2000@yahoo.com.br. ²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas – BA. CEP: 44380 - 000.

RESUMO: Os metabólitos secundários são essencialmente produzidos e extraídos a partir de plantas cultivadas no campo sofrendo, portanto, a influência de variações sazonais. A utilização de técnicas biotecnológicas apresenta-se como um recurso alternativo para a produção de fármacos. Dentre essas técnicas, destaca-se a cultura de tecidos sobretudo através da calogênese, uma vez que o crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de metabólitos secundários com o crescimento celular. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de calogênese de *Cissus sicyoides* L., a partir de segmentos foliares (tecido adulto). Para o estabelecimento *in vitro*, foram utilizados como explantes, segmentos foliares retirados de planta adulta cultivada em campo. Após desinfestação, o material foi inoculado em meio MT + 1,0 mg L⁻¹ ANA e mantido em câmara de crescimento tipo BOD, com temperatura e luminosidade controladas. Após 30 dias avaliou-se a porcentagem de explantes sobreviventes e porcentagem de contaminação. Para o cultivo utilizou-se o meio MT+ 1,0 mg L⁻¹ ANA, variando-se as concentrações de BAP em: 2,0; 4,0; 6,0 e 12,0 mg L⁻¹. No cultivo avaliou-se o número de calos compactos e friáveis. Para o primeiro e segundo subcultivo o material foi introduzido em meio MT + 1,0 mg L⁻¹ ANA variando-se as mesmas concentrações de BAP, sendo avaliados o número de calos friáveis formados e a porcentagem de área coberta com calos. Foi obtido ainda o número de repetições formadas no decorrer dos subcultivos e peso da matéria fresca (g) e seca (g). Em seguida, fez-se os testes fitoquímicos para identificação de alguns constituintes. Concluiu-se que o tempo e concentração de hipoclorito de sódio utilizados, mostrou-se pouco eficientes para a desinfestação. Para a calogênese de *Cissus sicyoides* L. a partir de segmento foliar faz-se necessário a adição de 6,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultivo. Identificou-se a presença de heterosídeos cardiotônicos em calos de *Cissus sicyoides* L.

Palavras-Chaves: Metabólitos secundários; Explante; Cultivo.

Callus in *Cissus sicyoides* L. from leaf segments

ABSTRACT: Callus in *Cissus sicyoides* L. from leaf. The secondary metabolites are mainly produced and extracted from plants grown in the suffering, so the influence of seasonal variations. The use of biotechnology techniques is presented as an alternative use for the production of drugs. Among these techniques, there is a culture of callus tissue mainly through, as the growth of callus is desirable to induce somaclonal variation and physiological studies, especially when you want to relate the presence of secondary metabolites with cell growth. The objective of this work was to establish a protocol for *Cissus sicyoides* L. callus from leaf segments (adult tissue). To establish *in vitro*, were used as explants, leaf segments taken from adult plants grown in field. After disinfestation, the material was inoculated into MT medium + 1.0 mg L⁻¹ NAA and kept in BOD type of growth chamber, with controlled temperature and luminosity. After 30 days it was evaluated the percentage of surviving explants and percentage of contamination. For the cultivation using the MT medium + 1.0 mg L⁻¹ NAA, is the varying concentrations of BAP in: 2.0, 4.0, 6.0 and 12.0 mg L⁻¹. In cultivation it was evaluated the number of compact and friable callus. For the first and second subculture the material was introduced into MT medium + 1.0 mg L⁻¹ NAA was the same varying concentrations of BAP, and assessed the number of friable callus formed and the percentage of area covered with calluses. It also obtained the number of repeats formed during the subcultures and weight of fresh matter (g) and dry (g). Then there was the phytochemical tests for identification of some constituents. It was concluded that the time and concentration of sodium hypochlorite used, proved to be inefficient for disinfestation. For the callus of *Cissus sicyoides* L. from leaf segment it is necessary the addition of 6.0 mg L⁻¹ BAP to the medium of culture. It was the presence of cardiac heterosides in callus of *Cissus sicyoides* L.

Key words: Secondary metabolites; Explants; Cultivation.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cissus* é o maior da família Vitaceae, com cerca de 350 espécies distribuídas entre as Américas, a Ásia e a Austrália. Estudos realizados com algumas espécies de *Cissus* têm revelado várias atividades farmacológicas, dentre as quais destacam-se as atividades: antioxidante e antimicrobiana (Murthy et al., 2003; Silva et al., 2007), inibidor da enzima acetilcolinesterase (Barbosa-Filho et al., 2006), hipoglicemiante (Barbosa et al., 2002), na prevenção da osteoporose (Shirwaikar et al., 2003), entre outras. Na composição química de *Cissus sicyoides* L., há alcalóides, flavonóides (Moura, 1986; Albuquerque, 1989), esteróides, saponinas, mucilagens, compostos fenólicos (Silva, 1995), antocianinas (Toledo, 1983) e tem atividade farmacológica comprovada no tratamento de convulsão, doenças do coração (Elizabetsky, 1988; Moura, 1986; Costa, 1990) e controle de diabetes crônica (Pepato et al., 1998). O estudo da propagação de espécies utilizadas na medicina popular tem sido intensificado nos últimos anos, devido ao crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos fármacos e da utilização da fitoterapia como um meio alternativo.

Os metabólitos secundários são essencialmente produzidos e extraídos a partir de plantas cultivadas no campo sofrendo, portanto, a influência de variações sazonais, pragas, doenças e condições meteorológicas (Viana et al., 2004). Segundo estes autores, a utilização de técnicas biotecnológicas apresenta-se como um importante recurso alternativo para o cultivo das espécies, atuando como fonte biológica contínua para a produção de fármacos.

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

de calos é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de metabólitos secundários com o crescimento celular.

O metabolismo secundário manifesta-se em células e tecidos específicos em determinados estágios de crescimento de plantas superiores e a expressão desse metabolismo está intimamente correlacionada com o crescimento e a diferenciação morfológica de células (Cerqueira et al., 2002). Conforme estes autores, vários fatores interferem na calogênese, tais com o tamanho do explante, composição do meio de cultura, reguladores vegetais, órgão fornecedor do explante, idade e época do ano em que o explante é colhido e genótipo da planta doadora.

Várias espécies de plantas medicinais têm sido submetidas a experimentos de indução de calos utilizando reguladores vegetais (Lameira et al., 1994; Becker, 1997; Abreu, 1998; Lameira, 1997; Kajiki, 1996). Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. Tisserat (1985) mostrou que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, mas a adição de citocinina pode aumentar a proliferação do mesmo.

Calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogenéticos *in vitro* e através da suspensão de células para a obtenção de produtos secundários, incluindo fármacos, representando uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de calogênese de *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares (tecido adulto).

MATERIAL E METÓDOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade Maria Milza (FAMAM).

Desinfestação do material: Utilizou-se como explantes, segmentos foliares de aproximadamente 1cm^2 , que foram excisados de plantas adultas, oriundas do Município de Elísio Medrado, ($12^\circ 56' 45'' \text{ S } 39^\circ 31' 19'' \text{ W}$) – Bahia. As folhas coletadas, foram lavadas em água corrente e desinfestadas em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 2 minutos, em seguida foram imersas em solução de hipoclorito de sódio e água na concentração de 2:1, durante 15 minutos em agitador magnético. O material vegetal foi lavado 3 vezes em câmara de fluxo laminar com água estéril.

Estabelecimento *in vitro*: Os segmentos foliares, foram inoculadas em placas de Petri contendo 20 mL meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA (ácido naftalenoacético), 25 g L^{-1} sacarose e solidificado com fitagel (0,2%), totalizando 10 Placas de Petri contendo 5 explantes cada. O pH do meio de cultura foi ajustado a 5.8, anteriormente à autoclavagem a 123° C por 20 minutos. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento, com temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{ C}$ e fotoperíodo de 16 horas e $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa. Após 30 dias avaliou-se a porcentagem de explantes e a porcentagem de contaminação.

Cultivo *in vitro*: Após a indução de calos, procedeu-se o cultivo dos mesmos, em meio MT + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, variando-se as concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) em: 2,0; 4,0; 6,0 e $12,0 \text{ mg L}^{-1}$. O material foi cultivado nas mesmas condições anteriormente citadas e decorridos 40 dias avaliou-se o número de calos compactos e friáveis obtidos.

Primeiro subcultivo: Os calos friáveis formados durante o cultivo, foram utilizados como explantes para esta fase. Utilizou-se o meio MT + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, fixando as concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) em: 2,0; 4,0; 6,0 e $12,0 \text{ mg L}^{-1}$. O material foi cultivado nas mesmas condições anteriormente citadas e decorridos 40 dias avaliou-se: Número de calos friáveis formados e a porcentagem de área coberta com calos. Na avaliação da área de calo, considerou-se que os explantes apresentavam 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos, conforme Lameira et al. (1997).

Segundo Subcultivo: Os calos friáveis formados durante o primeiro subcultivo, foram utilizados como explantes para esta fase. Semelhantemente ao primeiro subcultivo, utilizou-se o meio MT + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 2,0; 4,0; 6,0 e 12,0 mg L⁻¹ de BAP. Decorridos 40 dias avaliou-se: Número de calos friáveis formados e a porcentagem de área com calos, considerando, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos.

Testes Fitoquímicos: Após as avaliações do segundo subcultivo, fez-se as avaliações referentes ao peso da matéria fresca (g), dos calos obtidos de cada tratamento e posteriormente estes calos foram submetidos à secagem em estufa na temperatura de 38° C, por 08 horas consecutivas, para obtenção do peso da matéria seca (g). Em seguida os calos foram transferidos para erlenmeyers e cobertos com álcool etílico para o início do processo de maturação (Figura 1). Permaneceram os tratamentos dos subcultivos, ou seja, quatro tratamentos. Durante três dias, os calos permaneceram em maturação, para obtenção do extrato etanólico, sendo manualmente agitados duas vezes ao dia. Decorrido este período o extrato etanólico foi filtrado para a realização dos testes fitoquímicos utilizando as seguintes metodologias:

Constituintes Analisados	Metodologia Utilizada*
Alcalóides	Reação de Dragendorf
Haterosídeos Cardiotônicos	Reação de Liebermann-Burchard (núcleo esteroidal) Reação de Baljet e Reação de Kedde (Anel lactônico pentagonal)
Taninos	Reação com FeCl ₃
Saponinas	Altura da espuma formada
Flavonóides	Reação de Shinoda
Derivados Andracênicos	Reação de Borntrager
Cumarinas	Fluorescência no UV

* Referência: SIMÕES, C. M. O et al., 2004.



Figura 1: Calos de *Cissus sicyoides* em período de maturação, durante três dias.

Delineamento experimental

- **Cultivo:** Delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 4 repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco com quatro calos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e submetidos ao teste de Tukey.

- **Primeiro subcultivo:** Delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 6 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri com seis calos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e sbmetidos ao teste de Tukey.

- **Segundo subcultivo:** Delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 5 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri com seis calos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e sbmetidos ao teste de Tukey. Os resultados dos testes fitoquímicos foram demonstrados pela ausência (-) ou presença (+) de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Estabelecimento *in vitro* de segmento foliar (tecido adulto) de *Cissus sicyoides* L.

O processo de desinfestação utilizado mostrou-se pouco eficiente no estabelecimento *in vitro* de segmentos foliares de *Cissus sicyoides* L. obtendo elevada porcentagem de contaminação, cerca de 92%. (Tabela 1). Vários fatores podem ter influenciado para o alto índice obtido, tais como a idade da planta matriz doadora dos explantes, e o estado fisiológico da mesma, as condições ambientais como umidade relativa do ar, pluviosidade, etc.

TABELA 1: Porcentagem de contaminação no estabelecimento *in vitro* de segmento foliar a partir de tecido adulto de *Cissus sicyoides* após trinta dias de cultivo.

% Explantes Sobreviventes	% Explantes Contaminados				Total de Explantes
	Contaminação Fungo (%)	Contaminação Bactéria (%)	Contaminação (F + B) (%)	Total	
8	18	22	52	92	100

*F + B: Associação entre fungo e bactéria no mesmo explante.

O período de coleta de explantes é o principal fator limitante para o sucesso no estabelecimento *in vitro*, sendo na época chuvosa, maior a incidência de microorganismos (Costa, et. al, 2007). Os trabalhos de cultivo *in vitro*, em sua maioria, têm utilizado material juvenil como explante, em virtude do baixo nível de contaminação e de seu elevado potencial morfogenético (Barcel-Múñoz et al., 1999). No estabelecimento de alecrim pimenta a partir de explantes (segmentos nodais), extraídos de planta adulta em casa de vegetação, Costa et al., (2007), concluíram que o aumento da concentração e do tempo de imersão na solução de desinfestação, proporciona menor porcentagem de contaminação.

Em geral, a indução de calos em *C. sicyoides* L. ocorreu entre a segunda e a terceira semana de inoculação (Figura 2B), iniciando o processo na borda dos discos.

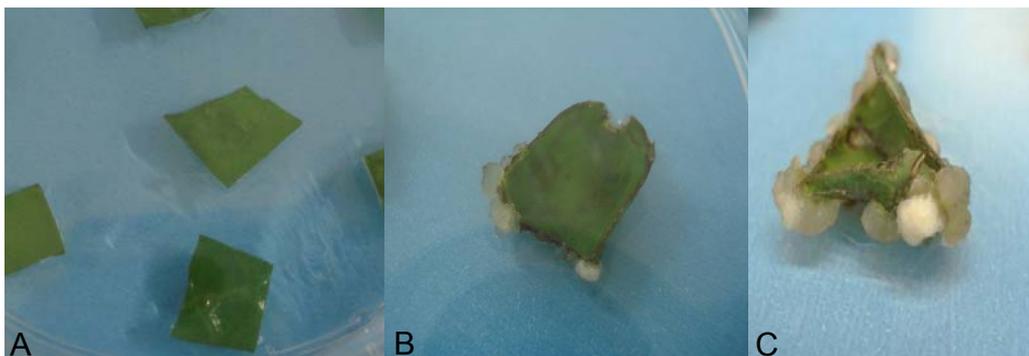


FIGURA 2 – Estabelecimento *in vitro* de segmento foliar a partir de tecido adulto de *Cissus sicyoides* L. A - Segmentos foliares *in vitro* no primeiro dia de cultivo. B- Início da formação de calo, aos quinze dias de cultivo. C - Margem do explante coberta por calo aos trinta dias de cultivo.

- Cultivo de calos de *Cissus sicyoides* L. *in vitro*.

Observou-se que de maneira geral, foram obtidos calos que apresentaram consistência predominantemente compacta (Figura 3A) e friável (Figura 3 B), com coloração variando entre verde e amarelo. A concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, promoveu o maior número de calos compactos, média de 3,80 embora não diferindo significativamente das concentrações $2,0$ e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$, com médias de 3,0 e 2,4 calos compactos, respectivamente. O maior número de calos friáveis foi obtido utilizando-se $12,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP, sendo que não houve diferença significativa desta concentração em relação as concentrações $2,0$ e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (Tabela 2).

Vieira et al. (1995) trabalhando com a indução e caracterização de calos em *Gomphrena macrocephala*, obtiveram calos compactos em segmentos nodais cultivados em meio MS suplementado com $2,7 \mu\text{M}$ de ANA e $4,4 \mu\text{M}$ de BAP. Maior proliferação de calos friáveis foi obtida cultivando-se segmentos nodais de *Paffia tuberosa*, com 1 mM de BAP e 10 mM de 2,4-D em meio MS (Flores et al., 2006).

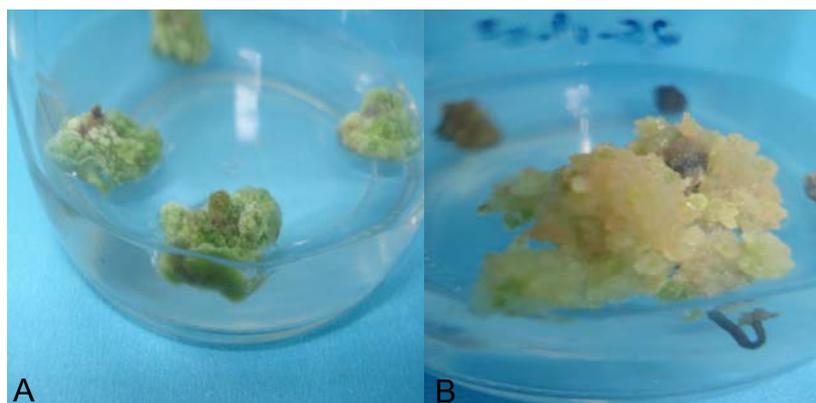


FIGURA 3 - Calos de *Cissus sicyoides* L. *in vitro* aos quarenta dias de cultivo. **A** – Calos compactos. **B** – Calo friável.

As auxinas são muito utilizadas para promover o crescimento de calos, porém as citocininas também desempenham um papel importante na calogênese. Conforme Remotti & Loffler (1995), além do tipo e concentração de auxina, a consistência dos calos também é influenciada por outros fatores, como a concentração de citocinina, tipo de explante e, sobretudo, pelo genótipo. Todos estes fatores devem ser levados em consideração durante a otimização de protocolos que tenham como propósito a produção de calos friáveis.

TABELA 2 – Calogênese de *Cissus sicyoides* L. Número de calos compactos e friáveis obtidos em função de diferentes concentrações de BAP.

Concentrações de BAP mg L ⁻¹	Calos Compactos	Calos Friáveis
2	3,00 ab*	1,00 ab
4	3,80 a	0,20 b
6	2,40 ab	1,60 ab
12	1,60 b	2,40 a
Média	2,70	1,30

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).

- Primeiro subcultivo de calos de *Cissus sicyoides* L.

Conforme a Figura 4 observou-se que o número de calos friáveis diminuiu com o aumento da concentração da citocinina, sendo na concentração 2,0 mg L⁻¹

BAP obtido o maior número de calos, cerca de 5,83 embora não diferindo significativamente das concentrações 4,0 e 6,0 mg L⁻¹, com médias de 5,33 e 4,66 respectivamente. De maneira contrária ao cultivo, no subcultivo dos calos de *C. sicyoides*, verificou-se que a concentração de 12,0 mg L⁻¹ promoveu menor formação de calos (Figura 5).

Em copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), Azevedo (2003) somente obteve calogênese utilizando 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP em meio MS na presença de luz. O balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas do calo, podem tanto estimular a proliferação celular como exercer um efeito antagônico, reduzindo a multiplicação dos mesmos. Andrade et al. (2006), verificaram que o aumento do número de brotações de *Eucalyptus grandis* foi inversamente proporcional ao aumento da dosagem e do tempo de exposição ao BAP.

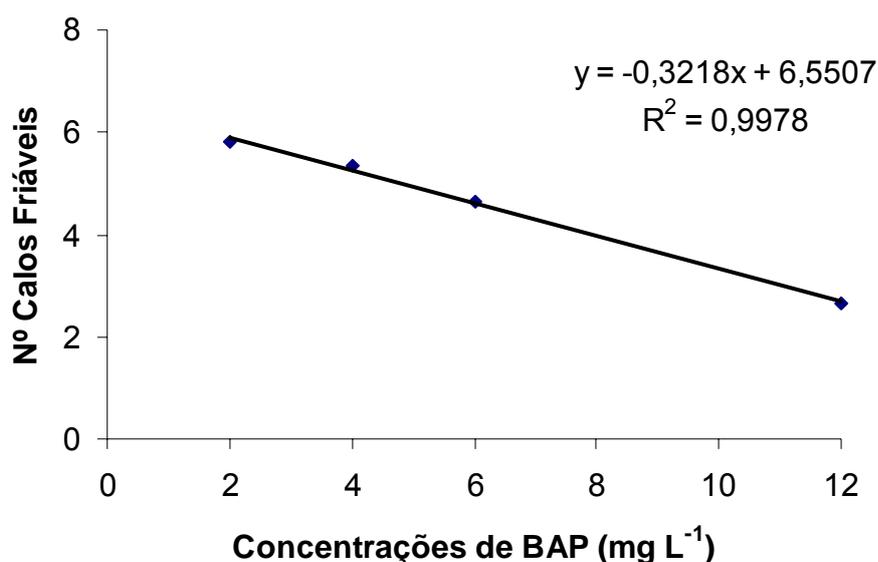


FIGURA 4: Número de calos friáveis obtidos a partir do primeiro subcultivo de calos de *Cissus sicyoides* L. em função diferentes concentrações de BAP.

Nogueira et al. (2007), concluíram que não houve efeito positivo da utilização de BAP ou TDZ em interação com 2,4-D na calogênese em explantes foliares de murici-pequeno, uma planta utilizada como medicinal. Assim como nos trabalhos descritos por: Abreu (1998), Bonilla (2002), Conceição (2000), Paiva-Neto (1996), Santos, B. (2001), Santos, C. (2001) e Soares (2003) trabalhando

com segmentos foliares de *Ingá vera* Willd subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn., *Cissus sicyoides* Linn., *Coffea arabica* Linn., *Derris urucu* (Killip & Smith) Macbr., *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. e *Chlorophora tinctoria* Gaudich., respectivamente.

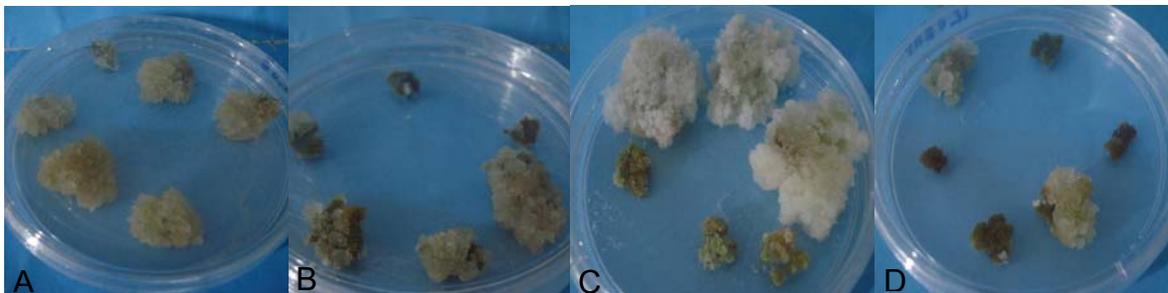


FIGURA 5: Primeiro subcultivo em calos de *Cissus sicyoides* L., a partir de segmento foliar aos quarenta dias de cultivo. A-Tratamento 2,0 mg L⁻¹ BAP. B – Tratamento 4,0 mg L⁻¹ BAP. C – Tratamento 6,0 mg L⁻¹ BAP; D - Tratamento 12,0 mg L⁻¹ BAP, todos os tratamentos combinados com 1,0 mg L⁻¹ ANA.

As diferenças observadas na proliferação dos calos ocorrem porque os explantes podem variar em sua sensibilidade para os fitoreguladores e/ou devido a diferenças no teor endógeno de hormônios (Karp, 1995).

Conforme a Figura 6, na avaliação da área de calo, considerou-se que os explantes apresentavam 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos, segundo Lameira et al., (1997) (Tabela 3).

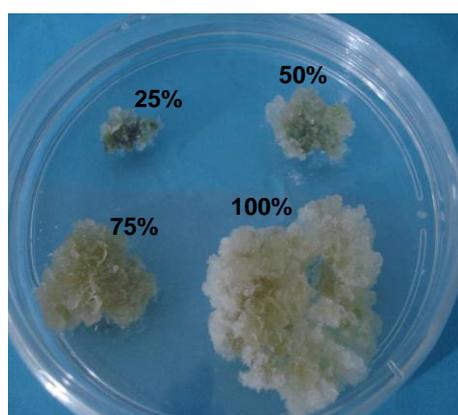


FIGURA 6 - Porcentagem de cobertura de calo friável em *Cissus sicyoides* L. a partir do primeiro subcultivo.

TABELA 3 - Efeito de concentrações de BAP no número de explantes com diferentes porcentagens de cobertura de calo.

Concentrações de BAP mg L ⁻¹	% Cobertura de Calo			
	25	50	75	100
2	2,50aA	1,33aA	1,33aA	0,66aA
4	4,16aA	0,83aB	1,66aB	0,16aB
6	3,33aA	0,33aB	0,16aB	1,00aB
12	2,16aA	0,33aB	0,16aB	0,16aB

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula da horizontal não diferem significativamente (Tukey 0,05).

Entre os tratamentos utilizados, observou-se que não houve diferença significativa para o número de explantes com diferentes porcentagens de cobertura com calo. Entretanto, a concentração de 6,0 mg L⁻¹ BAP, foi aquela com o maior número de explantes com 100% de cobertura de calo. No entanto, dentro de uma mesma concentração de BAP, verificou-se diferenças significativas, destacando-se as concentrações de 4,0 e 6,0 mg L⁻¹ de BAP, com maior número de explantes com 25% de cobertura de calo.

Cerqueira (1999) trabalhando na indução de calos em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens*), obteve o melhor resultado quando se adicionou ao meio MS 2,0 mg L⁻¹ de ANA + 2,0 mg L⁻¹ de BAP, resultando em 100% de área coberta com calos. A maioria dos tratamentos formaram calos friáveis, excetuando-se o tratamento com 12,0 mg L⁻¹ de BAP, que formou calos de consistência um pouco compacta. Notou-se também que à medida que foi aumentada a concentração de BAP, alguns calos mostraram início de necrose, sugerindo toxidez. Os calos formados no subcultivo de *C. sicyoides* L. apresentaram coloração variando entre amarelo e albino. Naseem & Jha (1994), trabalhando com *Cleome viscosa*, usando ANA e BAP na concentração 2mg L⁻¹, observaram calos de coloração verde-escura, nessa espécie medicinal.

- Segundo subcultivo de calos de *Cissus sicyoides* L.

A partir do segundo subcultivo todas as concentrações de BAP formaram calos friáveis (Figura 7), não diferindo significativamente entre si. Com relação à área coberta por calos (Figura 8), observou-se que quando se adicionou ao meio a concentração de $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, resultou em maior número de calos com 100% de área coberta, sendo diferente significativamente das demais concentrações (Tabela 4).

Segundo Santos (1998), elevadas concentrações de citocinina parecem interagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calos. A textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo, produz calos macios, friáveis e úmidos, em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto seco e com células pequenas (Gamborg, 1982) (George, 1996). Cordeiro et al., (2004), observaram baixa frequência de calos em *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá) no meio de cultura sem regulador vegetal, porém observaram que à medida que se aumentou a concentração do regulador BAP, ocorreu maior incidência de calos endógenos. Segundo estes autores, isto aconteceu, provavelmente, devido ao desbalanceamento nos níveis endógenos de fitormônios nos explantes.



FIGURA 7: Segundo subcultivo em calos de *Cissus sicyoides* L., a partir de segmento foliar aos quarenta dias de cultivo. A - Tratamento $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP. B – Tratamento $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. C – Tratamento $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. D - Tratamento $12,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, todos os tratamentos combinados com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA.

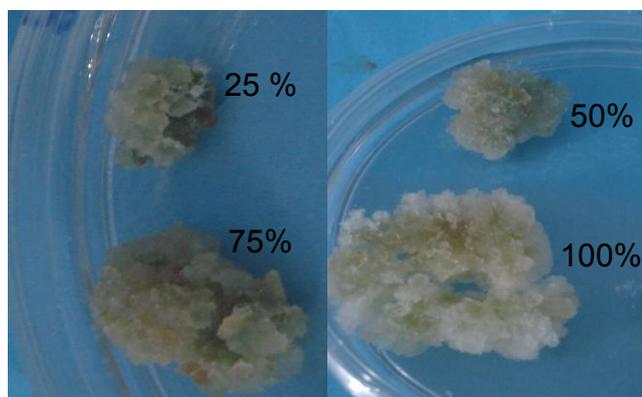


FIGURA 8 - Porcentagem de cobertura de calo friável em *Cissus sicyoides* L., a partir do segundo subcultivo.

TABELA 4 - Efeito de concentrações de BAP na porcentagem da área do explante coberta por calos segmentos foliares de *C. sicyoides*, L., após 40 dias do subcultivo *in vitro*.

Concentrações de BAP mg L ⁻¹	% Cobertura de Calo			
	25	50	75	100
2	0,20bB	1,80bAB	2,60bA	1,40bAB
4	0,40bB	1,60bAB	2,80bA	1,20bAB
6	0,20bB	0,80bB	0,80bB	4,20aA
12	0,80bB	1,80bB	2,60bB	0,80bB

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula da horizontal não diferem significativamente (Tukey 0,05).

O número de repetições formadas por tratamento variou ao longo dos subcultivos. Para análise estatística, considerou-se para cada subcultivo, o menor número de repetições formadas. No entanto, o número de repetições formadas por tratamento no decorrer dos subcultivos foi considerada uma variável, sendo analisada separadamente (Figura 9).

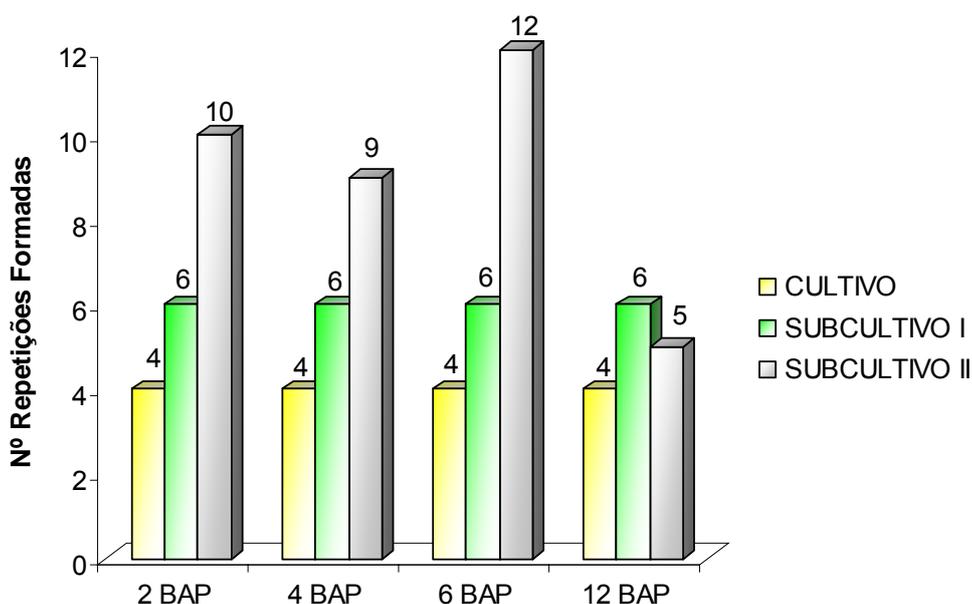


FIGURA 9 – Número de repetições formadas na calogênese de *Cissus sicyoides* L. *in vitro*.

Considerando o peso da matéria fresca dos calos, verificou-se que as concentrações de BAP utilizadas não diferiram entre si. Com relação ao peso da matéria seca, observou-se que na concentração de 6,0 mg L⁻¹ BAP foi obtido o maior peso de matéria seca de calos de *C. sisyoides* L., embora não diferindo significativamente das concentrações de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ BAP (Figura 10). Para Cerqueira et al., (2002) o melhor resultado para o peso da matéria fresca dos calos formados em segmentos foliares de *Tridax procumbens*, foi obtido com ANA na concentração de 2,0 mg L⁻¹ + 2,0 mg L⁻¹ de BAP e os maiores pesos de matéria seca foram obtidos com 1,0 mg L⁻¹ de AIB e também por 2,0 mg L⁻¹ de ANA e de AIB.

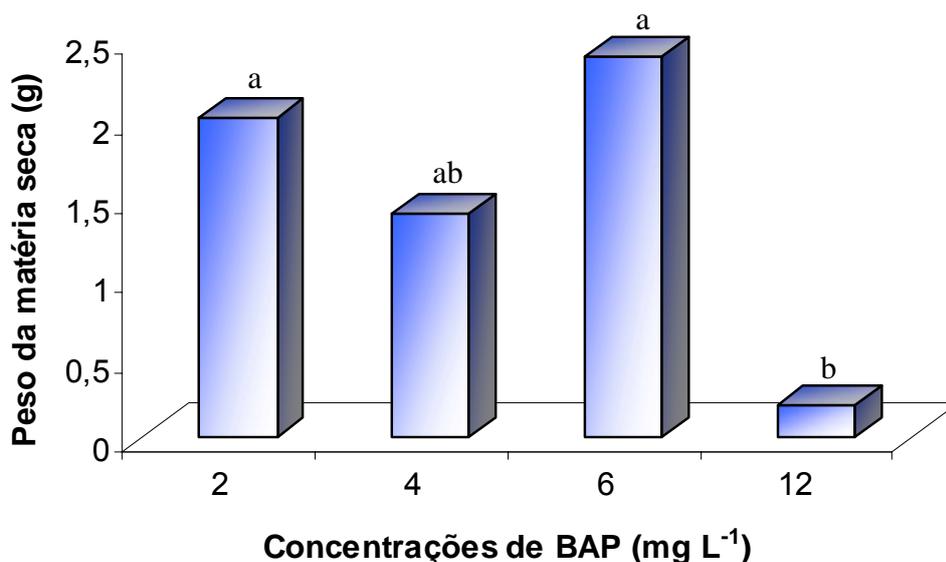


FIGURA 10 – Peso de matéria seca dos calos formados a partir de segmentos foliares de *Cissus sicyoides* L. em função de concentrações de BAP. Barras seguidas da mesma letra nas barras não diferem significativamente (Tukey 0,05).

- Testes Fitoquímicos

Dentre os constituintes analisados verificou-se apenas a presença de heterosídeos cardiotônicos em calos de *Cissus sicyoides* L., em todos os tratamentos utilizados, sendo posteriormente evidenciada a presença desses metabólitos, mediante a triagem fitoquímica.

Alguns esteróides presentes na natureza caracterizam-se pela grande especificidade pelo miocárdio e pela poderosa ação que exercem sobre este. Esses esteróides ocorrem como glicosídeos com açúcares ligados na posição 3 do núcleo esteroidal (Simões et al., 2004). Conforme estes autores, devido a ação sobre o miocárdio, chamam-se glicosídeos ou heterosídeos cardiotônicos. Segundo Bruneton (1993), as folhas das espécies do gênero *Digitalis* contêm numerosos compostos como flavonóides, antraquinonas, saponosídeos, digitanol-heterosídeos e heterosídeos cardiotônicos. Os principais heterosídeos encontrados em *Digitalis purpúrea* L. e *Digitalis lanata* Ehrh., são a digitoxina, digoxina, gitoxina e gitaloxina (Hollman, 1985; Gagnault e Bidet, 1988).

Alguns metabólitos já foram identificados em *Cissus sicyoides* L., tais como: Alcalóides e flavonóides (Moura, 1986; Albuquerque, 1989) além de saponinas, mucilagens, compostos fenólicos (Silva, 1995) e antocianinas (Toledo, 1983).

Moraes (2007), trabalhando com *Tournefortia paniculata*, uma planta utilizada na medicina popular como diurética e anti-inflamatória, na avaliação quantitativa e qualitativa de metabólitos secundários desta espécie, identificou a presença de heterosídeos cardiotônicos em folhas desta espécie, apenas nos meses de Novembro e Janeiro. O meio ambiente e época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos metabólitos vegetais, (Alves & Pavani, 1991).

É importante salientar a dificuldade para comparar o teor de um determinado metabólito produzido a partir de células e/ou tecidos *in vitro* com teores produzidos nos tecidos de plantas completas. Conforme Mantell (1994) e Pletsch (1998), a produtividade de metabólitos *in vitro* pode ser inferior ou superior quando comparada a plantas inteiras. Calos de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae) possuem potencial para a produção de vários metabólitos *in vitro*, inclusive compostos não observados na planta mãe, (Andre et al., 2003). É possível que a expressão diferencial de genes seja responsável por esta variação de respostas. Kusakari et al. (2000) complementaram que não foram encontradas saponinas em calos de *Bupleurum falcatum*, mas sim nas raízes adventícias formadas nos calos, o que sugere que a diferenciação celular foi necessária para a biossíntese desses compostos.

Os heterosídeos cardiotônicos são recomendados para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC), geralmente em associação a diuréticos, na profilaxia e tratamentos de algumas arritmias como fibrilação atrial, taquicardia atrial e ainda empregado no tratamento de choque cardiogênico, especialmente quando é acompanhado de edema pulmonar (Fuchs e Wannmacher, 1992; Johnson e Lalonde, 1992; Kelly e Smith, 1996).

Para a espécie em questão, faz-se necessário a realização de estudos mais aprofundados, visto que, até o presente momento não foram encontrados relatos na literatura sobre a presença de heterosídeos cardiotônicos em plantas de *Cissus sicyoides* L. Conclui-se que, para a calogênese de *Cissus sicyoides* L., a partir de segmento foliar faz-se necessário a adição de 6,0 mg L⁻¹ de BAP ao

meio de cultura e realizando-se dois subcultivos, após o cultivo *in vitro*. Identificou-se a presença de heterosídeos cardiotônicos em calos de *Cissus sicyoides* L.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. N.de. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. 1998. 113f.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

ALBUQUERQUE, J.M.D. **Plantas medicinais de uso popular.** Brasília: ABEAS, 1989. 96p. Programa de agricultura nos Trópicos, 6.

ALVES, P.L.de C.A.; PAVANI, M.C.M.D. **Instruções básicas para a coleta e preparo de material botânico a ser herborizado.** Jaboticabal: FUNEP, 1991.

ANDRADE, W. F. de; ALMEIDA M. de; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária**, v.41, n.12, p.1715-1719, dez. 2006.

ANDRE, A.C.G.M. et al. Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta in natura de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 22-24, 2003.

ARIKAT, N.A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 193-202, 2004.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calo e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.).** 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

BARBOSA, W.L.R. et al. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.13-15. 2002.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 258-285, 2006.

BARCELÓ-MUÑOZ, A. et al. Micropropagation of adult avocado. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 58, p.11-17, 1999.

BECKER, L. **Propagação vegetativa *in vivo* e *in vitro*, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. (Quebra-pedras)**. 1997. 96f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

BOTTA, B. et al. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p.354 – 379, 2001.

BONILLA, M.G.O. **Propagação *in vivo*, indução, curva de crescimento de calo e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM) Benth**. 2002. 162f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

BRUNETON, J. **Eléments de phytochimie et de pharmacognosie**. Paris: Lavoisier, 1993.

CERQUEIRA, E. S. et al. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.2, p.301-308, 2002.

CERQUEIRA, E.S. **Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal**. 1999. 81f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris sp*)**. 2000. 191f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **CERNE**, Lavras, v.10, n.1, p.118- 124, 2004.

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

COSTA, C. M. M. 1990. **Cipó-pucá (*Cissus sycioides*)**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1990. 109p. Apostila do curso de Especialização em Medicamentos.

ELIZABETSKY, E. 1988. Ação anticonvulsivante de *Cissus sycioides*, cipó-pucá. **Ciência e Cultura**, 40 (Suplemento): 985 (resumo).

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.845-51, 2006.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapia racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

GAIGNAULT, J. C.; BIDET, D. Hétérosides cardiotoniques. 35 siècles d'histoire. **Fitoterapia**, v.59, n. 4, p. 259-315, 1988.

GAMBORG, O. L. Callus and cell culture. In: WETTER, L.R.; CONSTABEL, F. **Culture methods**. Ottawa, Saskatoon, 1982. p. 1-9. .

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. Reino Unido: Exegetics Limited, Parte 2, 1361p. 1996.

HOLLMANN, A. Plants and cardiac glycosides. **BR. HEART J.**, v. 54, p.258-261, 1985.

JOHNSON, J. A.; LALONDE, R. L. Congestive heart failure. In: DIPIRO, J. T. et al. **Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach**. 2. ed. New York: Elsevier, p. 160-193, 1992.

KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. 1996. 96f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v.85, p.295-302, 1995.

KELLY, R. A.; SMITH, W. T. Tratamento farmacológico da insuficiência cardíaca. In: GILMAN, A. G. et al. (Ed.). **Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; Interamericana, cap. 34, p. 595-615.1996.

KUSAKARI, K.; YOKOYAMA, M.; INOMATA, S. Enhanced production of saikosaponins by root culture of *Bupleurum falcatum* L. using two-step control of sugar concentration. **Plant Cell Reports**, v. 19, p.1115-1120, 2000.

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 87f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, set./dez. 1994.

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

MORAES, L. D.; SOUSA, O. V. de. Avaliações Qualitativas e Quantitativas da Variação de Metabólitos Secundários em *Tournefortia paniculata* Cham (Boraginaceae). Nota Científica. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, 2, p. 1032-1034, jul. 2007. Suplemento.

MOURA, B.A.S. **Estudo químico e farmacológico de espécie vegetal *Cissus sycioides* L.** Belém: Universidade do Pará, 1986. 98p.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Grow factor requeriment of *Citrus* tissue culture. **INTERNATIONAL CITRUS SIMPOSIUM**, 1. 1969. Eilat, Israel. **Proceedings... Eilat, Israel: ISHS** 1969. v. 3, p. 1155-1669.

MURTHY, K.N.C. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cissus quadrangularis* L. **J. Med Food**, v. 6, p. 99-105, 2003.

NASEEM, M.; JHA, K. K. Differentiation and regeneration in *Cleome viscosa* leaves cultured in vitro. **Egyptian Journal of Botany**, Cairo, v.34, n.1, p.37-47, set. 1994.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

PAIVA-NETO, V. B. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de Moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. 1996. 39 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

PEPATO, M.T. et al.. Efeito da administração crônica de *Cissus sycioides* no metabolismo de carboidratos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS

MEDICINAIS, 1998, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia, SP: Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais, p.78,1998.

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

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

REMOTTI, P.C.; LÖFFLER, H.J.M. Callus induction and plant regeneration from gladiolos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.171-178, 1995.

SANTOS, B. R. **Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humbolditiana* Willd.)**. 2001. 89f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SANTOS, M.R.A. **Germinação, calogênese e caracterização e saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach**. 1998. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

SILVA, L. et al. Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* L. Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 361-367, 2007.

SILVA, G.A. **Caracterização e padronização farmacológica da droga e extrato fluído de *Cissus sycioides* L.** 1995. 98f. Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1995.

SHIRWAIKAR, A.; KHAN, S. S.; MALINI, S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 245-250, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto-Alegre – RS: Editora da UFRGS, 2004.

SOARES, G. de A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn.]**. 2003. 90f. . Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis na plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.) **Plant cell culture, a practical approach**. Oxford: IRL Press, p.79-105, 1985.

TOLEDO, M.C.F. Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sycioides*). **Journal Food Science**, v. 48, p.1368–1369, 1983.

VIEIRA, C.C.J.; BRAGA, M.R.; FIGUEREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p.233-8, 1995.

VIANA, V. R. C. et al. Produção de 4- NEROLIDILCATECOL em suspensões celulares de *Pothomorphe umbellata* L. MIQ. (Piperaceae). **Plant Méd**, v. 9, n.1, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de cultivo *in vitro* adotadas neste estudo contribuíram para a produção de microplantas de manjeriço com qualidade, assim como o estabelecimento de um protocolo de calogênese em insulina vegetal a partir de segmento foliar (tecido adulto).

Baseado nestas observações, verificou-se que a multiplicação de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), pode ser obtida via organogênese direta, utilizando segmentos internodais de plantas *in vitro* como explante, inoculados em meio MT + 2,0 mg L⁻¹ BAP, sendo após a obtenção de brotações induzida a fase do enraizamento em meio MT apenas com a utilização de 0,5 mg L⁻¹ de carvão ativado.

O protocolo de calogênese de insulina pode ser obtido utilizando segmento foliar (tecido adulto), como explante, inoculados em meio MT + 1,0 mg L⁻¹ de ANA para o estabelecimento, seguido do cultivo em meio MT + 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 6,0 mg L⁻¹ de BAP e posteriormente dois subcultivos no mesmo meio e concentrações de ANA e BAP, anteriormente citadas.

Os calos de insulina (*Cissus sicyoides* L.) cultivados *in vitro* forneceram subsídios para estudos fitoquímicos, sobretudo de metabólitos ainda não registrados na literatura nesta espécie, uma vez que foram identificados a presença de heterosídeos cardiotônicos nos mesmos.

Estudos posteriores deverão ser conduzidos no sentido de qualificar e também quantificar estes metabólitos, uma vez que são de grande importância econômica e farmacológica.