

NADJA RAYAD DA SILVA MOREIRA



**ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Uncaria*
guianensis (Aubl.) J. F. Gmel. EM CONDIÇÕES DE
CRESCIMENTO LENTO**

RIO BRANCO - AC

2017

NADJA RAYAD DA SILVA MOREIRA

**ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Uncaria*
guianensis (Aubl.) J. F. Gmel. EM CONDIÇÕES DE
CRESCIMENTO LENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Frederico Henrique da Silva Costa

RIO BRANCO - AC

2017

©MOREIRA, N. R. da S., 2017. MOREIRA, Nadja Rayad da Silva Moreira. **Estratégias para a conservação *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel. em condições de crescimento lento**. Rio Branco, 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Acre, 2017.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

M838e Moreira, Nadja Rayad da Silva, 1992-
Estratégias para a conservação *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel. em condições de crescimento lento / Nadja Rayad da Silva Moreira. – 2017.
68 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Área de Concentração em Produção Vegetal. Rio Branco, 2017.

Inclui referências bibliográficas, anexos e apêndices.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Henrique da Silva Costa.

1. *Uncaria guianensis* – Cultivo *in vitro*. 2. Unha de gato – Planta. 3. Óleo mineral. 4. Fitoterápico I. Título

CDD. 630

NADJA RAYAD DA SILVA MOREIRA

ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO IN VITRO DE *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F.
Gmel. EM CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO LENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADA em 28 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Frederico Henrique da Silva Costa (Orientador)
Universidade Federal do Acre



Dra. Almecina Balbino Ferreira (Membro)
Universidade Federal do Acre



Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira (Membro)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

*Aos meus pais,
Railton e Sebastiana, e minha irmã Sarah, pelo apoio e por
serem os maiores incentivadores para a conclusão desta
importante etapa da minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por estar sempre presente em minha vida, pela fé que me transmite, força e coragem, as quais me incentivaram a realizar este trabalho.

Aos meus pais, Railton, Sebastiana e a minha irmã Sarah, como também minha amiga Kezya pelo amor infinito e apoio nos momentos de necessidade.

Aos meus familiares pelo carinho e atenção a mim dedicados.

Ao Prof. Dr. Frederico Henrique da Silva Costa pela orientação.

A Universidade Federal do Acre, representada pelo Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pelos novos e valiosos conhecimentos compartilhados pelo corpo docente.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de Mestrado e auxílio financeiro dos projetos de pesquisa (CNPq Processo nº 408296/2013-5 e 405396/2013-9).

Às amigadas construídas no laboratório de Propagação e Conservação *in vitro*, em especial a Roger Ventura e Clarice Sales, como também aos bolsistas de graduação, Leticia Borges, Laryssa Rocha e Marcio Chaves, do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) que foram sempre receptivos a ajudar quando necessário, tenho um inestimável carinho por vocês.

Aos meus colegas de turma do ano de 2015, Hermesom Azevedo, Márcia Mendonça, Luiara Paiva, David Aquino, Jessica Larissa, Giodano Bruno, James Araújo e Janai Albuquerque que souberam pôr em prática seu espírito de companheirismo ao montar grupos de estudo em prol da difusão do conhecimento.

Aos demais que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

*A sabedoria oferece proteção, como o faz
o dinheiro, mas a vantagem do conhecimento é esta:*

A sabedoria preserva a vida de quem as possui.

Eclesiastes 7:12

RESUMO

A planta unha de gato (*Uncaria guianensis* Aubl. J.F. Gmel.) é utilizada para fins fitoterápicos, principalmente por povos Amazônicos e pela indústria farmacêutica na comercialização de produtos naturais à base de partes da planta e extratos, por seu efeito anti-inflamatório, inibidor de células cancerígenas e imune estimulante. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver uma metodologia de conservação *in vitro* de *Uncaria guianensis* em condições de crescimento controlado. Para tanto, três experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. No primeiro, foi avaliado o efeito de três formulações de meio de cultura associadas à imersão em óleo mineral sobre o crescimento controlado de microplantas, num total de 12 repetições. Ao final de 30 e 120 dias de cultivo *in vitro*, bem como aos 30 dias de aclimatização, foi avaliada a sobrevivência e características de crescimento. Para o experimento 2, segmentos caulinares com um par de gemas (microestacas) foram submetidos a duas temperaturas (25 °C e 15 °C) e três sistemas de cultivo (sem imersão, imersão em água e imersão em óleo mineral), com 15 repetições por tratamento. As avaliações de sobrevivência e crescimento foram realizadas aos 30 e 150 dias de cultivo *in vitro*. O terceiro experimento avaliou dois agentes osmóticos (sorbitol e manitol), em quatro concentrações (10, 20, 30 e 40 g.L⁻¹), e um tratamento adicional (testemunha), com 12 repetições e avaliações aos 90 a 150 dias de cultivo *in vitro*. Para os experimentos 2 e 3, o explante foi constituído por um segmento caulinar com um par de gemas. A formulação do meio de cultura e a imersão dos explantes em óleo mineral tiveram efeitos significativos sobre o crescimento *in vitro* de microplantas e segmentos caulinares de unha de gato. A utilização de meio MS associado a imersão das microplantas em óleo mineral é eficiente para retardar o crescimento *in vitro* de *Uncaria guianensis* durante 120 dias de cultivo. A temperatura de 15°C quando associada a imersão em óleo mineral controla o crescimento *in vitro* de microestacas durante 150 dias de cultivo. Concentrações superiores a 10 g.L⁻¹ de sorbitol restringem o crescimento *in vitro* de microestacas sem afetar o restabelecimento *in vitro* e *ex vitro* das plantas. O manitol causa toxicidade às microestacas de *Uncaria guianensis*.

Palavras-chave: *Uncaria guianensis*. Óleo mineral. Sorbitol. Manitol.

ABSTRACT

The cat's claw plant (*Uncaria guianensis* Aubl. JF Gmel.) is used for phytotherapeutic purposes, mainly Amazonian and pharmaceutical industry for the commercialization of natural products based on its plants and extracts, due to the fact that it has important therapeutic properties present in its secondary metabolites, and because its anti-inflammatory, cancer cell inhibitor and immune stimulant effects. The objective of this work was to develop a methodology for conservation *in vitro* of *Uncaria guianensis* in controlled growth conditions. In this context, three experiments were conducted in a completely randomized design. In the first, was evaluated three formulations of culture media associated with immersion with mineral oil in controlled growth of microplants, with 12 replicates. With 30 and 120 days of *in vitro* culture, and 30 days of acclimatization, was evaluated survival and growth characteristics. For experiment 2, micro-cuttings were submitted to two temperatures (25 °C and 15 °C) and to three cultivation systems (without immersion, immersion in water and immersion in mineral oil), with 15 replicates. The evaluations of survival and growth were carried with 30 and 150 days of *in vitro* culture. In the third, were used two osmotic agents (sorbitol and mannitol), with four concentrations (10, 20, 30 and 40 g L⁻¹) and sucrose as a control, with 12 replicates per treatment. Survival and growth were evaluated at 30 and 150 days of *in vitro* culture, as well plantlets acclimatized. The formulation of culture media and immersion with mineral oil affects *in vitro* growth of microplants and micro-cuttings of *Uncaria guianensis*. Microplants can be used for short-term conservation when cultivated with MS medium and immersion in mineral oil during the 120 days of cultivation. The temperature of 15°C when associated with mineral oil is efficient for the minimum *in vitro* growth of *Uncaria guianensis* micro-cuttings during the 150 days of cultivation. Concentrations higher than 10 g L⁻¹ of sorbitol restrict the *in vitro* growth of micro-cuttings without affecting the *in vitro* re-establishment and *ex-vitro* survival of the plants. Mannitol causes toxic effect on *Uncaria guianensis* micro-cuttings.

Keywords: *Uncaria guianensis*. Mineral oil. Sorbitol. Mannitol.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), número de nós (NN), altura da planta (AP) e número de raízes secundárias (NRS) de microplantas de *Uncaria guianensis* em função da formulação do meio de cultura, sistema de cultivo (SCV) com e sem imersão em óleo mineral avaliado aos 60 dias de cultivo *in vitro*, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 38
- TABELA 2 - Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), número de nós (NN) e número de raízes secundárias (NRS) de microplantas de *Uncaria guianensis* em função da formulação do meio de cultura, sistema de cultivo (SCV) com e sem imersão em óleo mineral avaliado aos 120 dias de cultivo *in vitro*, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 39
- TABELA 3 - Médias referentes à altura da planta (AP), de microplantas de *Uncaria guianensis* em função da formulação do meio de cultura, sistema de cultivo (SCV) com e sem imersão em óleo mineral avaliado aos 120 dias de cultivo *in vitro*, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 39
- TABELA 4 - Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP), número de nó (NN), diâmetro do caule (DC) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliados com 30 dias em processo de aclimatização, de microplantas de *Uncaria guianensis* em função da formulação do meio de cultura, sistema de cultivo (SCV) com e sem imersão em óleo mineral, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 41
- TABELA 5 - Médias referentes ao número de raízes secundárias, (NRS) aos 90 dias de cultivo, de microestacas de *Uncaria guianensis* em função de três sistemas de cultivo (sem imersão, com água e com óleo), duas temperaturas 25 °C ± 5 °C e 15°C) e dois acessos (Parque Ambiental Chico Mendes, Acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da UFAC experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 43
- TABELA 6 - Médias referentes a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão (SI), imersão em água (IA) e imersão em óleo (IO)) e os dois acessos (Acesso 1 – Parque Ambiental Chico Mendes (PAC), Acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (PZ/UFAC) das variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE), número de nós (NN) de microestacas aos 90 dias, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 44
- TABELA 7 - Médias referentes a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão (SI), com água (IA) e com óleo (IO)) e duas temperaturas (25 °C e 15°C) das variável altura da planta (TP), de microestacas aos 90

	dias de cultivo, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	45
TABELA 8 -	Médias referentes a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão (SI), com água (IA) e com óleo (IO)) e duas temperaturas (25 °C ± 5 °C e 15°C) das variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE), número de nós (NN), Altura da planta (TP), de microestacas aos 150 dias de cultivo, de microestacas, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	46
TABELA 9 -	Médias referentes a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão (SI), com água (IA) e com óleo (IO)) e os dois acessos (Acesso 1 – Parque Ambiental Chico Mendes (PAC), Acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (PZ/UFAC) das variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE) e número de nós (NN) de microestacas aos 150 dias de cultivo, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	46
TABELA 10 -	Médias referentes a interação de duas temperaturas (25 °C ± 5 °C e 15°C) e acessos (Acesso 1 – Parque Ambiental Chico Mendes (PAC), Acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (PZ/UFAC) da variável Altura da planta (AP), de microestacas aos 150 dias de cultivo, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	47
TABELA 11 -	Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) e número de nós (NN) aos 90 dias de cultivo, de microestacas de <i>Uncaria guianensis</i> em função de dois agentes osmóticos (sorbitol ou manitol), tendo a sacarose como controle, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	50
TABELA 12 -	Médias referentes ao número de raízes secundárias (NRS) aos 90 dias de cultivo, de microestacas de <i>Uncaria guianensis</i> em função de dois agentes osmóticos (sorbitol ou manitol) e quatro concentrações (10, 20, 30, 40 g. L ⁻¹), tendo a sacarose como testemunha, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	52
TABELA 13 -	Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) número de nós (NN) aos 150 dias de cultivo, de microestacas de <i>Uncaria guianensis</i> em função de dois agentes osmóticos (sorbitol ou manitol), tendo a sacarose como testemunha, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação da estrutura química dos açúcares álcoois sorbitol ou manitol.	25
FIGURA 2	Temperaturas máxima, média e mínima (°C) no período de setembro a dezembro de 2016, na Unidade Experimental, da Universidade Federal do Acre - UFAC, Rio Branco, Acre.	29
FIGURA 3	Umidade Relativa (UR%) máxima, média e mínima (°C) no período de agosto a novembro de 2015, na Unidade Experimental, da Universidade Federal do Acre - UFAC, Rio Branco, Acre.	30
FIGURA 4	Inflorescência (A); infrutescência (B) de <i>Uncaria guianensis</i>	30
FIGURA 5	Microplanta de <i>Uncaria guianensis</i> com 30 dias de cultivo antes do tratamento (A), momento da submersão em óleo (B).	33
FIGURA 6	Microestaca de <i>Uncaria guianensis</i> com 70 dias. (A) tamanho da microestaca e (B) microestaca em meio de cultura.	35
FIGURA 7	Microplantas submetidas aos tratamentos em meio QL sem imersão e com óleo (A), meio WPM sem imersão e com óleo (B), meio MS sem imersão e com óleo (C) aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> após a imersão. .	37
FIGURA 8	Porcentagem de sobrevivência 30 dias de aclimatização.	40
FIGURA 9	Plantas de <i>Uncaria guianensis</i> regeneradas do tratamento de conservação em óleo mineral sob condições de 30 dias de aclimatização. Tratamentos dispostos na estufa (A), meio QL sem imersão e imersas por óleo (B), meio WPM sem imersão e imersas por óleo (C), sem imersão e imersas por óleo (D).	41
FIGURA 10	Plantas Parque Ambiental Chico Mendes submetidas aos tratamentos sem imersão, com óleo mineral e submersas por água aos 90 e 150 dias sob temperatura de 15 °C. 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> (A), 150 dias de cultivo <i>in vitro</i> (B).	47
FIGURA 11	Plantas do Parque Ambiental Chico Mendes submetidas aos tratamentos sem imersão, com óleo mineral e submersas por água aos 30 e 150 dias sob temperatura de 25 °C. 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> (A) e 150 dias de cultivo <i>in vitro</i> (B).	48
FIGURA 12	Porcentagem de sobrevivência 30 dias de aclimatização.	49
FIGURA 13	Médias referentes a concentrações da variável altura da planta (AP) em 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob ação de agente osmótico sorbitol e quatro concentrações (10, 20, 30, 40 g. L ⁻¹) tendo a	

	sacarose como controle, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	51
FIGURA 14	Efeito das concentrações 10, 20 ,30 e 40 g. L ⁻¹ do agente osmótico sorbitol em <i>Uncaria guianensis</i> aos 150 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Sacarose a 3% (A), sorbitol a 1% (B), sorbitol a 2% (C) sorbitol a 3% (D), sorbitol a 4% (E).	53
FIGURA 15	Médias referentes a concentrações na variável número de pares de folhas expandidas (NPFE) em 150 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob ação de agente osmótico sorbitol e quatro concentrações (10, 20, 30, 40 g. L ⁻¹) tendo a sacarose como testemunha, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.	54
FIGURA 16	Efeito das concentrações 10, 20 ,30 e 40 g. L ⁻¹ do agente osmótico manitol em <i>Uncaria guianensis</i> aos 150 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Manitol a 1% (B), manitol a 2% (C), manitol a 3% (D), manitol a 4% (E).	55
FIGURA 17	Porcentagem de sobrevivência 30 dias de aclimatização.	56
FIGURA 18	Plantas de <i>Uncaria. guianensis</i> regeneradas do tratamento de conservação em sorbitol, manitol e sacarose (testemunha) sob condições de 30 dias de aclimatização. Sacarose (A), sorbitol a 1% (B), sorbitol a 4% (C), manitol a 1% (D), manitol a 4% (E).	56

LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE A Resumo da análise de variância do e feito do sistema de cultivo com óleo (CO) e sem imersão (SI) sob os meios de cultura MS, WPM e QL na conservação de microplantas de unha de gato, aos 60 dias de cultivo, tendo como variáveis o número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) números de nó (NN) e raízes secundárias (NRS), em esquema fatorial 3x2 no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 66
- APÊNDICE B Resumo da análise de variância do e feito do sistema de cultivo com óleo (CO) e sem imersão (SI) sob os meios de cultura MS, WPM e QL na conservação de microplantas de unha de gato, aos 120 dias de cultivo, tendo como variáveis o número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) números de nós (NN) e raízes secundárias (NRS), em esquema fatorial 3x2 no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 67
- APÊNDICE C Resumo da análise de variância do e feito do sistema de cultivo com óleo (CO) e sem imersão (SI) sob os meios de cultura MS, WPM e QL na conservação de microplantas de unha de gato, aos 30 dias de aclimatização, tendo como variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP), número de nó (NN), diâmetro do caule (DC) e comprimento da parte aérea (APA), em esquema fatorial 3x2 no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 67
- APÊNDICE D Resumo da análise de variância a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão, com água e com óleo) e duas temperaturas (25 °C e 15°C) da variável número de pares de folhas expandidas (NPFE), e números de nó (NN) altura da planta (TP) aos 90 dias de cultivo, de microestacas, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 68
- APÊNDICE E Resumo da análise de variância da interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão, com água e com óleo) e duas temperaturas (25 °C e 15°C) da variável número de pares de folhas expandidas (NPFE), e números de nó (NN) altura da planta (AP) aos 150 dias de cultivo, de microestacas, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 68
- APÊNDICE F Resumo da análise de variância do efeito de agentes osmóticos Manitol e Sorbitol sob a influência de concentrações de 10, 20, 30 e 40 g. L⁻¹, aos 90 dias de cultivo, tendo como variável o número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) e

números de nós (NN)), em esquema fatorial 2x4+Testemunha (sacarose) no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 69

APÊNDICE G Resumo da análise de variância do efeito de agentes osmóticos Manitol e Sorbitol sob a influência de concentrações de 10, 20, 30 e 40 g, L⁻¹, aos 150 dias de cultivo, tendo como variável o número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) e números de nós (NN), em esquema fatorial 2x4+Testemunha (sacarose) no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016. 69

LISTA DE SIGLAS

AP	Altura da planta
AGO	Agente Osmótico
CON	Concentrações
CPA	Comprimento da parte aérea
DC	Diâmetro do caule
WPM	LLOYD e McCOWN
IO	Imersão em óleo
IA	Imersão em água
MS	Murashige e Skoog
NPFE	Número de pares de folhas expandidas
NN	Número de nó
NRS	Número de raízes secundarias
PC	Parque Ambiental Chico Mendes
PZ	Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre
QL	Quoirin e Leproivre
SCV	Sistema de cultivo
SAC	Sacarose
SE	Sem imersão
TP	Tamanho da planta
TEST	Testemunha

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Composição dos tratamentos em função dos meios de cultura e os tipos e imersão em óleo mineral.....	32
QUADRO 2	Óleo mineral e ambiente de cultivo como estratégias de conservação <i>in vitro</i> de microestacas	34
QUADRO 3	Composição dos tratamentos utilizados para o crescimento mínimo das microestacas	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE PLANTAS MEDICINAIS	19
2.2 FAMÍLIA RUBIACEAE	20
2.3 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA de <i>Uncaria guianensis</i>	21
2.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS	23
2.5 AÇUCARES ÁLCOOLS	25
2.6 CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i>	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 EXPERIMENTO 1	31
3.2 EXPERIMENTO 2	33
3.3 EXPERIMENTO 3	34
4 RESULTADOS E DISCUSSAO	37
4.1 EXPERIMENTO 1	37
4.2 EXPERIMENTO 2	42
4.3 EXPERIMENTO 3	49
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	66

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelas plantas medicinais é relatado desde os tempos mais remotos quando o homem fazia uso de plantas da floresta para o tratamento e prevenção de doenças. Como consequência, vários estudos têm sido realizados para comprovar o potencial medicinal de algumas espécies vegetais de importância socioeconômica como exemplo temos a *Uncaria tomentosa* (FALKIEWICZ et al., 2001).

Assim, o desenvolvimento de pesquisas integrado com a indústria farmacêutica pode garantir tecnologias apropriadas ao cultivo de plantas medicinais e suprir as necessidades do mercado consumidor, gerando incentivos para a agricultura familiar no uso sustentável da biodiversidade nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Sendo abrangidas as propriedades terapêuticas, complexidade e diversidade estrutural de seus componentes, mecanismos de ação, assim como aspectos ecológicos e econômicos (HONÓRIO et al., 2016).

Dentre as espécies de interesse farmacológico a unha de gato (*Uncaria guianensis* Aubl. J.F. Gmel. - Rubiaceae) possui potencial socioeconômico, possibilitando desenvolver a cadeia produtiva da espécie na indústria farmacêutica através do desenvolvimento sustentável, amenizando o extrativismo ilegal e aumentando a produção, como também estratégias para sua conservação (PEREIRA, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; MING et al., 2012). Este vegetal é originário da floresta Amazônica e áreas tropicais das Américas do Sul e Central, e se caracteriza como arbusto rasteiro com importantes propriedades terapêuticas decorrente de seu efeito anti-inflamatório, inibidor de células cancerígenas e imuno-estimulante dentre outros (VILCHES, 1997).

Os principais responsáveis pelas propriedades medicinais desta espécie são os metabólitos secundários, classificados como alcalóides oxindólicos e compostos glicosídeos do ácido quinóico, responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios (AQUINO, 1991). Contudo, a utilização extrativista e exploração desenfreada podem interferir nas populações naturais da planta com consequente perda de diversidade genética e química.

A biotecnologia vegetal é importante, e muito utilizada como estratégia de domesticação e conservação, além de contribuir para o desenvolvimento de novos produtos. Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais tem sido amplamente aplicada à conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais com certificação genética e

fitossanitária, possibilitando também a propagação massal de plantas e produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico (MORAIS et al., 2012; PEREIRA, 2006). Além de apresentar como vantagens a facilidade de intercâmbio de germoplasma e manutenção da variedade de espécies em pequeno espaço físico. (GEORGE, 1996; ENGELMANN, 2011)

Assim para que se tenha o desenvolvimento e definição de protocolos relacionados a propagação e conservação *in vitro* se faz necessário estudos básicos sobre os métodos e a adequação das exigências nutricionais da espécie (GEORGE, 1996).

A conservação de vegetais pode ser feita em sistemas de crescimento mínimo (ou lento) que consiste em reduzir as reações metabólicas e conseqüente o crescimento e desenvolvimento do material *in vitro*. Para isso são realizadas modificações no tipo e/ou concentração de constituintes orgânicos e/ou inorgânicos do meio de cultura, adição de reguladores osmóticos como açúcares álcoois, imersão do explante em óleo mineral e redução da temperatura do ambiente de cultivo (RAZDAN; COCKING, 2000).

Apesar da importância deste vegetal, as pesquisas sobre métodos de cultivo *in vitro* de *U. guianensis* são escassas e não há estudos de conservação *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de crescimento mínimo *in vitro* de *Uncaria guianensis* para fins de conservação *ex situ*. Para tanto, foram avaliadas formulações de meios de cultura, redução da temperatura de cultivo e uso de agentes osmóticos sorbitol e manitol, associados ou não a imersão do material vegetal (microplantas e microestacas) em óleo mineral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Segundo Amorozo (2002) planta medicinal é toda espécie vegetal que possui valor curativo por determinada sociedade, podendo ser utilizada para fins específicos de cura, prevenção de disfunções e doenças do homem ou animais, sendo conhecidas desde os tempos mais remotos.

A *Uncaria guianensis* (Aubl) J. F. Gmel vulgarmente chamada de “unha de gato” é uma das espécies com reconhecida importância medicinal, sendo eficiente como estimulante imunológico rico em propriedades antioxidantes, antivirais, proporcionando a cura da artrite, reumatismo e diversas doenças inflamatórias além de ajudar na recuperação pós-parto e em irregularidades menstruais (HEITZMAN et al., 2005).

Pela importância socioeconômica destes tipos de plantas, a técnica de cultura de tecidos vegetais é uma alternativa para que se tenha a limpeza clonal, multiplicação e conservação de espécies, sendo uma das principais escolhas para atender a demanda comercial de plantas de interesse econômico. Através da propagação massal de vegetais superiores com certificação da boa qualidade fitossanitária e fisiológica, garantindo interesse da indústria de fármacos por apresentarem uniformidade na produção de metabólitos secundários utilizados na fabricação dos medicamentos (LIMA et al., 2007).

Na micropropagação geralmente são usadas sementes, ápices caulinares e segmentos nodais (microestacas) que podem ser importante estratégia para multiplicação de plantas e padronização de matéria-prima, além de possuir aplicação na conservação de espécies vegetais em sistemas de crescimento lento/mínimo para abastecer bancos de germoplasma (GEORGE, 1996; ENGELMANN, 2011).

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE PLANTAS MEDICINAIS

Segundo a Organização Mundial da Saúde, 80% da população faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais, e no Brasil pesquisas mostram que as plantas medicinais são utilizadas aproximadamente por 90% das pessoas. Estes tipos de vegetais possuem grande valor cultural, contudo nos últimos anos vem ganhando importância econômica mobilizando setores da sociedade agrônoma e farmacêutica a desenvolverem iniciativas de pesquisa em prol do fortalecimento da cadeia produtiva e do desenvolvimento sustentável (PEREIRA, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; MING et al., 2012).

Desta forma os vegetais desempenham importante papel como matéria prima para drogas avaliadas como agentes terapêuticos. Além de tudo são constituintes de uma importante fonte de renda para os coletores de plantas medicinais ao serem associados a sustentabilidade e comércio (ALVES et al., 2008).

A unha de gato (*Uncaria guianensis* Aubl J. F. Gmel) é um exemplo de planta medicinal que se tornou conhecida por causa de suas propriedades curativas, onde foram comprovadas, através de estudos fotoquímicos que na casca, raízes e folhas possuem alcalóides oxidólicos, compostos responsáveis por efeitos antitumorais, anti-inflamatório, antivirais, antiulcerosos, antiestimulantes e anti-Parkinson (POLLITO et al., 2000; ZHANG et al., 2015; VILCHES, 1997).

Neste contexto, a utilização desses tipos de plantas no cuidado com a saúde deixa de ter somente valores empíricos para ocupar interesses de instituições governamentais como a Organização Mundial da Saúde, Ministério da Saúde e pelo saber científico, permitindo assim o conhecimento sobre as espécies farmacológicas e a comprovação dos seus efeitos fitoterápicos e seu emprego no sistema público de saúde (SILVA, 2002; CEOLIN, 2011).

Além de atrair interesses de empresas multinacionais com intuito do aquecimento da indústria farmacêutica, aumentado o comércio internacional na medicina vegetal e atraindo a maioria das companhias farmacêuticas, como exemplos temos as espécies de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*, onde são envolvidas em treze patentes de fármacos no Escritório de Marcas e Patentes dos Estados Unidos e no Brasil participam das listas de plantas com grande importância medicinal no âmbito nacional (BRASIL, 2013; USPTO, 2015;). Portanto, deixaram de ter só apreciação por comunidades isoladas para abranger o mercado industrial (PACHÚ, 2009).

2.2 FAMÍLIA RUBIACEAE

A família Rubiaceae é uma das maiores no grupo das eudicotiledôneas com aproximadamente treze mil espécies e seiscentos e cinquenta gêneros. Ocorre no Cerrado, Floresta Amazônica e Mata Atlântica, Brejos de Altitude na América Central e ao sul dos Estados Unidos (MENDONÇA et al., 2013, DELPRETE; PERSSON, 2004).

No Brasil existem cento e trinta gêneros e mil e quinhentas espécies, sendo uma das principais famílias da flora brasileira como um importante elemento em quase todas as formações naturais (SOUZA; LORENZI, 2005).

Em geral, são espécies de reconhecido valor medicinal e alimentício, a exemplo de *Coffea arabica* L. (café) utilizado como alimento e de *Cinchona officinalis* L. de onde se extrai diversos alcalóides, como a quinina, antipirético utilizado no tratamento contra a malária. Também apresentam inflorescências cimosas ou racemosas e congestas, tendo flores bissexuais pelo menos em sua maioria e estames aderidos às pétalas sendo, portanto, epipétalos, onde o gineceu pode ter de dois a cinco lóculos (MENDONZA et al., 2004).

Entre os espécimes é comum a ocorrência de heterostilia e poliploidia nas flores onde possuem ovário ínfero com muitos óvulos por lóculos. Características morfológicas de folhas simples de nervura peninérvea, opostas ou verticiladas, em suas folhagens ocorrem a presença de ráfides e seus caules indumentos de septos, porém o que se destaca nessa família são as estípulas interpeciolares (MENDONÇA; ANJOS, 2006; MARGALHO et al., 2009).

2.3 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA de *Uncaria guianensis*

As plantas de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa* ocorrem em diversas áreas da Amazônia brasileira, como também em países da América Central (Guatemala, Belize, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Costa Rica, Panamá) e em terras sul-americanas (Colômbia, Venezuela, Guiana, Equador, Peru e Bolívia) onde são apontados como seu centro de origem e, portanto, possuindo grande diversidade genética e variabilidade química (VILLACHICA et al., 1998 ZEVALLOS-POLLITO et al., 2000; RIDSDALE, 1978; Zavala & ZEVALLOS-POLLITO, 1996).

Estas espécies são conhecidas popularmente como unha de gato, sendo utilizadas principalmente por povos amazônicos em tratamentos terapêuticos, sendo geralmente usada a casca, raízes e folhas para fabricação de extratos, onde são localizados metabólitos secundários que possuem alcalóides oxidólicos, compostos responsáveis por efeitos antitumorais, anti-inflamatório, antivirais, antiulcerosos, antiestimulantes e anti-Parkinson (POLLITO et al., 2000; ZHANG et al., 2015; VILCHES, 1997). Além de serem compostos também por heterossídeos triterpênicos (derivado do ácido quinóico) e polifenóis (PAVEI et al. 2012; SHANG et al., 2005).

Dentro do gênero *Uncaria* as mais conhecidas são a *U. tomentosa* e a *U. guianensis* onde podem ser observadas diferenças fitoquímica entre as espécies

segundo experimentos desenvolvidos por Valente et al. (2009) ao constatar que a *U. guianensis* possui altos teores de canferitrina nas folhas, do que nos galhos, portanto, foi proposto que este flavonóide glicosilado presente nestes locais é um marcador químico em potencial para se distinguir uma da outra.

Além de características morfológicas, reprodutivas e ecológicas, onde a *U. tomentosa* é um cipó trepador, com espinhos semicurvos, de florestas primárias com solos bem drenados, e período de florescimento de setembro a novembro, frutificação de outubro a dezembro. Já a espécie *U. guianensis* é rasteira e possui espinhos em forma de chifres de carneiro, típicas de florestas secundárias, solos úmidos com florescer de fevereiro a junho e frutificando de abril a agosto (FLORES, 1995; QUEVEDO, 1995; MIRANDA et al., 2001).

Segundo Zevallos-Pollito e Tomazello Filho (2010) a *U. guianensis* trata-se de um arbusto rasteiro de cerca de vinte metros de comprimento e 10 cm de diâmetro, com as seguintes características: caule de formato cilíndrico e casca externa marrom com fissuras, possuindo a parte interna de cor vermelho-amarelada e secreção aquosa e adstringente, contendo ramos terminais de cor avermelhada, onde possuem folhas com forma lanceoladas simples, opostas, dísticas e elípticas de consistência membranácea, ápice agudo ou ligeiramente acuminado com base aguda ou arredondada, face adaxial verde, face abaxial verde-avermelhada e pecíolo glabro.

Além de possuírem estípulas interpeciolares, espinhos em pares opostos, fortemente recurvados e lenhosos, com inflorescências terminais ou axilares, compostas de capítulos com formato esféricos e cerca de oito a vinte e dois centímetros tendo pedúnculo cilíndrico. As plantas são caracterizadas com flores andróginas, pediceladas, actinomorfas, hipanto infundibuliforme e cálice tubular com 5 lóbulos triangulares (ZEVALLOS-POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2010).

Seu fruto compreende cápsulas septicida, elipsóide, com cálice persistente onde são armazenadas sementes fusiformes envolvidas por uma espécie de asa membranácea sendo uma extremidade linear e a outra em duas linhas (ZEVALLOS-POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2010).

Em suma a aplicação da identificação taxonômica, constituiu valiosa informação complementar aos elementos reprodutivos, morfológicos e fisiológicos da planta servindo como base para trabalhos a serem desenvolvidos em prol da domesticação e conservação da espécie.

2.4 CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

A diversidade vegetal contribuiu para que a utilização das plantas medicinais seja considerada área estratégica de grande potencial farmacológico com intuito de substituir medicamentos tradicionais e amenizar efeitos colaterais provenientes de produtos não fitoterápicos (BATALHA et al., 2003).

Porém, existem fatores que interferem no uso das plantas medicinais para fins farmacêuticos, devido a variabilidades genética e bioquímica dos vegetais, como também dificuldades de multiplicação (PEREIRA, 2006). Segundo Siqueira et al (2014) torna-se fundamental a domesticação e padronização das espécies de plantas medicinais para em seguida serem usados como fitoterápicos.

O cultivo *in vitro* de plantas, também conhecido como cultura de tecidos vegetais, constitui um conjunto de técnicas aplicadas em condições controladas para propagação massal e conservação de plantas geneticamente superiores, como também para a distribuição do germoplasma vegetal (FERREIRA et al., 1998). O sucesso das técnicas *in vitro* está diretamente associado ao tipo de explante utilizado, sendo a planta-matriz o principal responsável pelas respostas morfogênicas *in vitro* pois o vegetal deve ser isento de doenças, com características de interesse agrônomo e genético (STEIN et al., 2009).

Assim, a planta matriz é responsável pela obtenção de mudas com qualidade genética e fitossanitária em menor tempo, comparados a métodos tradicionais de propagação, tudo sendo a princípio sob condições laboratoriais que envolve etapas de seleção do material, estabelecimento, multiplicação, alongamento e enraizamento para posteriormente serem submetidas a aclimatização em casa de vegetação (TORREJÓN, 1997; PASQUAL et al., 2001).

A fase inicial da cultura de tecidos é caracterizada pela escolha das plantas matrizes, destinadas ao fornecimento dos explantes primários para o cultivo *in vitro*. Nesta etapa devem ser selecionados os melhores explantes daqueles obtidos a partir de plantas saudáveis, vigorosas, isentas de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento vegetativo (WILLADINO; CAMARA, 2005).

Segundo Torres et al. (1998), outros fatores como processos de coleta, desinfestação, isolamento e cultivo dos explantes em meio de cultura sob condições assépticas são de extrema importância para êxito no uso dessa tecnologia.

Posteriormente temos a composição dos meios nutritivos utilizados, que tem a finalidade de disponibilizar as substâncias necessárias ao crescimento e desenvolvimento

do vegetal *in vitro*, baseando-se nas exigências das plantas quanto a nutrição, que fornece não só macro (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio, cobalto, níquel e zinco.), mas também carboidratos (normalmente a sacarose) para substituir o carbono que a planta fixa na atmosfera pela fotossíntese. (PASQUAL *et al.*, 2001; CID, 2001), além de normalmente incluir-se certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. (SILVA, 2010).

Estes componentes orgânicos por sua vez, deve ter concentrações determinadas e ajustadas, de acordo com o tipo de explante e as condições de cultivo, afinal plantas crescidas *in vitro* possuem pouca habilidade fotossintética, assim requerendo fontes de energia metabólica para o crescimento vegetal (SANTOS, 2007; MOSALEEYANON *et al.*, 2004).

Por seguinte temos a etapa da micropropagação que é caracterizada pela multiplicação de propágulos, através de sucessivos subcultivos em meio nutritivo próprio de multiplicação, levando em conta a qualidade e a homogeneidade do material vegetal produzido. Adicionalmente ao meio de cultura, se tem usado reguladores de crescimento, a fim de induzir os processos de dediferenciação e rediferenciação celular, culminando na formação de tecidos e órgãos (BOMFIM, 2006).

Para Galvanese *et al.* (2007), as auxinas e citocininas norteiam os principais eventos celulares e quando usadas em concentrações ideais no meio nutritivo, determinam o crescimento e o padrão de desenvolvimento de culturas *in vitro*, onde as citocininas desempenham amplo papel nos tecidos vegetais na diferenciação e regeneração de brotos e as auxinas são responsáveis pela divisão celular (NASCIMENTO, 2007; BIELACH, A. *et al.*, 2012).

Segundo Bomfim (2006) o alongamento e enraizamento é uma fase que objetiva a promoção de alongar as brotações e a formação de raízes adventícias que em alguns casos precisa - se da adição de fitorreguladores, para permitir o posterior transplante ao meio externo.

Já na aclimatização as plantas obtidas *in vitro* são submetidas a outras condições ambientais e de substrato, visando à adaptação gradativa destas (MOREIRA, 2001). Assim pode-se dizer que essa fase da cultura de tecidos em alguns casos é o fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Como exemplos de pesquisas desenvolvidos na cultura de tecidos temos a micropropagação de plantas medicinais, que utiliza a Indução de calos em segmentos

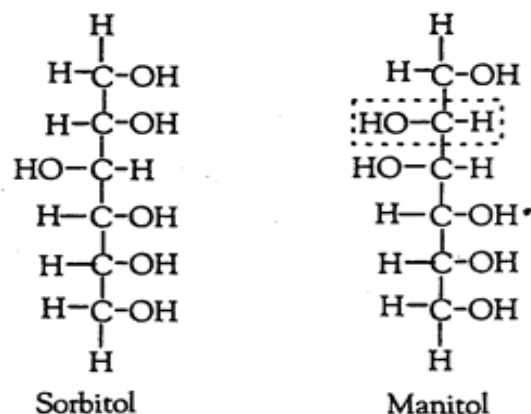
foliares de *Croton urucurana* Baill, Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (unha de gato) e no Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (LIMA et al., 2008, PEREIRA et al., 2006; PAIVA; ALOUFA, 2009) além de também ser utilizados segmentos nodais, sementes, ápices caulinares e embriões, todos com potencialidades para a regeneração *in vitro*, desde que as exigências nutricionais e ambientais sejam satisfatórias (PIZA; PINHO, 2002).

2.5 AÇUCARES ÁLCOOIS

Amplamente distribuídos no reino vegetal e animal, os polióis encontram-se presentes na natureza em algumas espécies de vegetais, frutas e algas sob concentrações pequenas. Já sua produção industrial é pela conversão do grupo carbonílico (aldeído e cetona) dos açúcares em álcool, por hidrogenação catalítica de glucose ou sacarose, sendo por isso também conhecidos como álcoois ou açúcares de álcoois, onde suas principais aplicações são em alimentos como confeitos isentos de açúcares, balas, gomas de mascar e chocolates, como também inibidores de crescimento de algumas espécies de plantas (FLORES et al., 2013; QUEIROZ, 2014).

Os álcoois são substâncias que possuem o grupo hidroxila (OH) ligado a um átomo de carbono saturado, ou seja, realiza apenas ligações simples com outros átomos de carbono ou hidrogênio, como o exemplo da figura 1.

FIGURA 1 – Representação da estrutura química dos açúcares álcoois sorbitol e manitol



Os principais açúcares álcoois, conhecidos diferenciam-se de outros sacarídeos devido à redução das funções cetona ou aldeído. Onde podem ser denominados como

classe especial de carboidratos, podendo ser monossacarídicos (sorbitol, manitol, xilitol, eritritol), dissacarídicos (maltitol, lactitol, isomalte) e mistura de sacarídeos com polissacarídeos hidrogenados (xarope de glucose hidrogenado), porém será dado ênfase apenas ao sorbitol e manitol (BARREIROS, 2012).

Estes polióis são diferenciados da sacarose por serem mais estáveis na presença de ácido, base e calor. Onde o mesmo se decompõe sob temperatura acima de 150°C, já estes açucars álcoois podem ser aquecidos à temperatura de 165°C a 200°C, como também caracterizam – se por ter menor teor de doçura, não ser cristalizante, valor calórico baixo e excelentes agentes umectante (BARREIROS, 2012).

Geralmente são encontradas em famílias ou gêneros particulares em pequenas quantidades, sendo um ou outro. Por exemplo, o sorbitol é encontrado na Rosaceae, maçã (*Malus domestica*), algumas espécies de pessegueiros (*Prunus persica*), cerejeira e ameixeira onde constitui um importante carboidrato de translocação pelo floema, funcionando como osmoprotetor, afinal o grupos das hidroxilas nestes vegetais agem semelhantes a água formando uma esfera artificial de hidratação em torno de macromoléculas, quando estes são submetidos a condições osmóticas baixas (LOESCHER et al., 1982).

Ao que se refere ao seu metabolismo, os polióis em plantas superiores estão apenas começando a ser entendidos. Redgwell e Bielecki (1978), mostraram claramente que a síntese de sorbitol acontecia em folhas de damasco acompanhados pelo aparecimento de hexose e fosfatos de poliol. Em trabalhos posteriores revelou - se a existência de uma aldose 6-fosfato redutase em loquat, frutas e tecidos foliares (HIRAI, 1981) e em folhas maduras de maçã, pêsego, pêra e apriete (NEGM E LOESCHER 1982), onde está enzima catalisa a reação: Glicose 6-fosfato + NADPH + 6-fosfato + NADP⁺ (LOESCHER, 1987).

Segundo relatos em trabalhos científicos desenvolvidos o manitol pode ser encontrado em cenoura (PLOUVIER 1963) e pinheiro radiata (CRANSWICK; ZABKIEWICZ (1979), ocorrendo predominantemente na raiz. Já seu metabolismo possivelmente age como soluto compatível prevenindo perda de água ou balanceando o acúmulo de sal. Onde geralmente sua síntese é realizada através da isomerização da frutose-6-fosfato pela ação da enzima fosfomanose isomerase, sendo convertida em manose-6-fosfato redutase dependente de NADPH, que apresentam fórmulas moleculares idênticas, mas que diferem estruturalmente, e em seguida transformadas em manitol-1-fosfato, onde o manitol é formado por desfosforilação (LOESCHER, 1987).

Apesar da importância destes polióis serem esquecidas por muito tempo, hodiernamente o uso dos açúcares álcools sorbitol e manitol vem ganhando destaque na cultura de tecidos vegetais, como agente osmótico inserido no meio de cultura, baseiando-se no pressuposto de que não são metabolizados pelas células vegetais, onde reduzem o potencial hídrico e interfere na absorção e assimilação de nutrientes e água pelo explante causando estresse osmótico a planta (KOVALCHUK et al., 2008; LEDO et al., 2007).

Afinal não é metabolizado pela maioria dos vegetais de modo natural, por causa da incapacidade de biossíntese de açúcares álcoois, tendo relação com a modificação do potencial osmótico do meio, fazendo com que a planta absorva menos água e diminua seus excessos intracelulares por gradiente osmótico nos tecidos vegetais, além de restringir nutrientes fazendo que o processo de crescimento seja retardado dependendo das concentrações a que cada espécie será submetida (SHIBLI et al., 2006; SHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010).

Grandes exemplos são vistos em trabalhos desenvolvidos por Lemos et al. (2002) e Sá et al. (2011) em culturas de *Saccharum officinarum*, e *Hancornia speciosa*, respectivamente, como também por Flores et al. (2013) em *Pfaffia tuberosa* conservada *in vitro*, sob condições de crescimento mínimo, durante 120 dias.

2.6 CONSERVAÇÃO *IN VITRO*

Segundo Camillo et al. (2009) a busca da indústria farmacêutica por produtos de origem vegetal com propriedades medicinais aumenta a demanda de consumo da espécie, favorece o extrativismo predatório e transporte ilegal, podendo provocar a redução da variabilidade genética e extinção da espécie e dos ecossistemas envolvidos.

As técnicas de cultivo *in vitro* pode minimizar ou mesmo resolver problemas inerentes a multiplicação de plantas que apresentam heterogeneidade nas sementes e na maturação dos frutos, bem como produzir mudas em larga escala e possibilitar a conservação da espécie em bancos de germoplasma (PINHAL et al., 2011).

A variabilidade genética vegetal pode ser submetida a métodos de conservação para continuidade de programas de melhoramento genético e desenvolvimento de genótipos com elevada importância comercial. Nesse contexto, existem várias estratégias biotecnológicas baseadas na cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais (PANIS; LOMBARDI, 2006; LOMBARDI; ZEVALLOS, 1999).

O crescimento lento ou mínimo é o principal método de preservação *in vitro* de recursos genéticos vegetais a curto e médio prazo, tendo por objetivo estender ao máximo o tempo entre subcultivos, sem interferir de forma negativa na qualidade genética do material preservado (ROCA et al., 1991). Em geral, são realizadas modificações na composição orgânica do meio de cultura, associadas ou não redução da temperatura de cultivo, alíquotas de óleo mineral e/ou uso de reguladores osmóticos (SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010).

Quando combinada a redução da temperatura de cultivo, as alíquotas de óleo mineral e/ou agentes osmóticos podem potencializar o crescimento mínimo do material *in vitro*, o que é justificado pela redução das atividades metabólicas, garantindo viabilidade fisiológica de maior tempo possível (SANTOS et al., 2011). Esse método tem sido aplicado com sucesso para conservação *in vitro* de espécies medicinais de importância econômica como o algodão do Cerrado (*Cochlospermum regium*) (CAMILLO et al., 2009), e mangabeira da região nordeste do Brasil (SÁ et al., 2011).

A utilização da alíquota de óleo mineral sobre os explantes apresenta bons resultados, especialmente em espécies de clima tropical, por reduzir a concentração de oxigênio disponível, tendo como vantagens o baixo custo e que não necessita de equipamento sofisticado (MONNONEN et al.1990; ENGELMANN, 1997).

Resultados obtidos por Sharma et al. (2012) ao desenvolver um protocolo de crescimento lento para conservação a médio prazo com imersão em óleo mineral utilizou segmentos nodais de *Bacopa monnieri* que ficaram submersas por seis a vinte quatro meses onde as plantas obtiveram alto índice de regeneração.

Já os agentes osmóticos como o manitol e o sorbitol possuem redução em seu potencial hídrico, causando estresse osmótico ao material vegetal após a interferência no seu processo de captação dos nutrientes e absorção da água (KOVALCHUK et al., 2008; LEDO et al., 2007). Tudo isso decorrente da insuficiência de alguns vegetais em metabolizar esses açúcares, fazendo com que a ação do potencial osmótico do meio seja mudado, pois estes solutos são mais densos, e por processo de osmose a planta acaba perdendo água e nutrientes para o meio externo. (SHIBLI et al., 2006).

Embora as investigações sobre as técnicas de conservação têm sido feitas para espécies de plantas, até agora não há relato de metodologias para a conservação *in vitro* de *Uncaria guianensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos sendo usado distintos sistemas de crescimento lento mínimo, sendo eles: Meios de cultura e imersão em óleo mineral no crescimento de microplantas, Óleo mineral e ambiente de cultivo como estratégias de crescimento mínimo de microestacas e o último intitulado Agente osmótico na preservação *in vitro* de microestacas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Propagação e Conservação *in vitro* de Plantas da Universidade Federal do Acre (UFAC) e sua aclimatização feita na estufa da Unidade Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza ambas, localizadas na BR 364, Distrito Industrial, Km 4, latitude 9° 57' 28,65" Sul, longitude 67° 52' 0.84" Oeste, altitude de 167 m, no município de Rio Branco, Acre e estabelecidos no período entre janeiro a dezembro de 2016, desde o crescimento *in vitro* à aclimatização, onde também foi realizado registros por Datalogger HT-500™ das variações climáticas relacionados a temperatura (máxima 30°C com mínima de 23°C) e sua umidade relativa (50 a 80%), apresentadas nas figuras 2 e 3.

FIGURA 2 – Temperaturas máxima, média e mínima (°C) no período de setembro a dezembro de 2016, na Unidade Experimental, da Universidade Federal do Acre - UFAC, Rio Branco, Acre.

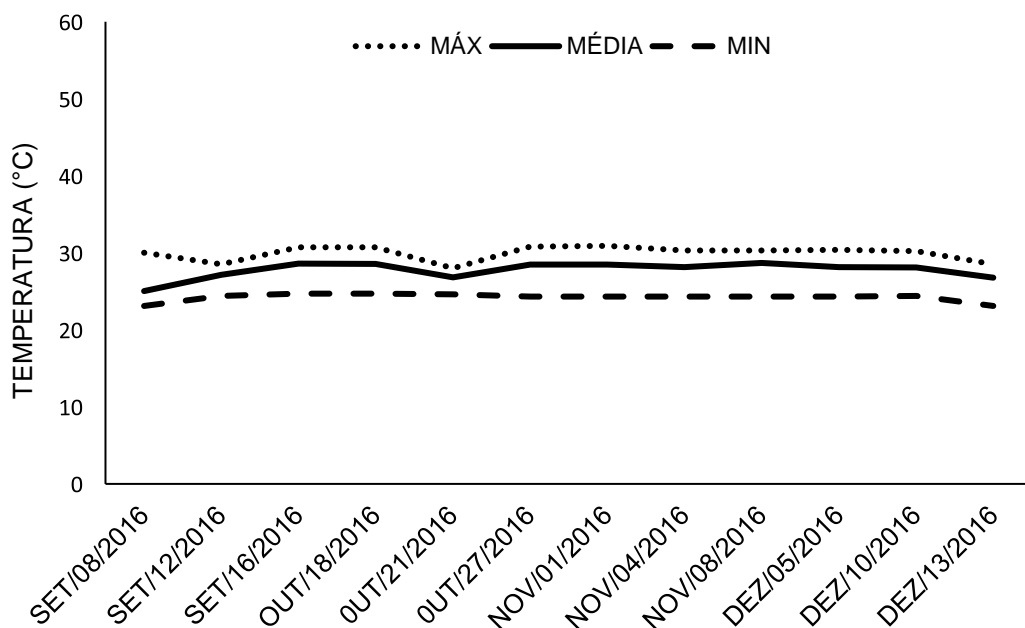
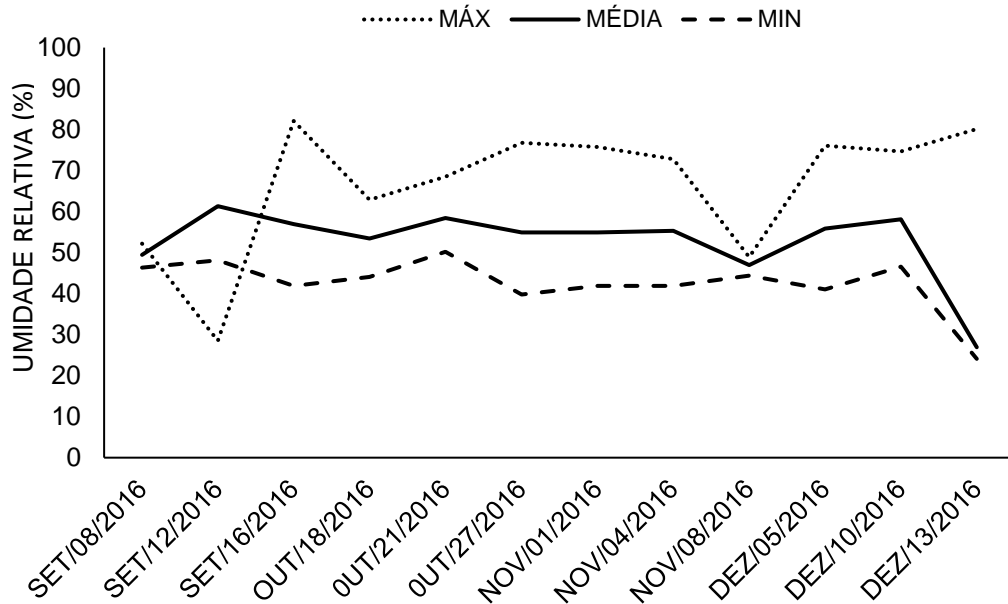


FIGURA 3 - Umidade Relativa (UR%) máxima, média e mínima (°C) no período de setembro a dezembro de 2016, na Unidade Experimental, da Universidade Federal do Acre - UFAC, Rio Branco, Acre.



Já o material vegetal coletado foi retirado de infrutescências deiscêntes (FIGURA 4 - B), cuja as plantas matrizes localizavam-se no Parque Ambiental Chico Mendes e no Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre no município de Rio Branco, Acre. Posteriormente o material vegetal foi acondicionado em sacos de polipropileno transparente com posterior retirada das sementes.

FIGURA 4 - Inflorescência (A); infrutescência deiscênte (B) de *Uncaria guianensis*.



Para semeadura *in vitro*, as sementes foram submetidas a tríplice lavagem com detergente neutro e água da torneira, por dez minutos com o uso de uma peneira de tela fina e pinça, para a devida retirada de impurezas, em seguida sob condições de fluxo laminar horizontal, tratadas com solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo) durante 15 minutos, e por fim submetidas ao enxague por quatro vezes em água autoclavada, seguindo o protocolo de desinfestação proposto por Raposo *et al.* (2011).

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) para todos os experimentos sendo que os dados foram submetidos aos pressupostos da análise de variância, consistindo na verificação de dados discrepantes pelo teste de Grubbs (1969), normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro e Wilk (1965) e da homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett (1937).

Como também aplicados o teste de comparação de médias Tukey (1949) para fator qualitativo (meio de cultura, temperatura de cultivo) quando houve efeito significativo.

Já para os resultados referente os dados quantitativos, quando o teste F indicou existir significância a 5% de probabilidade para a regressão, definiu-se a equação de linear de associação negativa.

Quando se verificou efeito significativo do tratamento adicional este foi comparado aos demais pelo teste de Dunnett (1955). Já dados que não atenderam os pressupostos da análise de variância os mesmos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (1952).

3.1 EXPERIMENTO 1 – MEIOS DE CULTURA E IMERSÃO EM ÓLEO MINERAL NO CRESCIMENTO DE MICROPLANTAS

Os tratamentos foram em esquema fatorial 3 x 2 (três meios de cultura x sem imersão e com imersão em óleo mineral) (QUADRO 1), com 12 repetições totalizando 72 microplantas (FIGURA 5). A unidade experimental foi consistida de um tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo um explante com 10 mL de meio de cultura.

Para obtenção das microplantas, as sementes do Parque Chico Mendes foram semeadas nos meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) e QL (QUOIRIN; LEPROIVRE, 1977), adicionados de sacarose (3%), pH 5,8 e solidificados com Phytigel™ (2,2 g. L⁻¹). E os meios autoclavados a 121 °C em 1,0 atm. de pressão por 20 minutos. Sendo o processo de semeadura feitos em câmara de fluxo laminar horizontal.

QUADRO 1 - Composição dos tratamentos em função dos meios de cultura e os tipos e imersão em óleo mineral.

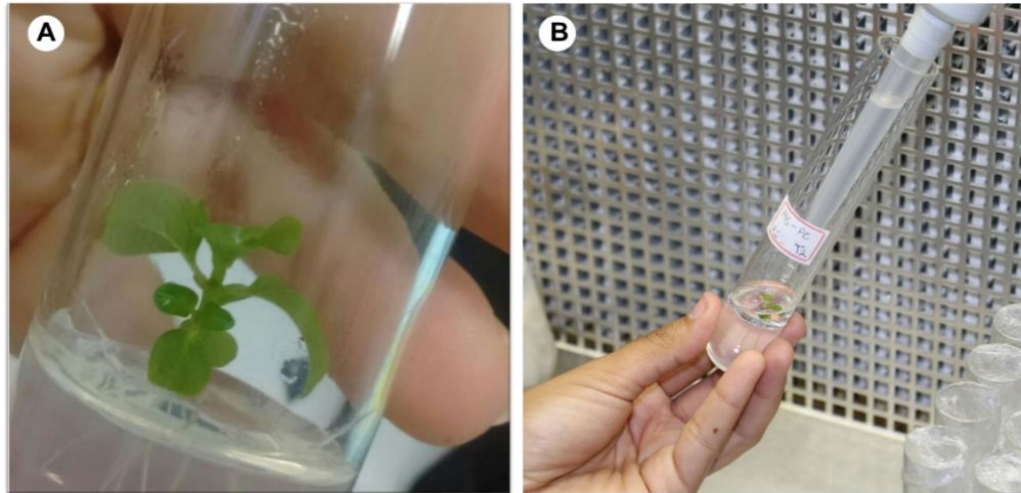
Tratamentos	Meios de cultura	Tipo de imersão
T1	MS	Sem imersão
T2	MS	Óleo Mineral
T3	WPM	Sem imersão
T4	WPM	Óleo Mineral
T5	QL	Sem imersão
T6	QL	Óleo Mineral

Posteriormente o material vegetal permaneceu em sala de temperatura controlada com cerca de 25 ± 5 °C e 16 horas de fotoperíodo, fornecido por lâmpadas fluorescentes tubulares.

Aos 30 dias de semeadura *in vitro* as microplantas em seus distintos meios de cultura foram submersas com alíquotas de 10 mL de óleo mineral que foi autoclavado por 40 minutos em um recipiente com tampa e levado a estufa, onde permaneceu sob temperatura de 50 a 70 °C por 6 horas com a tampa folgada para a retirada da condensação, sendo depois o frasco apertado e vedado com papel filme ao redor e submetidos a temperatura ambiente antes do uso. Para devida distribuição nos tratamentos foi usada uma micropipeta automática e ponteiros autoclavados, sendo o processo desenvolvido em câmara de fluxo laminar.

Em seguida, o material vegetal conduzido novamente a sala de cultivo *in vitro*, submetidas a temperatura e fotoperíodo controlado. Aos 30 até 120 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis respostas a seguir: número de pares de folhas expandidas, número de nós, emissão de raízes secundárias e altura da planta. E após os 120 dias de cultivo foram seccionadas e restabelecidas em meio MS padrão, com o objetivo de avaliar a viabilidade do material vegetal conservado, onde permaneceram por 40 dias. Ao final deste período, as plantas sobreviventes foram aclimatizadas em estufa e avaliadas com 30 dias quanto a porcentagem de sobrevivência, o número de pares de folhas expandidas, número de nós, diâmetro do caule, comprimento da parte aérea e altura da planta.

FIGURA 5 – Microplanta de *Uncaria guianensis* com 30 dias de cultivo antes do tratamento (A), momento da submersão em óleo (B).



3.2 EXPERIMENTO 2 – ÓLEO MINERAL E AMBIENTE DE CULTIVO COMO ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE MICROESTACAS

O tratamento foi aplicado aos 2 acessos coletados: acesso 1 – Parque Ambiental Chico Mendes, acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (PZ/UFAC) e os explantes estabelecidas em meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), adicionados de sacarose (3%), pH 5,8 e solidificado com Phytigel™ (2,2 g. L⁻¹) em tubo de ensaio com 10 mL de meio e autoclavados a 121 °C em 1,0 atm. de pressão por 20 minutos. Já o óleo mineral foi autoclavado por 40 minutos em um recipiente com tampa e posteriormente levado a estufa onde permaneceu sob temperatura de 50 a 70 °C por 6 horas com a tampa folgada para a retirada da condensação, sendo depois apertado e vedado com papel filme ao redor e submetidos a temperatura ambiente antes do uso. Para devida distribuição nos tratamentos foi usada uma micropipeta automática e ponteiros autoclavados.

O material vegetal usado foi microestacas de 1 cm (originadas de plantas germinadas *in vitro* com 70 dias de cultivo), sendo os tratamentos, em esquema fatorial 3 x 2 x 2 (imersão com alíquotas de água de osmose reversa autoclavada, óleo mineral e sem imersão x duas temperaturas x duas populações). Assim sendo utilizado 180 tubos por acesso, ou seja, 15 repetições (tubo de ensaio com um explante) por tratamento (QUADRO 2).

Depois as culturas foram submersas com alíquotas de 5 mL de óleo mineral e água autoclavada sendo utilizado micropipeta e ponteiros para sua devida dispersão, e o

processo desenvolvido em câmara de fluxo laminar horizontal devidamente esterilizada, como também utensílios para manipulação referentes a pinças, cabos, lâminas de bisturi e placas de petri com papel. Posteriormente os explantes foram submetidos a duas temperaturas de cultivo *in vitro* ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $15\text{ }^{\circ}\text{C}$), onde parte desse material vegetal ficou em sala de cultivo artificial com 16 horas de fotoperíodo e a outra em estufa com 12 horas de fotoperíodo e $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Foram avaliadas como variáveis respostas aos 90 e 150 dias de cultivo *in vitro*: a altura da planta (cm), número de pares de folhas expandidas, número de nós e número de raízes secundárias. Com 150 dias as plantas foram transferidas para seu reestabelecimento em meio MS, onde permaneceram por 40 dias. Ao final deste período, os vegetais sobreviventes foram aclimatizados em estufa e avaliadas com 30 dias quanto a porcentagem de sobrevivência.

QUADRO 2 - Óleo mineral e ambiente de cultivo como estratégias de conservação *in vitro* de microestacas

Tratamento	Temperatura de cultivo	Populações
T1 - Sem imersão	$25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	PZ
T2 - Água de osmose	$25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	PZ
T3 - Óleo Mineral	$25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	PZ
T4- Sem imersão	15°C	PZ
T5- Água de osmose	15°C	PZ
T6 - Óleo Mineral	15°C	PZ
T7- Sem imersão	$25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	PC
T8- Água de osmose	$25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	PC
T9 - Óleo Mineral	$25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	PC
T10- Sem imersão	15°C	PC
T11 - Água de osmose	15°C	PC
T12 - Óleo Mineral	15°C	PC

3.3 EXPERIMENTO 3 – AGENTE OSMÓTICO NA PRESERVAÇÃO *IN VITRO* DE MICROESTACAS

Os tratamentos, em esquema fatorial $2 \times 4 + 1$ (dois agentes osmóticos x quatro concentrações + tratamento adicional de sacarose) (QUADRO 3), com 12 repetições e 108 microestacas, foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado.

Quadro 3 - Composição dos tratamentos utilizados para o crescimento mínimo das microestacas.

Tratamentos	Agente osmótico	Concentrações dos agentes osmóticos
Controle	Sacarose	30 g.L ⁻¹
T1	Manitol	10 g. L ⁻¹
T2	Manitol	20 g. L ⁻¹
T3	Manitol	30 g. L ⁻¹
T4	Manitol	40 g.L ⁻¹
T5	Sorbitol	10 g.L ⁻¹
T6	Sorbitol	20 g.L ⁻¹
T7	Sorbitol	30 g.L ⁻¹
T8	Sorbitol	40 g.L ⁻¹

A microestaca consistiu de um segmento caulinar com 1 cm de comprimento e um par de gemas axilares (FIGURA 6), obtidas de plantas com 70 dias da germinação *in vitro* de sementes. A unidade experimental foi consistida de um tubo de ensaio (25 x 150 mm) com um explante e 10 mL de meio WPM.

FIGURA 6 – Microestaca de *Uncaria guianensis*. (A) estabelecida em meio de cultura e (B) tamanho e detalhes do explante.



Como meio de cultura basal utilizou-se a formulação de WPM, acrescido do tratamento correspondente (tipo e concentração de carboidrato), pH 5,8 e Phytigel™ (2,2 g. L⁻¹), autoclavados a 121 °C em 1,0 atm. de pressão por 20 minutos.

Aos 30 e 150 dias de cultivo as seguintes características foram avaliadas: tamanho da planta (cm) número de pares de folhas expandidas, nós e emissão de raízes secundárias. Aos 150 dias de cultivo as plantas foram transferidas para seu

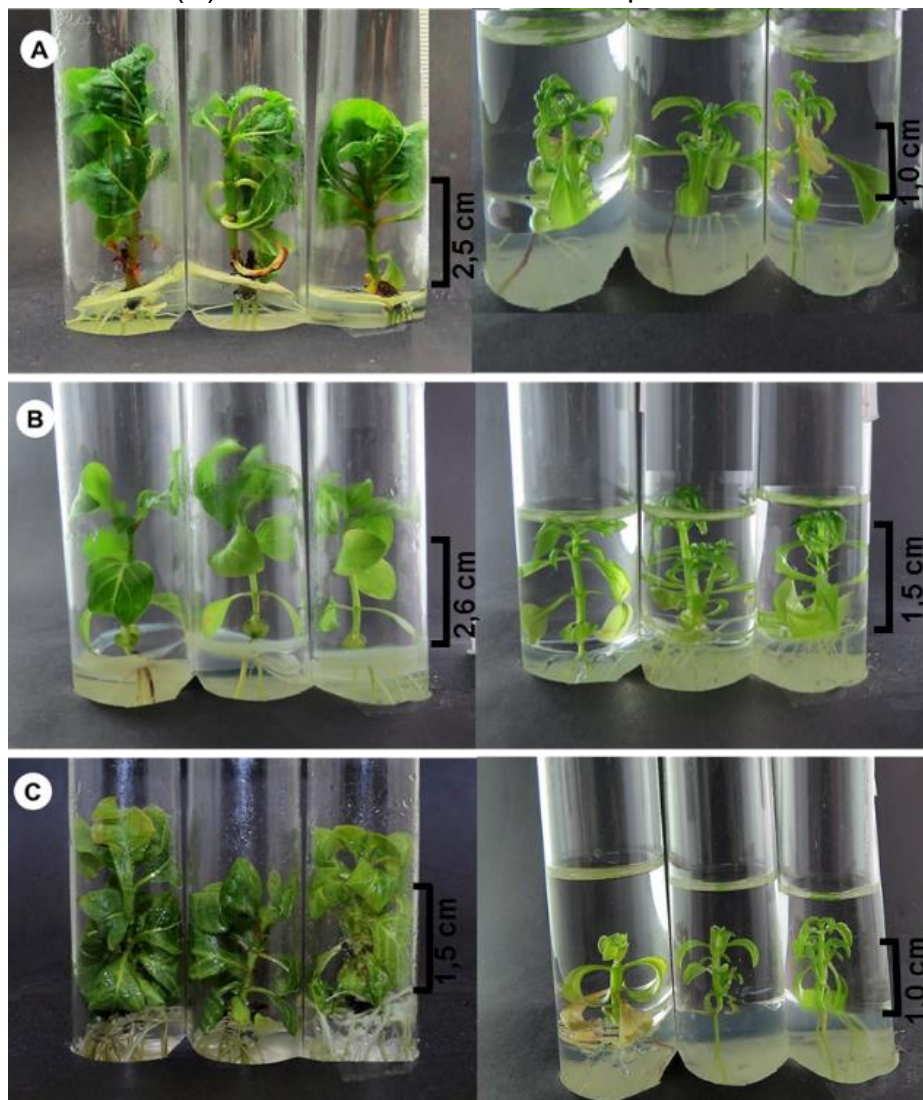
reestabelecimento em meio MS, com o objetivo de avaliar a viabilidade do material vegetal conservado onde permaneceram por 40 dias. Ao final deste período, as brotações sobreviventes foram aclimatizadas em estufa e avaliados com 30 dias quanto a porcentagem de sobrevivência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1 - MEIOS DE CULTURA E IMERSÃO EM ÓLEO MINERAL NO CRESCIMENTO DE MICROPLANTAS

No experimento 1 observou-se que aos 60 e 120 dias de cultivo, as microplantas de *Uncaria guianensis* submersas em óleo mineral apresentavam 100% de sobrevivência nos três meios (MS, QL e WPM) (FIGURA 7).

FIGURA 7 – Microplantas submetidas aos tratamentos em meio QL sem imersão e com óleo (A), meio WPM sem imersão e com óleo (B), meio MS sem imersão e com óleo (C) aos 60 dias de cultivo *in vitro* após a imersão.



De acordo com a análise de variância, verificou-se que houve efeitos isolados para os fatores em destaque (Meio de cultura x Sistema de cultivo), com diferenças significativas entre os sistemas de cultivo. O tratamento com óleo mineral teve médias inferiores em relação aos

sem imersão, com 60 dias, para número de pares de folhas expandidas (NPFE), números de nós (NN) e tamanho de planta (TP), porém a variável número de raízes não obteve significância (FIGURA 7 e TABELA 1). Já para o fator meio de cultura durante o mesmo período não foi obtida diferenças estatísticas nas variáveis descritas.

TABELA 1 - Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), número de nós (NN), altura da planta (AP) e número de raízes secundárias (NRS) de microplantas de *Uncaria guianensis* em função da formulação do meio de cultura, sistema de cultivo (SCV) com e sem imersão em óleo mineral avaliado aos 60 dias de cultivo *in vitro*, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

60 DIAS DE CULTIVO					
Tratamentos		Características			
		NPFE	NN	AP (cm)	NRS
SCV	SI	4.05 a	4.05 a	2.44 a	3.08 a
	CO	3.22 b	3.22 b	1.42 b	2.83 a
MEIO	MS	3.58 a	3.58 a	1.65 b	2.79 a
	QL	3.87 a	3.87 a	2.16 a	3.08 a
	WPM	3.45 a	3.45 a	1.97 a	3.00 a
CV (%) =		29.07	29.07	20.98	33.44
W (P) =		0.965*	0.965*	0.960*	0.950**
B (P) =		2.508*	2.508*	6.448*	4.403**

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartellett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. Análise de variância no APÊNDICE A.

Durante os 120 dias pode ser observado efeitos isolados entre os fatores para as variáveis NPFE e NN onde as microplantas imersas em óleo mineral obtiveram médias inferiores aos tratamentos que não continham sua adição, no fator sistema de cultivo, já em relação ao meio de cultura não houve diferenças, esse retardamento pode ser explicado pela baixa circulação de oxigênio ocasionados pela viscosidade do óleo, como relatados por Edwards et. al. (1947) ao diminuir a taxa de crescimento do fungo *Sordaria fimicola*, onde correlacionou o uso do óleo com a taxa de respiração que é exigida para a energia metabólica. Com relação ao número de raízes o sistema de cultivo não foi significativo já o meio MS obteve menor produção destas (TABELA 2).

TABELA 2 - Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), número de nós (NN) e número de raízes secundárias (NRS) de microplantas de *Uncaria guianensis* em função da formulação do meio de cultura, sistema de cultivo (SCV) com e sem imersão em óleo mineral avaliado aos 120 dias de cultivo *in vitro*, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

		120 DIAS DE CULTIVO		
Tratamentos		Características		
		NPFE	NN	NRS
SCV	SI	5.30b	5.30 b	4.41 a
	CO	4.52 a	4.52 a	4.11 a
MEIO	MS	5.00 a	5.00 a	3.58 b
	QL	4.83 a	4.83 a	4.83 a
	WPM	4.91 a	4.91 a	4.37 a
CV (%) =		17.55	17.55	26.26
W (P) =		0.962*	0.962*	0.962*
B (P) =		4.099*	4.099*	1.989*

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
 2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartellett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).
 3. Análise de variância no APÊNDICE B.

Também aos 120 dias, a altura de plantas foi influenciada significativamente pela interação entre os fatores (TABELA 3). A imersão das microplantas com óleo mineral, associada a formulação de QL e WPM, reduziu o crescimento *in vitro*. Para microplantas cultivadas em meio MS a imersão em óleo mineral não teve efeito significativo.

TABELA 3 - Médias referentes à altura da planta (AP), de microplantas de *Uncaria guianensis* em função da formulação do meio de cultura, sistema de cultivo (SCV) com e sem imersão em óleo mineral avaliado aos 120 dias de cultivo *in vitro*, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Meio	Sistema de cultivo	
	Imersão em óleo	Sem imersão
MS	2.55 aA	2.61aB
QL	2.78 bA	3.77 aA
WPM	2.27 bA	3.87 aA
CV (%) = 24.90		W (P) = 0.957
		B (P) = 12.088

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, minúscula na linha (sistema de cultivo) maiúscula na coluna (meio) pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
 2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartellett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).
 3. Análise de variância no APÊNDICE B.

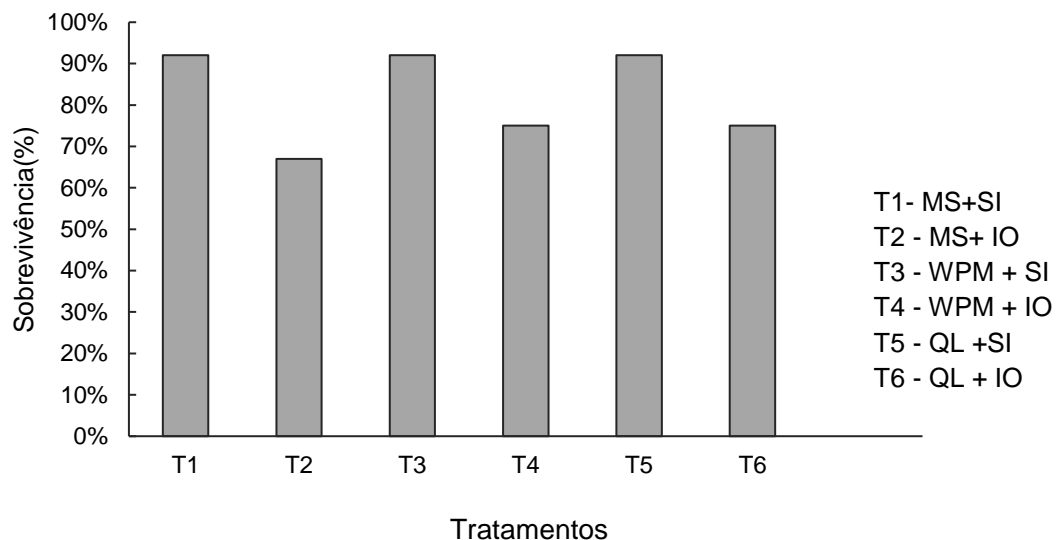
Sharma et al. (2012) destaca não só o meio de cultura como fator para conservação *in vitro*, mas também o uso do óleo mineral, ao desenvolver um protocolo de crescimento lento para conservação de segmentos nodais de *Bacopa monnieri*.

Nesse ínterim experimentos realizados por Souza (2013) usando microestacas de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em meio MS e submersas por óleo mineral, aos 30 dias de cultivo, obtiveram 80% de taxa de sobrevivência, sendo os demais perdidos devido a oxidação fenólica, já os tratamentos com microplantas de *U. guianensis* submetidos ao óleo mineral não houveram oxidações.

Corroborando com Scherwinski-Pereira e Costa (2014) ao afirmarem que o uso de óleo mineral, óleo de querosene, cultivo em meio líquido são técnicas alternativas para a conservação das espécies *in vitro* devido interferir na atmosfera de cultivo, tendo como elementos principais o tipo de material e a espécie vegetal usada.

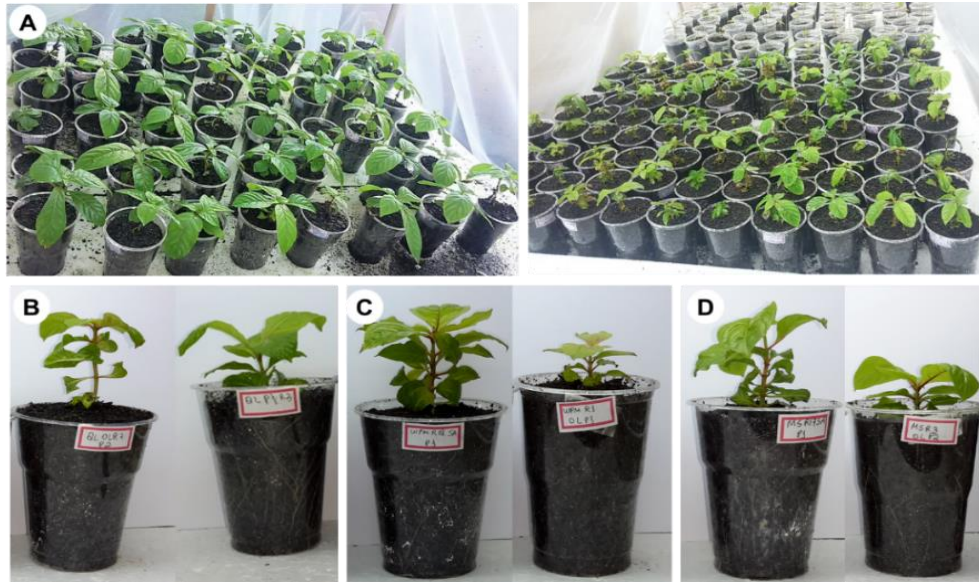
Já na aclimatização foram obtidas 90% de sobrevivência entres os tratamentos sem imersão, enquanto a imersão em óleo mineral (IO) com meio MS a porcentagem ficou com 70% e os que foram submetidos ao meio QL e WPM a 80% (FIGURAS 8 e 9).

FIGURA 8 – Porcentagem de sobrevivência das plantas aos 30 dias de aclimatização.



Com relação ao crescimento *ex vitro*, as plantas conservadas *in vitro*, provenientes dos três meios de cultura e imersas em com óleo mineral, tiveram características morfológicas normais com crescimento mais lento, possivelmente pela menor altura de plantas na condição *in vitro* (FIGURA 9).

FIGURA 9 – Plantas de *Uncaria guianensis* provenientes do tratamento de conservação em óleo mineral, com 30 dias de aclimatização. Disposição dos tratamentos e aspecto geral das plantas (A), plantas provenientes do meio QL (B), WPM (C) e MS (D), sem e com imersão em óleo mineral, respectivamente.



A análise de variância dos dados referentes à fase de aclimatização evidenciou efeitos significativos dos fatores isoladamente (TABELA 4). Com exceção do diâmetro do pseudocaulo (DC), plantas provenientes do tratamento *in vitro* com imersão em óleo mineral, tiveram médias significativamente menores.

TABELA 4 - Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP), número de nó (NN), diâmetro do caule (DC) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliados com 30 dias em processo de aclimatização, de microplantas de *Uncaria guianensis* em função da formulação do meio de cultura, sistema de cultivo (SCV) com e sem imersão em óleo mineral, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Tratamentos		30 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO				
		Caraterísticas				
		NPFE	AP (cm)	NN	DC (mm)	CPA (cm)
SCV	SI	5.45 a	4.43 a	5.45 a	2.13 a	4.50 a
	CO	4.34 b	3.53 b	4.34 b	2.14 a	3.58 b
MEIO	MS	4.84 a	3.31 b	4.84 a	2.17 a	3.38 b
	QL	5.00 a	4.58 a	5.00 a	2.18 a	4.66 a
	WPM	5.05 a	4.17 a	5.05 a	2.06 a	4.22 a
	CV (%) =	22.14	21.69	22.14	15.49	21.11
	W (P) =	0.951**	0.976*	0.958**	0.962*	0.960**
	B (P) =	6.362*	5.591*	5.507**	6.362*	8.579*

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Barttelet (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. Análise de variância no APÊNDICE C.

Entre as formulações de meio de cultura, foram verificadas diferenças somente para AP e CPA, com menor média para plantas procedentes do meio MS. Para as demais características de crescimento avaliadas, não houve diferença significativa entre os meios de cultura (TABELA 4).

Baseado nos resultados obtidos neste estudo foi possível verificar que microplantas são aptas à conservação a curto prazo por imersão em óleo mineral ou com apenas mudanças em seu meio nutritivo. Assim como em experimentos feitos por Sharma *et al.* (2012) que obtiveram desenvolvimento e sobrevivência satisfatórios em protocolos de crescimento lento para conservação a médio prazo, usando segmentos nodais de *Bacopa monnieri* desde os subcultivos até a aclimatização.

Contudo são necessários mais estudos a fim de se ajustar alguns parâmetros, tais como, quantidade de óleo e tamanho da microplanta, para que se possa prolongar o tempo de conservação do material vegetal.

4.2 EXPERIMENTO 2 - ÓLEO MINERAL E AMBIENTE DE CULTIVO COMO ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE MICROESTACAS

Aos 90 dias de conservação *in vitro*, para o número de raízes pode ser observado que o tratamento T1, sem imersão e 25 °C, oriundos do Parque Zoobotânico, foi superior aos sem imersão (10), pelos submerso por água (11) e óleo mineral (12) a 15 °C todos do acesso Parque Chico Mendes. Deste modo ao verificar a resposta da variável aos tratamentos, pode ser constatado que temperaturas baixas e diferentes acessos são critérios extremantes importantes na conservação *in vitro* de *Uncaria guianensis* durante os três primeiros meses, contudo aos 150 dias não foi significativo. (TABELA 5).

TABELA 5 - Médias referentes ao número de raízes secundárias, (NRS) aos 90 dias de cultivo, de microestacas de *Uncaria guianensis* em função de três sistemas de cultivo (sem imersão, com água e com óleo), duas temperaturas 25 °C ± 5 °C e 15°C) e dois acessos (Parque Ambiental Chico Mendes, Acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da UFAC experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016).

90 DIAS DE CULTIVO	
Tratamentos	Característica
	NRS
T1 (Sem imersão x 25 °C ± 5 °C x PZ)	131.26 B
T2 (Água de osmose x 25 °C ± 5 °C x PZ)	97.83 AB
T3 (Óleo Mineral x 25 °C ± 5 °C x PZ)	103.46 AB
T4 (Sem imersão x 15°C x PZ)	97.83 AB
T5 (Água de osmose x 15°C x PZ)	86.57 AB
T6 (Óleo Mineral x 15°C x PZ)	95.43 AB
T7 (Sem imersão x 25 °C ± 5 °C x PC)	110.76 AB
T8 (Água de osmose x 25 °C ± 5 °C x PC)	78.53 AB
T9 (Óleo Mineral x 25 °C ± 5 °C x PC)	75.30 AB
T10 (Sem imersão x 15°C x PC)	69.67 A
T11 (Água de osmose x 15°C x PC)	69.67 A
T12 (Óleo Mineral x 15°C x PC)	69.67 A

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

Trabalhos que evidenciam a conservação *in vitro* a curto e a longo prazo sempre priorizam a escolha de recursos genéticos com base em características desejáveis de determinada espécie, onde em conjunto com a estratégias de conservação *in vitro* podem retardar as funções morfológicas do vegetal sem perda do material genético, e em dias vindouros abastecer coleções de germoplasma e até mesmo ser fundamental nos programas de melhoramento (SILVA et al., 1997).

Com relação ao uso das estratégias com óleo mineral e temperaturas baixas temos a exemplo os experimentos de Sharma et al. (2012) que conseguiu desenvolver um protocolo de crescimento lento para conservação a médio prazo, utilizando imersão de óleo mineral em segmentos nodais de *Bacopa monnieri*, submersas por seis a vinte quatro meses, causando *retardamento* de sua morfologia e alto índice de regeneração. Além do óleo, temperaturas mais baixas são indicadas para a redução do metabolismo da planta de diversas espécies vegetais, como *Saccharum* spp., *Passiflora giberti* N.E. Brown e *Cocos nucifera* (LEMOS et al., 2002; FARIA et al., 2006; LÉDO et al., 2007).

No período de 90 dias foi obtido a interação dos fatores sistema de cultivo e acesso, ao ser realizado o desdobramento podemos observar que as imersões com os explantes oriundos do Parque Chico Mendes não foram significativas, todavia, as do Parque Zoobotânico aumentou o número de folhas expandidas (NPFE) e nós (NN) quando comparadas aos tratamentos com imersão em óleo mineral (IO) ou água (IA), assim podendo ser destacado que o tipo de imersão usada influência no comportamento da planta (TABELA 6).

TABELA 6 – Médias referentes a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão (SI), imersão em água (IA) e imersão em óleo (IO)) e os dois acessos (Acesso 1 – Parque Ambiental Chico Mendes (PAC), Acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (PZ/UFAC) das variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE), número de nós (NN) de microestacas aos 90 dias, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

90 DIAS DE CULTIVO					
Características	Acessos	Sistema de Cultivo			CV (%)
		SI	IA	IO	
NPFE	PC	2.50 aB	2.23 aB	2.13 aB	29.21
	PZ/UFAC	3.66 aA	3.40 aA	2.66 bA	
NN	PC	2.50 aB	2.23 aB	2.13 aB	29.21
	PZ/UFAC	3.66 aA	3.40 aA	2.66 bA	

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, minúscula na linha (sistema de cultivo) maiúscula na coluna (acesso) pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2. Análise de variância no APÊNDICE D.

Na variável altura da planta pode ser visto que aos 90 dias o sem imersão reagiu da mesma forma que os tratamentos com água ou óleo. Porém ao desdobrar as temperaturas nos níveis sistemas de cultivo pode ser observado que 25 ± 5 °C e 15 °C diferenciaram-se em relação ao sem imersão e os submersos por óleo (TABELA 7).

Assim, pode ser visto que os tratamentos com alíquotas de óleo mineral interferem no crescimento e desenvolvimento das plantas, como também quando submetidos a baixas temperaturas, tendo como consequência a modificação do ambiente de cultivo e temperatura de incubação, sendo eficaz no prolongamento das subculturas (ENGELMANN, 2011), pois o frio reduz o metabolismo da planta modificando o seu funcionamento natural, principalmente sobre ações enzimáticas e membranas celulares (LEMOS et al., 2002; ARRIGONI-BLANK et al., 2014).

Além disso, segundo Mathur et al. (1991) o óleo mineral forma uma camada impermeável, metabolicamente inerente em torno do tecido vegetal cultivado, impedido a oxigenação e conseqüentemente tendo o seu crescimento retardado. Assim, sendo uma estratégia importante na redução das atividades de crescimento e desenvolvimento, levando em consideração que a observação comportacional do tecido é fundamental para que se tenha uma taxa metabólica basal aparente, afinal a indisponibilidade relativa do oxigênio diminui o desempenho desta (MONNONEN et al.1990; ENGELMANN, 1997).

Neste ínterim as baixas temperaturas também são alternativas viáveis a conservação, como exemplo temos trabalhos desenvolvidos por Arrigoni-Blank et al. (2014) que colocou sob condições de 18 °C genótipos de batata e obteve sucesso ao conservar o vegetal durante o período de 180 dias.

TABELA 7 – Médias referentes a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão (SI), com água (IA) e com óleo (IO)) e duas temperaturas (25 °C e 15°C) das variável altura da planta (AP), de microestacas aos 90 dias de cultivo, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

90 DIAS DE CULTIVO					
Característica	Temperatura	Sistema de Cultivo			CV (%)
		SI	CA	CO	
AP	25 ± 5 °C	1.84 aA	1.69 bA	1.65 bA	11.60
	15°C	1.50 abB	1.57 bB	1.41aB	

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, maiúscula na linha (sistema de cultivo) minúscula na coluna (temperatura) pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
2. Análise de variância no APÊNDICE D.

Aos 150 dias também foi obtido interação significativa com a temperatura, onde no desdobramento pode ser visto que o método sem imersão obteve comportamento semelhante a imersão em água como também os submersos em óleo, aumentando o número de folhas e nós sob 25 °C, outras diferenças encontradas foram entre a imersão em água e a imersão em óleo. Já sob 15 °C o sem aditivos também foi favorável ao aumento de número de folhas e nós, divergindo dos tratamentos submersos com água e imersos em óleo com menores médias (TABELA 8). Tendo semelhanças com a observações experimentais feitas por Peixoto et.al (2017) em *Chemotypes of lippia alba* (mill.), onde verificou que o quimiotipo de carvona responde bem a imersão em óleo mineral e a temperatura baixa de 18 °C por 180 e 270 dias.

No mesmo período de 150 dias na variável altura de planta foi observado que o tratamento sem alíquotas e o com óleo obteve comportamentos semelhantes, diferenciado

- se da água sob influência da temperatura de 25 °C. Já para 15 °C não foi obtido diferenças estatísticas com relação ao sistema de cultivo, tendo discrepância apenas entre as temperaturas (TABELA 8).

TABELA 8 – Médias referentes a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão (SI), com água (IA) e com óleo (IO)) e duas temperaturas (25 °C ± 5 °C e 15°C) das variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE), número de nós (NN), Altura da planta (TP), de microestacas aos 150 dias de cultivo, de microestacas, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

150 DIAS DE CULTIVO					
Característica	Temperatura	Sistema de Cultivo			CV (%)
		SI	CA	CO	
NPFE	25 ± 5 °C	3.53 abA	3.76 aA	3.20 bA	27.12
	15°C	2.96 aB	2.36 bB	2.06 bB	
NN	25 ± 5 °C	3.53 abA	3.76 aA	3.20 bA	27.12
	15°C	2.96 aB	2.36 bB	2.06 bB	
AP	25 ± 5 °C	1.96 aA	1.81bA	1.83 aA	10.62
	15°C	1.74 aB	1.80 aB	1.69 bA	

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, minúscula na linha (sistema de cultivo) maiúscula na coluna (temperatura) pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
2. Análise de variância no APÊNDICE E.

Para médias referentes a acesso e sistema de cultivo não foi encontrada diferenças estatísticas no Parque Chico Mendes, apenas para o Parque Zoobotânico onde o sem imersão e água foi superior ao óleo para número de folhas e nós (TABELA 9).

TABELA 9 – Médias referentes a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão (SI), com água (IA) e com óleo (IO)) e os dois acessos (Acesso 1 – Parque Ambiental Chico Mendes (PAC), Acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (PZ/UFAC) das variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE) e número de nós (NN) de microestacas aos 150 dias de cultivo, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

150 DIAS DE CULTIVO					
Característica	Acessos	Sistema de Cultivo			CV (%)
		SI	CA	CO	
NPFE	PC	2.66 aB	2.56 aB	2.66 aB	27.12
	PZ/UFAC	3.83 aA	3.56 aA	2.86 bA	
NN	PC	2.66 aB	2.56 aB	2.66 aB	27.12
	PZ/UFAC	3.83 bA	3.56 bA	2.86 bA	

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, minúscula na linha (sistema de cultivo) maiúscula na coluna (acesso) pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
2. Análise de variância no APÊNDICE E.

Na varável altura de plantas foi obtido interações significativas entre os fatores temperaturas e acessos, mas não para o Parque Chico Mendes. Porém o Parque Zoobotânico quando exposto a temperatura de 25 °C foi superior a 15 °C aumentando a altura das plantas, corroborando com trabalhos de Silva et. al (2016) desenvolvidos com amoreira- preta, onde a taxa de crescimento dos explantes reduziu, quando os mesmos foram mantidos em baixas temperaturas (TABELA 10, FIGURAS 10 e 11).

Sendo que a respostas variaram em função da sensibilidade ao decréscimo da temperatura. (FARIA et al., 2006), sempre levando em conta que a combinação de condições baixas de cultivo com a adição de alíquotas ou agentes osmóticos no meio de cultura tem sido apontada como uma alternativa eficiente para a conservação de germoplasma *in vitro*.

TABELA 10 – Médias referentes a interação de duas temperaturas (25 °C ± 5 °C e 15°C) e acessos (Acesso 1 – Parque Ambiental Chico Mendes (PAC), Acesso 2 – Área do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (PZ/UFAC) da variável Altura da planta (AP), de microestacas aos 150 dias de cultivo, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2017.UFAC, 2017.em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

150 DIAS DE CULTIVO				
Característica	Acessos	Temperatura		CV (%)
		25 ± 5 °C	15°C	
AP	PC	1.80 aB	1.74 aB	12.66
	PZ/UFAC	1.93 aA	1.75 bB	

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, minúscula na linha (temperatura) maiúscula na coluna (acesso) pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
2. Análise de variância no APÊNDICE E.

FIGURA 10 – Plantas Parque Ambiental Chico Mendes submetidas aos tratamentos sem imersão, com óleo mineral e submersas por água aos 90 e 150 dias sob temperatura de 15 °C. 30 dias de cultivo *in vitro* (A), 150 dias de cultivo *in vitro* (B).

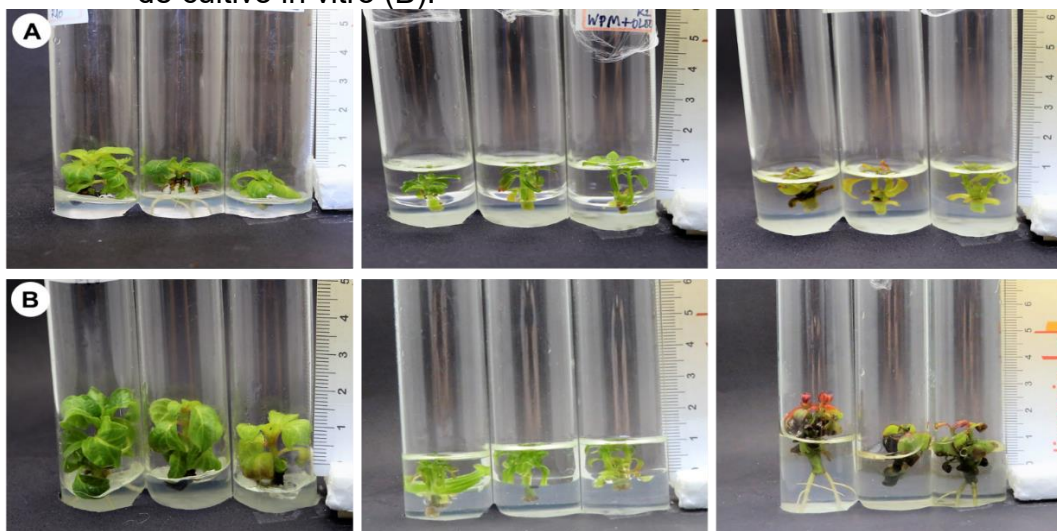
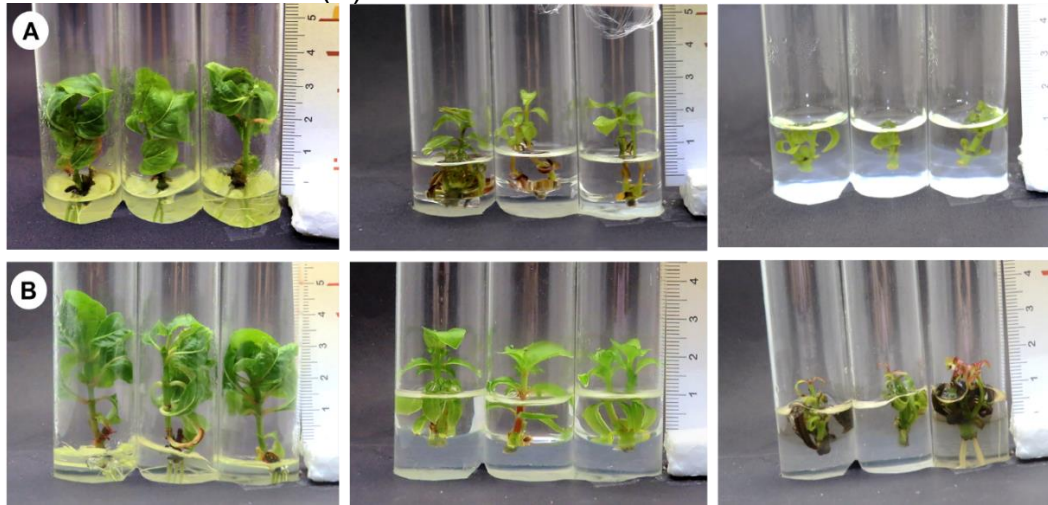


FIGURA 11 – Plantas do Parque Ambiental Chico Mendes submetidas aos tratamentos sem imersão, com óleo mineral e submersas por água aos 30 e 150 dias sob temperatura de 25 °C. 30 dias de cultivo *in vitro* (A) e 150 dias de cultivo *in vitro* (B).

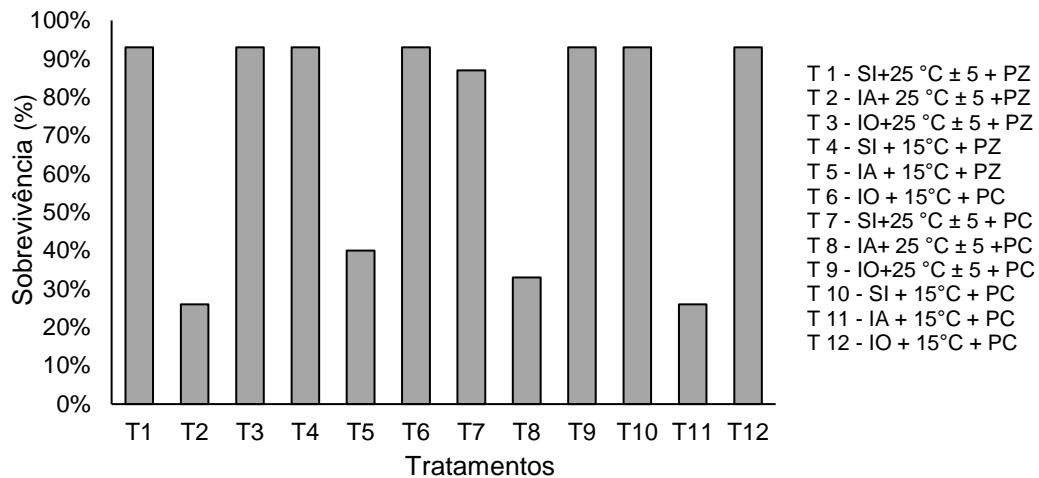


Assim pode ser considerado válidos os resultados ao se utilizar óleo mineral e temperaturas baixas neste experimento, como também tem sido aplicado com sucesso na conservação *in vitro* de espécies medicinais de importância econômica como o algodão do Cerrado (*Cochlospermum regium*) (CAMILLO et al., 2009), e mangabeira da região nordeste do Brasil (SÁ et al., 2011).

Foram observados também neste experimento consequências como necrose no período de restabelecimento em meio MS, e a presença de folhas acometidas por fungos na aclimatização em plantas submetidas ao tratamento com água, ou seja, apesar de estas manterem-se aparentemente vivas, no processo de finalização do experimento seus tecidos não suportaram ao estresse.

Fatos que corroboram com este resultado foi exposto no experimento de Souza (2013) ao usar microestacas de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* submersas por água, e que ao final da experimentação obteve déficit em seus explantes e posteriormente a morte deles na fase de aclimatização.

Na aclimatização de plantas de *Uncaria guianensis* foram obtidas 93% de sobrevivência entres os tratamentos sem imersão e ao submersos por óleo oriundos do Parque Ambiental Chico Mendes e do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre, com exceção do sem alíquota (T 7) do Parque Chico Mendes submetidos a 25 °C de temperatura que foi obteve 87% de sobrevivência e os demais que haviam sido imersos com água tiveram menores porcentagens que vai de 26 a 40% entre os tratamentos (FIGURA 12).

FIGURA 12 – Porcentagem de sobrevivência 30 dias de aclimatização.

Alicerçado nos resultados obtidos foi possível constatar que microestacas são aptas à conservação a médio prazo por imersão em óleo mineral juntamente com seu sistema de cultivo e a escolha do acesso de interesse. Porém são necessários mais estudos a fim de se ajustar alguns parâmetros, tais como, variabilidade adequada do vegetal, afinal genótipos superiores podem ultrapassar as barreiras impostas pela técnica de cultivo lento, sendo assim necessárias plantas que sejam mais maleáveis ao processo sem que tenhamos a perda de sua viabilidade, para que se possa prolongar o tempo de conservação do material. Porém, novos trabalhos devem ser realizados com a espécie, afim de verificar maiores tempos de conservação *in vitro*.

4.3 EXPERIMENTO 3 - AGENTE OSMÓTICO NA PRESERVAÇÃO *IN VITRO* DE MICROESTACAS

No terceiro experimento, com 90 e 150 dias de cultivo *in vitro* na presença dos agentes osmóticos as plantas obtiveram a taxa de 100% de sobrevivência, sendo vistos efeitos isolados entre o sistema de cultivo contendo sorbitol ou manitol e suas concentrações.

Aos 90 dias as plantas diferiram estatisticamente do tratamento controle para as variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE) e número de nós (NN), referente ao sistema de cultivo com sorbitol ou manitol, onde o tratamento com a sacarose obteve médias superiores, contudo na variável altura da planta (AP) os tratamentos com sorbitol ou sacarose agiram estatisticamente semelhantes, assim

como nos estudos desenvolvido por de Li et al. (2012) usando sorbitol em macieiras, onde observou que este carboidrato foi efetivo na indução do crescimento *in vitro* de Rosaceae, de forma similar ao da sacarose em seus primeiros dias. Quanto as concentrações só foram significativas para a altura da planta (TABELA 11).

TABELA 11 – Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) e número de nós (NN) aos 90 dias de cultivo, de microestacas de *Uncaria guianensis* em função de dois agentes osmóticos (sorbitol ou manitol), tendo a sacarose como controle, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

90 DIAS DE CULTIVO			
Tratamentos	Características		
	NPFE	AP (cm)	NN
Manitol	2.65 c	2.01 b	2.65 c
Sorbitol	3.87 b	2.21 a	3.87 b
Testemunha (SAC)	5.42 a	2.40 a	5.42 a
CV (%) =	23.27	12.58	23.27
W (P) =	0.9643**	0.9630**	0.9643**
B (P) =	9.855*	14.501*	9.855*

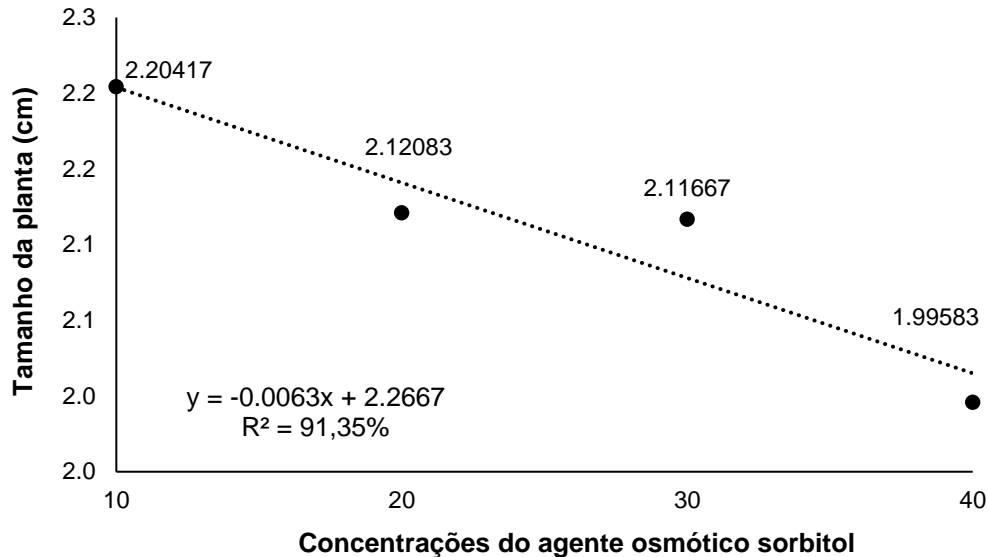
Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartellett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. Análise de variância no APÊNDICE F.

Ainda aos 90 dias a variável altura da planta apresentou correlação significativa ($r = 91,35$) entre as concentrações de sorbitol, onde interferiu no decréscimo do eixo Y pertencente a variável independente ocupada pela altura da planta, sendo representada por uma equação linear de associação negativa, onde o eixo X composto pelas concentrações agiu de forma dependente, tendo como efeito o aumento da altura da planta em 2, 26 cm quando submetido a 10 g.L⁻¹, indo em contrapartida a valores superiores do agente osmótico sorbitol que retardou o crescimento da planta em 0,00 63 cm, ou seja com a equação é possível dizer que ao se ter a diminuição da planta é elevado unidades na variável dependente, podendo predizer quantos centímetros se perde a uma medida de determinada concentração, já para o manitol não foi encontrado significância estatística em sua concentração (FIGURAS 13).

FIGURA 13 – Médias referentes a concentrações da variável altura da planta (AP) em 90 dias de cultivo *in vitro* sob ação de agente osmótico sorbitol e quatro concentrações (10, 20, 30, 40 g. L⁻¹) tendo a sacarose como controle, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.



Notas: 1. Análise de variância no APÊNDICE F.

Assim, sobre o mesmo ponto de vista temos a conservação *in vitro* de segmentos nodais de Mangabeira, onde a presença de 10 ou 20 g L⁻¹ de sorbitol é viável para condições de crescimento lento por 120 dias principalmente interferindo em seu número de brotações por segmento nodal e número de nós por brotação adventícia (SANTOS et al., 2011). Como também em trabalhos desenvolvidos por Skalova et al., 2012 que observou os efeitos dos reguladores osmóticos manitol e sorbitol sob concentrações de 1, 2 e 3%, onde encontrou resultados satisfatórios ao afetar a sobrevivência e o crescimento de mudas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) com o aumento das concentrações destes.

Esses dados evidenciam que o sorbitol não é metabolizado pela maioria dos vegetais de modo natural, gerando incapacidade de biossíntese de açúcares álcoois, tendo relação com a modificação do potencial osmótico do meio, fazendo com que a planta absorva menos água e diminua seus excessos intracelulares por gradiente osmótico em seus tecidos vegetais, além de restringir nutrientes fazendo que o processo de crescimento seja retardado dependendo das concentrações a que cada espécie será submetida (SHIBLI et al., 2006; SHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010).

Para a variável número de raízes pode ser visto que os tratamentos com 20 g.L⁻¹ de manitol diferiu ao ser comparado a 10 g.L⁻¹ de sorbitol, além de obter diferenças nas concentrações de 20 g.L⁻¹, 30 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹ em relação a 30 g.L⁻¹ de sacarose,

divergências entre os tratamentos contendo 10 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹ de sorbitol também foi encontrada, além da discrepância de 30 g.L⁻¹ e o tratamento adicional (TABELA 12).

TABELA 12 - Médias referentes ao número de raízes secundárias (NRS) aos 90 dias de cultivo, de microestacas de *Uncaria guianensis* em função de dois agentes osmóticos (sorbitol ou manitol) e quatro concentrações (10, 20, 30, 40 g. L⁻¹), tendo a sacarose como testemunha, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

90 DIAS DE CULTIVO		
Tratamentos	Concentrações	Característica
		NRS
Manitol	10 g.L ⁻¹	63.00 ABC
	20 g.L ⁻¹	31.83 A
	30 g.L ⁻¹	44.83 AB
	40 g.L ⁻¹	44.16 AB
Sorbitol	10 g.L ⁻¹	78.41 BC
	20 g.L ⁻¹	53.25 ABC
	30 g.L ⁻¹	36.33 A
	40 g.L ⁻¹	50.66 ABC
Testemunha (SAC)	30 g.L ⁻¹	88.00 C

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem ($p > 0,05$) entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os dados relativos a 150 dias das plantas *in vitro* diferiu estatisticamente do tratamento controle para as variáveis NPFE, AP e NN, referente ao sistema de cultivo de sorbitol ou manitol, não diferindo em suas concentrações a não ser para número de pares de folhas expandidas (TABELAS 13 e FIGURA 14). Já para número de raízes não foi significativo.

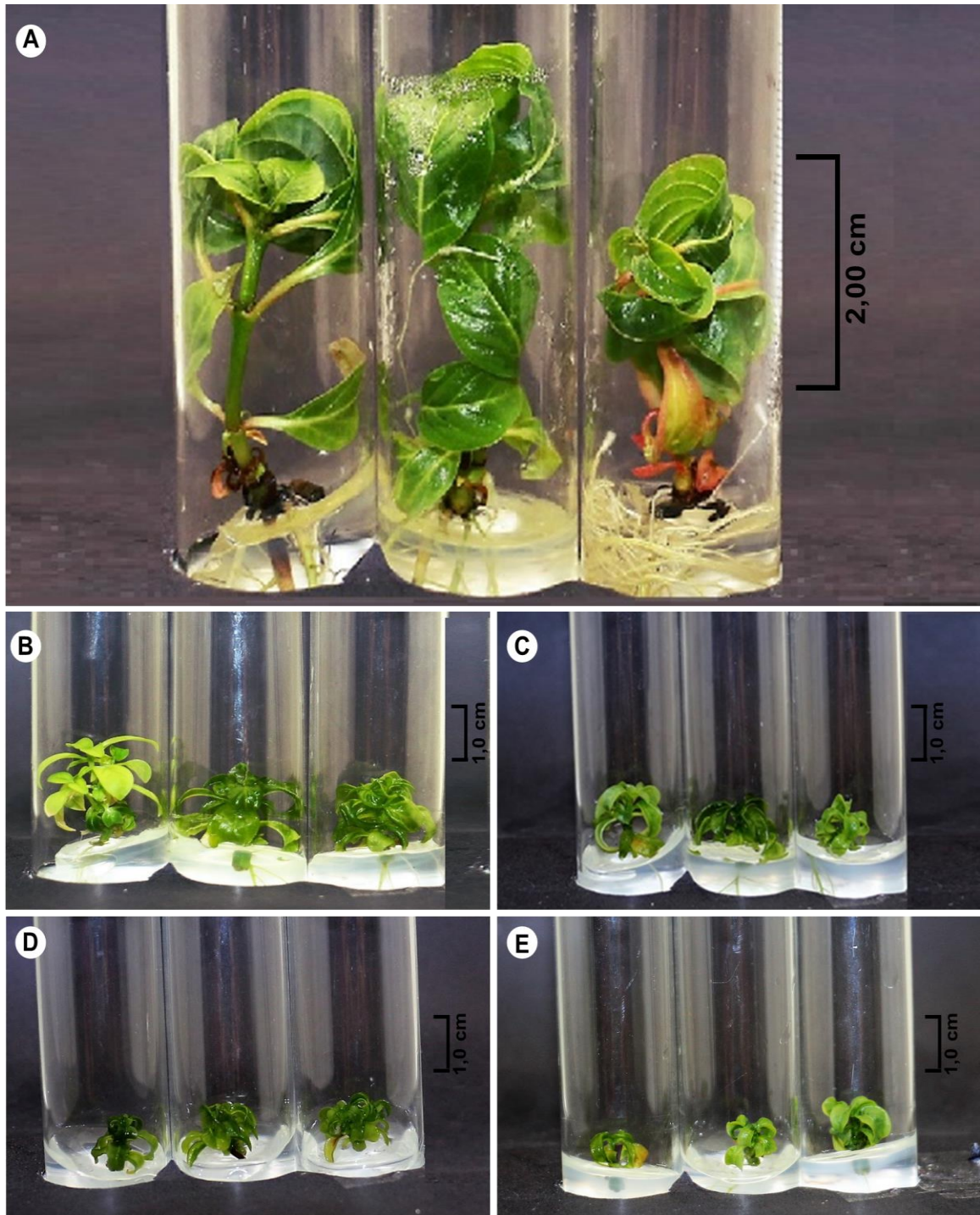
TABELA 13 – Médias referentes ao número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) número de nós (NN) aos 150 dias de cultivo, de microestacas de *Uncaria guianensis* em função de dois agentes osmóticos (sorbitol ou manitol), tendo a sacarose como testemunha, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

150 DIAS DE CULTIVO			
Tratamentos	Características		
	NPFE	AP	NN
Manitol	3.70 c	2.79 c	3.70 c
Sorbitol	5.10 b	3.00 b	5.10 b
Testemunha (SAC)	5.90 a	4.46 a	5.90 a
CV (%) =	15.29	11.65	15.29
W (P) =	0.969**	0.975**	0.969**
B (P) =	4.578**	17.746*	4.578**

Notas:1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartellett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$),
3. Análise de variância no APÊNDICE G.

FIGURA 14 – Efeito das concentrações 10, 20 ,30 e 40 g. L⁻¹ do agente osmótico sorbitol em *Uncaria guianensis* aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Sacarose a 3% (A), sorbitol a 1% (B), sorbitol a 2% (C) sorbitol a 3% (D), sorbitol a 4% (E).

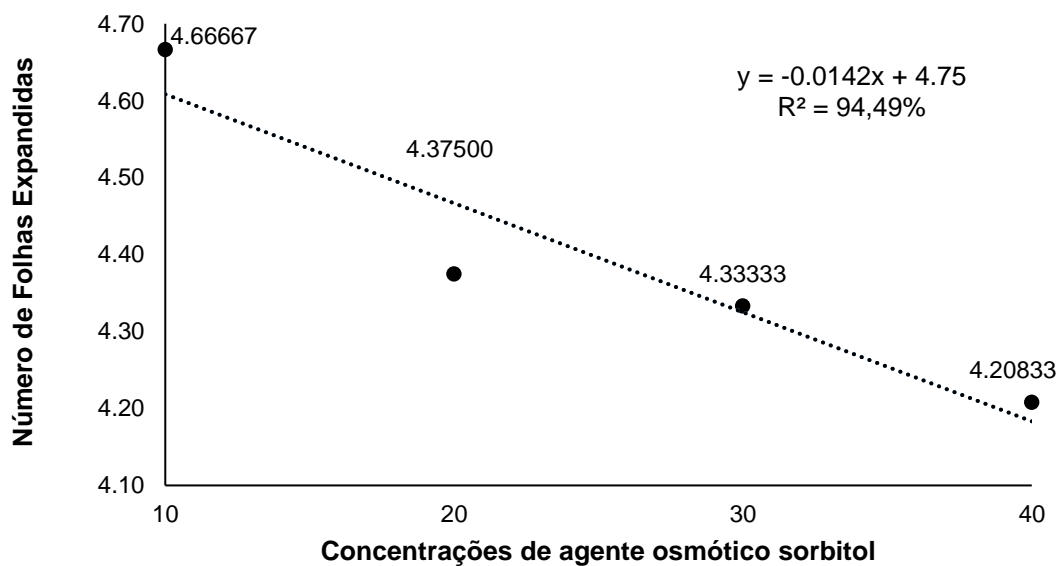


Na variável número de pares de folhas expandidas o açúcar álcool sorbitol ao retardar essa variável obteve equação com tendência linear decrescente

($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$), onde quantidades mais baixas como 10 g.L^{-1} do agente osmótico sorbitol continuou a produzir em média cerca de 4,75 pares de folhas expandidas juntamente com nós e quando submetidas a concentrações superiores decresceram $0,0142$ pares de folhas e nós (FIGURA 15).

Respostas parecidas foram encontradas por Lopez-Puc (2013) no protocolo de conservação *in vitro* da orquídea *Epidendrum chlorocorymbos* schltr, sendo relatado que na presença de 1% e 2% do agente osmótico sorbitol se obtém menos número de brotos e folhas.

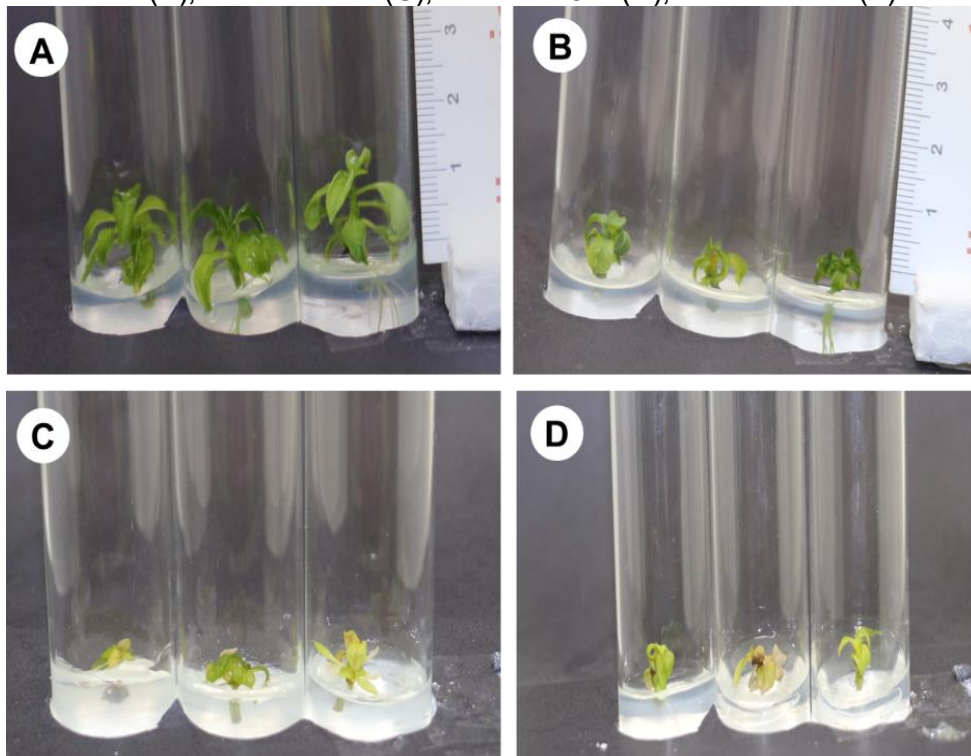
FIGURA 15 – Médias referentes a concentrações na variável número de pares de folhas expandidas (NPFE) em 150 dias de cultivo *in vitro* sob ação de agente osmótico sorbitol e quatro concentrações ($10, 20, 30, 40 \text{ g.L}^{-1}$) tendo a sacarose como testemunha, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.



Notas: 1. Análise de variância no APÊNDICE G.

Neste interim as plantas de *U. guianensis* sob presença do retardante manitol sofreram com ressecamento e amarelecimento de suas folhas, desta maneira observou-se que os açúcares álcoois agiram de forma isolada, onde o sorbitol não causou danos a planta a pesar de reduzir números de pares de folhas, nós e altura (FIGURA 16).

FIGURA 16 – Efeito das concentrações 10, 20 ,30 e 40 g. L⁻¹ do agente osmótico manitol em *Uncaria guianensis* aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Manitol a 1% (B), manitol a 2% (C), manitol a 3% (D), manitol a 4% (E).



Esse efeito fitotóxico também pode ser identificado por Lemos et al. (2002) e Sá et al. (2011) ao submeter culturas de *Saccharum officinarum*, e *Hancornia speciosa* ao manitol, o que é respondido pela a incapacidade da espécie de biossintetizar o açúcar álcool, levando as plantas ao ressecamento, pois a planta absorve menos água e acaba diminuindo seus excessos intracelulares por gradiente osmótico, restringindo nutrientes (SHIBLI et al., 2006; SHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010). Já o sorbitol obteve resultados nocivos até a fase de aclimatização.

O desequilíbrio osmótico provavelmente ocorreu pelo fato de altas concentrações de soluto fora da célula vegetal ser diferentes da interna, fazendo que as células passem por um processo de osmose hipertônica onde tendem a encolher pois perdem água para o meio exterior causando uma desordem no ambiente intracelular e não se reestruturando mesmo submetidas a restabelecimento em meio de cultura com a sacarose, assim ficando susceptível a necrosar quando submetidas a um novo estresse causada pela aclimatização (SILVA & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011; LATA et al. 2010).

Um fato importante que deve ser destacado, é que a sobrevivência dos explantes foi de 100% para os tratamentos submetidos ao sorbitol, ou seja, não houve necrose

dos explantes em nenhum dos tratamentos submetidos, evidenciando que a cultura sobrevive nestas condições. Porém, novos trabalhos devem ser realizados com a espécie, afim de verificar maiores tempos de conservação *in vitro* da planta *Uncaria guianensis* (FIGURA 17 e 18).

FIGURA 17– Porcentagem de sobrevivência 30 dias de aclimatização.

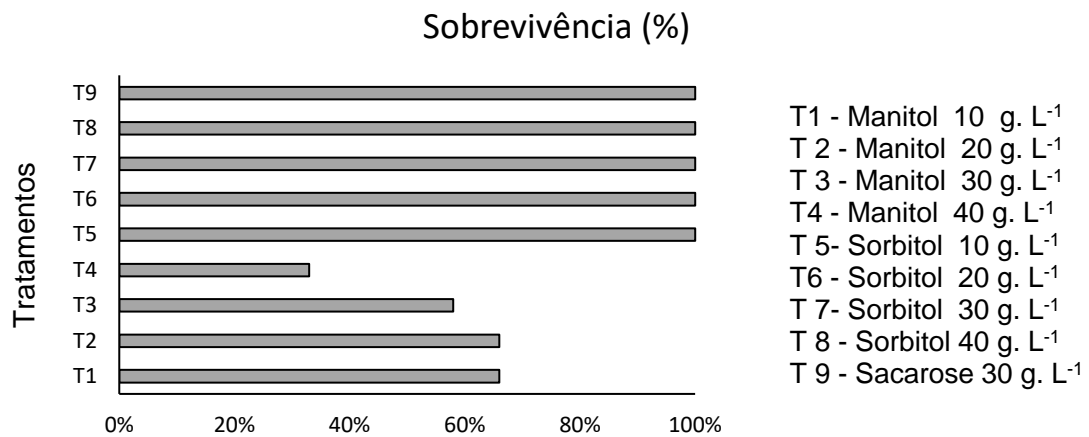
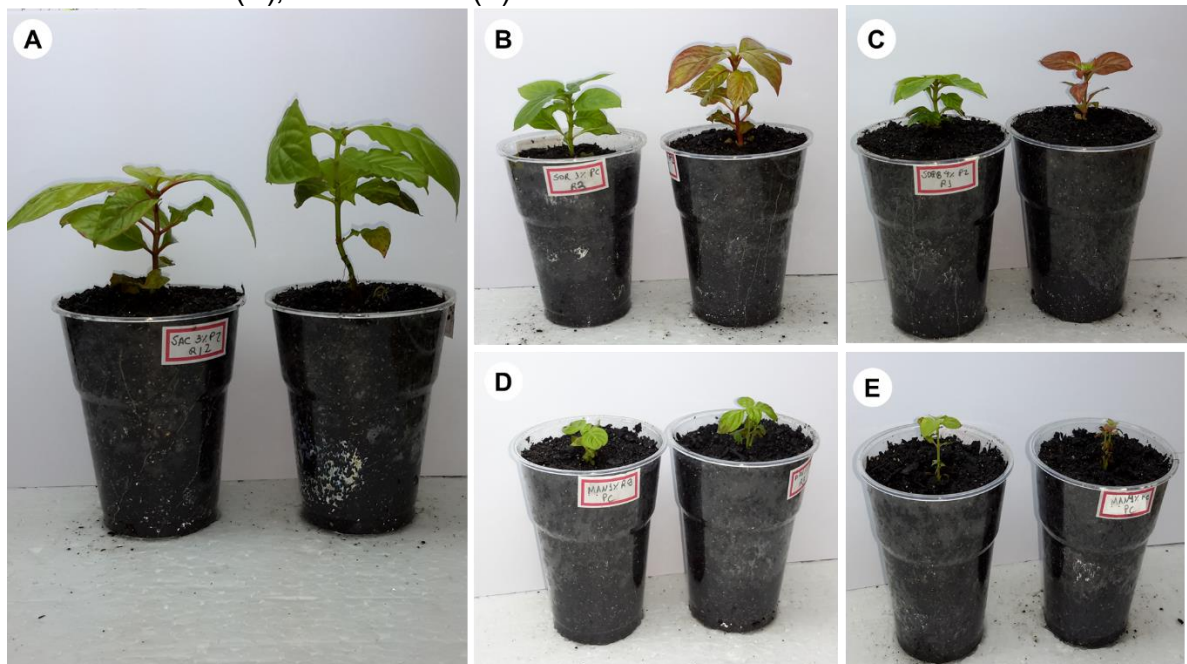


FIGURA 18 – Plantas de *Uncaria. guianensis* regeneradas do tratamento de conservação em sorbitol, manitol e sacarose (testemunha) sob condições de 30 dias de aclimatização. Sacarose (A), sorbitol a 1% (B), sorbitol a 4% (C), manitol a 1% (D), manitol a 4% (E).



5 CONCLUSÕES

O meio MS associado a imersão em óleo mineral é eficiente para redução do crescimento de plantas de *Uncaria guianensis* durante os 120 dias de cultivo.

A temperatura de 15°C quando associada a imersão em óleo mineral retarda o crescimento *in vitro* de microestacas de *Uncaria guianensis* durante 150 dias de cultivo.

Concentrações superiores a 10 g.L⁻¹ de sorbitol restringem o crescimento *in vitro* de microestacas sem afetar o restabelecimento *in vitro* e sobrevivência *ex vitro*.

O manitol causa efeito tóxico na microestaca de *Uncaria guianensis*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. R. da N.; SILVA, C. C. da; ALVES, H. da N. Aspectos socioeconômicos do comércio de plantas e animais medicinais em área metropolitanas do Norte e Nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 181-189, jan. 2008.
- AMOROZO, M. C. de M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 189-203, abr. 2002.
- AQUINO, R. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory active of *Uncaria tomentosa*. **Jornal of Natural Products**, Cincinnati, v. 54, n. 2, p. 453-459, Mar./Apr. 1991.
- ARRIGONI-BLANK, F. de M.; TAVARES, F. F.; BLANK F. A.; SANTOS C. M.; MENEZES, T. S. A.; SANTANA, A. D. D. de. "In Vitro Conservation of Sweet Potato Genotypes." **The Scientific World Journal**, São Paulo, v. 2014, p. 2-7, JAN. 2014
- AUGEREAU, J.M.; COURTOIS, D.; PETIARD, V. Long-term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil overlayer. **Plant Cell Reports**, Gamborg, Denmark, v. 5, n. 5, p.372-376, Oct. 1986.
- BATALHA, M.O; NANTES, J. F. D.; ALCANTARA R. L. C.; CASTRO, D. M.; LOURENZANNI, A. E. B.; MACHADO, J. G.; RIBEIRO, P. M. T. Plantas medicinais no Estado de São Paulo: situação atual, perspectivas e entraves ao desenvolvimento. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v.6, n.15, p. 27-35, ago. 2003.
- BARREIROS, R. C. ADOÇANTES NUTRITIVOS E NÃO-NUTRITIVOS. **Revista da Faculdade de Ciências Médica de Sorocaba**, v. 14, n. 1, p. 5 – 7, jan. 2012.
- BIELACH, A.; DUCLERCQ, J.; MARHSVY, P.; BENKOVA, E. Genetic approach towards the identification of auxin- cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 367, n. 1595, p. 1469-1478, June 2012.
- BOMFIM, G. V. do. **Efeitos de lâminas e frequências de irrigação e tipos e volumes de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental**. 2006. 167 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisa de plantas medicinais da central de medicamentos**, 2006.148 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 2009. 135 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Portal da Saúde (SUS). **Relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME)**, 2013.

- CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochiospermum regium* (schrank) Pllg- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p.184-189, out. 2009.
- CAPLIN, S. M. Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures. **American Journal of Botany**, Connecticut, v. 46, n. 5, p.324-329, May.1959.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: ASCTP/Embrapa-CNPQ, p. 89-164,1998.
- CRANSWICK, A. M.; ZABKIEWICZ, J. A. 1979: Quantitative analysis of monosaccharides, cyclitols, sucrose, quinic and shikimic acids in *Pinus radiata* extracts on a glass support-coated open tubular capillary column by automated gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 171, p. 233-42, 1979.
- CEOLIN, T.; HECK, R.M; BARBIERI, R.L; SCHWARTZ, E.; MUNIZ, R.M.; PILLON, C.N. Plantas medicinais: transmissão do conhecimento nas famílias de agricultores de base ecológica no Sul do RS. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 47-54, mar. 2011.
- CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 19, p.16-21, mar. /abr. 2001.
- DELPRETE, P. G.; C. PERSSON, 2004. Alibertia. In: J. S. STEYERMARK, P. E. BERRY; B. K. HOLST (Eds.): *Flora of the Venezuelan Guayana*: 8: 497-848. **Missouri Botanical Garden Press**, St. Louis, USA.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.47, p.5-16, 2011.
- EDWARDS, G. A., BUELL, C. B.; WESTON, W. H. The influence of mineral oil on the oxygen consumption of *Sordaria fimicola*. **America. Journal. Botany**, v. Connecticut, 34, p. 551-555, Dec. 1947.
- FALKIEWICZ, B.; LUKASIAK, J. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel.] - a review of published scientific literature. **Case Reports and Clinical Practice Revue**, v.2, p.305-316, 2001.
- FARIA G.A. et al. Sucrose and sorbitol effect in the *in vitro* conservation of *Passiflora giberti* NE Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.267-270, 2006.
- FERREIRA, M. A.; CALDAS L. S.; PEREIRA E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. v. 1, p. 21- 43, 1998.
- FLORES B., Y. Propagacion por semilta dela "una de gato" (*Uncaria tomentosa*).

FLORES, R.; ULIANA, C. S.; PIMENTEL, N.; GARLET, B. M. T. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n. 3, p 192 – 199. Aug. 2013.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1, the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

FISHER, R. A. On the mathematical foundations of theoretical statistics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, A, London, v. 222, p. 309-368, 1922.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/ ABCTP, 1990. p. 99-160.

HEITZMAN, M. E.; NETO, C.C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Ethnobotany phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, Dartmouth, Massachusetts, v.66, n 1, p. 5-29, Jan. 2005.

HIRAI, M. Purification and characteristics of sorbitol 6-phosphate dehydrogenase from loquat leaves. **Plant Physiol**, v. 67, p. 221-224, Jan, 1981.

HONÓRIO, I. C. G.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* an agronomic history to be written. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.8, p.1401-1410, ago. 2016.

KOVALCHUK, I.; LYUDVIKOVA, Y.; VOLGINA, M.; REED, B. M. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, n. 2, p. 127-136, Oct. 2008.

LATA, H.; MORAES, R. M.; BERTONI, B.; PEREIRA, A.M.S. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.46, p.22-27, 2010.

LEDO, A. S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA, J. J. F. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia spenciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 989-993, jul./ago. 2007.

LEMOS, E.E.P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileiro**, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.

LI, F.; ZHAO, H.; TIAN R. Characterization of three sorbitol transporter genes in micropropagated apple plants grown under drought stress. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, p.123-130, Dec.2012.

LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; BENITEZ, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre,RS, v. 5, supl.2, p.669-671, jul. 2007.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA,

- A. A. N. *Callus induction in leaf segments of Croton urucurana Baill.* **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 32, n. 1, p.17-32 jan. /fev. 2008.
- LOMBARDI I. I. E ZEVALLOS P. A. 1999. Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*). Editorial Gente Nueva. Santafé de Bogotá, Colômbia, IUCN, v.1. 47p.
- LOESCHER, W.H.; MARLOW, G.C.; KENNEDY, R.A. 1982. Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves **Physiol Plantarum**, Copenhagen, v. 70, p. 335 – 339, Agus, 1982.
- LOESCHER, W.H. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants **Physiol Plantarum**, Copenhagen, v. 70, p. 553 – 557, Agus, 1987.
- LOPEZ-PUC, G. AN EFFECTIVE IN VITRO SLOW GROWTH PROTOCOL FOR CONSERVATION OF THE ORCHID *Epidendrum chlorocorymbos* SCHLTR.. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Cidade do México, v. 16, n. 1, Apr. 2013.
- MARGALHO, L. F.; ROCHA, A. E. S. da; SECCO, R. de S. Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. **Metropolitana de Belém, Pará, Brasil. Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, Ciências Naturais**, Belém, PA, v. 4, n.3, p. 303-339, set./dez. 2009.
- MATHUR. J.; MUKUNTHAKUMAR, S; GUPTA, S. N.; MATHUR, S. N. Growth and morphogenesis of plant tissue cultures under mineral-oil. **Plant Science**, v. 74, n. 2, p. 145-276, nov. 1991.
- MANNONEN, L.; TOIVONEN, L.; KAUPPIENEN, V. Effects of long-term preservation on growth and productivity of *Panax ginseng* and *Catharanthus roseus* cell cultures. **Plant Cell Reports**, Gamborg, Denmark, v.9, n.4, p.173-177, Agus.1990.
- MENDONÇA, L. B.; ANJOS, L. dos. Flower morphology, nectar features, and hummingbird visitation to *Palicourea crocea* (Rubiaceae) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n.1, p. 45-57, 2006.
- MING, L. C.; FERREIRA, M. I.; GONÇALVES, G. G. Pesquisas agronômicas das plantas medicinais da Mata Atlântica regulamentadas pela ANVISA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, p.131-137, mar. 2012.
- MOREIRA, M. A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merril cv. Pérola**. 2001. 81 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2001.
- MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 1, p. 51-63, Dec. 2004.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M. RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.1. p. 110-121, mar. 2012.

NASCIMENTO, M. G. A. **Morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana***. 2007. 42 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- BA.

NEGM, F.B.; LOESCHER W.H. Characterization of aldose 6-phosphate reductase (alditol 6-phosphate: NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves. **Plant Physiol**, v. 67, p.139-142, 1981.

PACHÚ, C. O **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos**. 2009. 10f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2007.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, P. 81, 2001.

PAIVA, A.M.S.; ALOUFA, M.A.I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.3, p.300-304, dez. 2009.

PANIS, B; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (xrops and forest trees. In: RUANE, J.; SONNINO, A. (Ed). **The Role Of Biotechnology**, Villa Gualino, Turin, 2005. p.43-54.

PEREIRA, R. de C. A.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CASTRO, E. M. de; SILVA, F. G. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (unha de gato). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 30, n. 4, p. 637 – 42 jul. /ago. 2006.

PEREIRA, R. de C. A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemer & Schultes DC e *Uncaria guianensis* (Aublet Gmelin) (unha de gato)**. 2004. 186 p. Tese (Doutorado em agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2004.

PEREIRA, G. F. **A família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do alto rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermacoceae**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

PEIXOTO, G. M.; OLIVEIRA de L. C. A.; BLANK, F. A. *In vitro* conservation and leaf anatomy of diferente *Chemotypes of lippia alba* (mill.) N. E. Br. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 33, n. 1, p. 41-51, Jan./Feb. 2017.

- PINHAL, H. F.; ANASTACIO, R. M.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J. da; MORAIS, T. P. de; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jun. 2011.
- PIZA, I. M. de T.; PINHO, R. S. Série: **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. Fundação Cargill, v. 2, p. 179-187, 2002.
- POLLITO, A. P.; LOMBARDI, I.; BERNAL, Y. H. 2000. **Agrotecnología para el cultivo de la uña de gato o bejuco de agua: Fundamentos de agrotecnología para el cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas**. Convenio Andrés Bello/Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Santafé de Bogotá, Colombia.
- RAZDAN, M. K.; COCKING, E. C. **Conservation of plant genetic resources in vitro. Application and limitations**. Enfield: Science Publishers, 200. V. 2, 315 p.
- Ridsdale, C.E. A revision of *Mitragyna* and *Uncaria*. **Blumea**, v.24, n.1, p 43 -100. 1978.
- SANTOS, M. da C.; LEDO, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SILVA JUNIOR. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação in vitro de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, CE, v. 42, n. 3, p 735-741, jul./set.2011.
- PLOUVIER, V. (1963). Distribution of aliphatic polyols and cycHtols. *Chemical Plant Taxonomy* (Ed. by T. Swain), p. 313. New York.
- QUEIROZ, C. M. S. **Hidrogenólise do sorbitol com catalisadores de rutênio: influência das condições de reação e da preparação dos sólidos sobre a formação de glicóis**. 2014. 124 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.
- REDGWELL, R. J. & BIELESKI, R. L. Sorbitol-1-phosphate and sorbitol-6-phosphate in apricot leaves. **Phytocheingmistry**, v. 17, p. 407-409, Jan, 1978.
- ROCA, W. M.; RODRIGUEZ, J.; BELTRAN, J.; ROA, J.; MAFLA, G. Tissue culture for the conservation and international exchange of germplasm. In: FUJIWARA. **Plant Tissue Culture**, v. 23, n.1 p. 771 - 772. 1982.
- SANTOS, R. P. **Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições in vitro**. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- SA, A. de J.; LEDO, A. da S.; LEDO, C. A. da S. Conservação in vitro de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciencencia Rural**, Santa Maria, RS, v. 41, n. 1, p. 57-62, jan. 2011.
- SILVA, R. B. L. e. **A etnobotânica de plantas medicinais da comunidade quilombola de Curiaú, Macapá – AP, Brasil**. 2002. 172 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Departamento de Biologia Vegeta e Fitossanidade, Setor de Agronomia e Biologia Vegetal Tropical, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, 2002.

SILVA, T. L. da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. In vitro conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. Brasília, DF, v.46, n.4, p.384-389, Apr. 2011.

SILVA, N. D. G. DA.; DUTRA, L. F.; BIANCHI, J. V.; SOMMER, L. R.; VARGAS, D. P.; PETERS, J. A. Conservação in vitro de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Pelotas, RS, v. 12, n.1, p. 7-12, 2016.

SILVA, S.M.G. **Reguladores vegetais no desenvolvimento in vitro de bromélia (*Aechmea blanchetiana*)**. 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de concentração: Horticultura. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu- SP.

SIQUEIRA, J.; FREITAS, E. M. de; PERICO, E. Influência de reguladores de crescimento no cultivo in vitro de *Dolichandra unguis-cati* (L) L. G. Lohmann a partir de estacas caulinares. **Iheringia Série Botânica**, Porto Alegre, v. 69, n. 2, p. 341–346, dez. 2014.

SOUSA, P. C. A. de. **Organogênese, embriogênese somática e uso de óleo mineral como estratégias de propagação e conservação in vitro de *Piper aduncum* L. E *Piper hispidinervum* C. DC.** 2013, 75 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Brasília. Brasília, DF, 2013.

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

STEIN, V.C.; BOBROWSKI, V. L.; VARGAS, D. P.; HEIDEN, G. IGAME, J. R. V. Efeito do genótipo na propagação in vitro de *Plantago* sp. **Revista Verde**, v.4, n.2, p.68-75, abr. / jun. 2009.

SHARMA, N.; SATSANGI, R.; PANDEY, R.; SINGH, R.; KAUSHIK, N.; TYAGI, R. K. In vitro conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.111, n.3, p.291-301, Dec. 2012.

SHIBLI, R.D.; SHATNAWI, M.A.; SUBAIH, W.S.; AJLOUNI, M.M. In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.2, p.372-382, 2006.

SKALOVA, I.; VIEHMANNNOVA, I.; VITAMVAS, J. In vitro Conservation of *Smallanthus sonchifolius* under Slow-growth Conditions. **Agricultura tropica et Subtropica**, Praga v.45, p.147-150, 2012.

SHERWINSKI-PEREIRA J.E.; COSTA F.H.S.; CAMILLO J.; SILVA D.B.; ALVES R.B.N.; VIEIRA R.F. Tissue cultures storage of Brazilian medicinal plants germoplasm. **Acta Horticulturae**, v. 860, p. 211-241, 2010.

TORREJÓN, D. G. **Uña de gato y producción sostenible**. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 1997. 138 p.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 5, n. 2, p. 99-114, jun. 1949.

- SHARMA, S.; SHAHZAD, S.; SILVA, J. A. T. Synseed technology: a complete synthesis. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 31, n. 2, p.186-207, Mar./Apr. 2013.
- SHARMA, N.; SATSANGI, R.; PANDEY, R.; SINGH, R.; KAUSHIK, N.; TYAGI, R. K. In vitro conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.111, n.3, p.291-301, Dec. 2012.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. 864 p.
- USPTO, 2015. United States Patent and Trademark Office.
- VALENTE, L.M.M.; BIZZARRI, C. H. B.; LIECHOCKI, S.; BARBOSA, R. S.; PAIXÃO, D. da.; ALMEIDA, M. B. S.; BENEVIDES, P. J. C.; MAGALHÃES, A.; SIANI, A. C. Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its Potential as a Chemical Marker for the Species. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.20, n.6, p.1041-1045, 2009.
- VILCHES, L.E.O. **Género Uncaria-Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de Uncaria tomentosa y Uncaria guianensis**. 3.ed. Lima-Perú: editora, 169 p. 1997.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais: cultivo *in vitro* de vegetais**. UFRPE, Departamento de Química, Laboratório de Pesquisa Cultura de Tecidos Vegetais. 2005.
- Zavala, C. A.; ZEVALLOS-POLLITO, P. A. 1996. Taxonomía, distribución geográfica y status del género *Uncaria* en el Perú. **Facultad de Ciencias Forestales**, Universidade Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 78pp.
- ZEVALLOS-POLLITO; LOMBARDI, I.; BERNAL, H. Y..2000. **Agrotecnología para el cultivo de la uña de gato o bejuco de agua: Fundamentos de agrotecnología para el cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas**. Convenio Andrés Bello/Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Santafé de Bogotá, Colombia. 90pp.
- ZEVALLOS-POLLITO, P. A.; TOMAZELLO FILHO. M. Levantamento e caracterização de duas espécies do gênero *Uncaria schreb.* (Rubiaceae) correntes no Estado do Acre, Brasil. **Ecologia Aplicada**, Lima, v. 9, n.1, jan. 2010.
- ZHANG, Q; ZHAO, J.J.; XU, J.; FENG, F. QU, W. et al. Medicinal uses phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.173, p.48-80, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Resumo da análise de variância do e feito do sistema de cultivo com óleo (CO) e sem imersão (SI) sob os meios de cultura MS, WPM e QL na conservação de microplantas de unha de gato, aos 60 dias de cultivo, tendo como variáveis o número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) números de nó (NN) e raízes secundárias (NRS), em esquema fatorial 3x2 no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Fonte De Variação	GL	Quadrado Médio			
		Características			
		NPFE	TP	NN	NRS
MEIO	2	1,097 ^{ns}	1,581 ^{**}	1,097 ^{ns}	0,541 ^{ns}
SCV	1	12,500 ^{**}	18,605 ^{**}	12,500 ^{**}	1,125 ^{ns}
MEIO x SCV	2	1,041 ^{ns}	0,1266 ^{ns}	1,041 ^{ns}	1,041 ^{ns}
Erro	66	1,118	0,164	1,118	0,978 ^{ns}
Total	71	-	-	-	
CV (%) =		29,07	20,98	29,07	33,44
W (P) =		0,965 [*]	0,960 [*]	0,965 [*]	0,950 ^{**}
B (P) =		2,508 [*]	6,448 [*]	2,508 [*]	4,403 ^{**}

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartlett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. SCV (sistema de cultivo).

APÊNDICE B - Resumo da análise de variância do e feito do sistema de cultivo com óleo (CO) e sem imersão (SI) sob os meios de cultura MS, WPM e QL na conservação de microplantas de unha de gato, aos 120 dias de cultivo, tendo como variáveis o número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) números de nó (NN) e raízes secundárias (NRS), em esquema fatorial 3x2 no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Fonte De Variação	GL	Quadrado Médio			
		Características			
		NPFE	AP	NN	NRS
MEIO	2	0,166 ^{ns}	3,205 ^{**}	0,166 ^{ns}	9,59 ^{**}
SCV	1	10,888 ^{**}	13,090 ^{**}	10,888 ^{**}	1,680 ^{ns}
MEIO x SCV	2	1,555 ^{ns}	3,168 ^{**}	1,555 ^{ns}	3,18 ^{ns}
Erro	66	0,744	0,556	0,744	1,25
Total	71	-	-	-	
CV (%) =		17,55	24,90	17,95	26,26
W (P) =		0,962 [*]	0,957 [*]	0,962 [*]	0,962 [*]
B (P) =		4,099 [*]	12,088 ^{**}	1,989 [*]	4,099 [*]

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartlett (B) sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. SCV (sistema de cultivo).

APÊNDICE C - Resumo da análise de variância do e feito do sistema de cultivo com óleo (CO) e sem imersão (SI) sob os meios de cultura MS, WPM e QL na conservação de microplantas de unha de gato, aos 30 dias de aclimatização, tendo como variáveis número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP), número de nós (NN), diâmetro do caule (DC) e altura da parte aérea (APA), em esquema fatorial 3x2 no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Fonte De Variação	GL	Quadrado Médio				
		Características				
		NPFE	AP	NN	DC (cm)	APA (cm)
MEIO	2	0,227 ^{ns}	8,207 ^{**}	0,227 ^{ns}	0,094 ^{ns}	8,159 ^{**}
SCV	1	17,865 ^{**}	11,846 ^{**}	17,865 ^{**}	0,001 ^{ns}	12,428 ^{**}
MEIO x SCV	2	0,771 ^{ns}	0,518 ^{ns}	0,771 ^{ns}	0,526 ^{ns}	0,636 ^{ns}
Erro	53	1,208	0,765	1,208	0,109	0,749
Total	58	-	-	-	-	-
CV (%)		22,14	21,69	22,14	15,49	21,11
W (P) =		0,951 ^{**}	0,976 [*]	0,958 ^{**}	0,962 [*]	0,960 ^{**}
B (P) =		6,362 [*]	5,591 [*]	5,507 ^{**}	6,362 [*]	8,579 [*]

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartlett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. SCV (sistema de cultivo).

APÊNDICE D - Resumo da análise de variância a interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão, com água e com óleo) e duas temperaturas (25 °C e 15°C) da variável número de pares de folhas expandidas (NPFE), e números de nó (NN) altura da planta (TP) aos 90 dias de cultivo, de microestacas, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		NPFE	NN	AP (cm)
Sistema de Cultivo	2	7,116 ^{**}	7,116 ^{**}	0,312 ^{**}
Temperaturas	1	55,55 ^{**}	55,55 ^{**}	2,520 ^{**}
Acessos	1	41,088 ^{**}	41,088 ^{**}	0,440 ^{**}
SCV x T	2	1,938 ^{ns}	1,938 ^{ns}	0,182 ^{**}
SCV x A	2	2,005 [*]	2,005 [*]	0,059 ^{ns}
A X T	1	0,355 ^{ns}	0,355 ^{ns}	0,084 ^{ns}
SCV x T x A	2	0,672 ^{ns}	0,672 ^{ns}	0,042 ^{ns}
Tratamentos	11	10,950 ^{**}	10,950 ^{**}	0,385 ^{**}
Resíduo	168	0,653	0,653	0,034
Total	179	-	-	-
CV (%) =		29,21	29,21	11,60
W (P) =		0,972 [*]	0,972 [*]	0,979 [*]
B (P) =		14,510 [*]	14,510 [*]	10,023 [*]

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartlett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. SCV (sistema de cultivo), T (temperatura); A (acesso).

APÊNDICE E - Resumo da análise de variância da interação dos fatores sistema de cultivo (sem imersão, com água e com óleo) e duas temperaturas (25 °C e 15°C) da variável número de pares de folhas expandidas (NPFE), e números de nó (NN) altura da planta (AP) aos 150 dias de cultivo, de microestacas, experimento realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		NPFE	NN	AP (cm)
Sistema de Cultivo	2	6,016**	6,016**	0,108*
Temperaturas	1	48,050**	48,050**	0,684**
Acessos	1	34,672**	34,672**	0,180*
SCV x T	2	2,716*	2,716*	0,162**
SCV x A	2	2,005*	2,005*	0,098 ^{ns}
A X T	1	0,050 ^{ns}	0,050 ^{ns}	0,156*
SCV x T x A	2	0,350 ^{ns}	0,350 ^{ns}	0,005 ^{ns}
Tratamentos	11	9,540**	9,540**	0,159**
Resíduo	168	0,654	0,654	0,032
Total	179	-	-	-
CV (%) =		27,12	27,12	10,02
W (P) =		0,966**	0,966**	0,971**
B (P) =		12,055*	12,055*	7,578*

Notas:1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartlett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. SCV (sistema de cultivo), T (temperatura); A (acesso).

APÊNDICE F - Resumo da análise de variância do efeito de agentes osmóticos Manitol e Sorbitol sob a influência de concentrações de 10, 20, 30 e 40 g. L⁻¹, aos 90 dias de cultivo, tendo como variável o número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) e números de nós (NN)), em esquema fatorial 2x4+Testemunha (sacarose) no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Fonte De Variação	GL	Quadrado Médio		
		Características		
		NPFE	AP	NN
Agentes osmóticos	1	36,260**	1,020**	36,260**
Concentrações	3	0,843 ^{ns}	0,176**	0,843 ^{ns}
AGO X COM	3	0,315 ^{ns}	0,034 ^{ns}	0,315 ^{ns}
Fatorial X Test (Sacarose)	1	49,590**	0,900**	49,59**
Tratamentos	8	11,160**	0,319**	11,160**
Resíduo	99	0,663	0,072	0,663
Total	107	-	-	-
CV (%) =		23,27	12,58	23,27
W (P) =		0,964**	0,963**	0,964**
B (P) =		9,855*	14,501*	9,855*

Notas:1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartlett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. AGO (agentes osmóticos), CON (concentrações); Test (testemunha).

APÊNDICE G - Resumo da análise de variância do efeito de agentes osmóticos Manitol e Sorbitol sob a influência de concentrações de 10, 20, 30 e 40 g, L⁻¹, aos 150 dias de cultivo, tendo como variável o número de pares de folhas expandidas (NPFE), altura da planta (AP) e números de nós (NN), em esquema fatorial 2x4+Testemunha (sacarose) no delineamento inteiramente casualizado, realizado em sala de crescimento, Rio Branco, UFAC, 2016.

Fonte De Variação	GL	Quadrado Médio		
		Características		
		NPFE	AP	NN
Agentes osmóticos	1	45,375**	8,430**	45,375**
Concentrações	3	0,902*	0,531 ^{ns}	0,902*
AGO X COM	3	0,513 ^{ns}	1,259 ^{ns}	0,513 ^{ns}
Fatorial X Test (Sacarose)	1	24,671**	19,771**	24,671**
Tratamentos	8	9,287**	2,688**	9,287**
Resíduo	99	0,487	0,126	0,487
Total	107	-	-	-
CV (%) =	-	15,29	11,65	15,29
W (P) =		0,969**	0,975**	0,969**
B (P) =		4,578**	17,746*	4,578**

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$).

2. Teste de normalidade de Shapiro – Wilk (W) e para homogeneidade o de Bartlett (B), sendo que * significativo a 5% ($p > 0,05$); ** significativo a 1% ($p > 0,01$).

3. AGO (agentes osmóticos), CON (concentrações); Test (testemunha).