


CLARICE SALES MORAES DE SOUZA PEDROSA



**ANÁLISE DA GERMINAÇÃO, REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO E
QUALIDADE DO PERFIL FITOQUÍMICO DE *Uncaria guianensis*
CULTIVADA *IN VITRO***

RIO BRANCO - AC

2019

CLARICE SALES MORAES DE SOUZA PEDROSA

**ANÁLISE DA GERMINAÇÃO, REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO E
QUALIDADE DO PERFIL FITOQUÍMICO DE *Uncaria guianensis*
CULTIVADA *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico H. da S. Costa

RIO BRANCO - AC

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

P372a Pedrosa, Clarice Sales Moraes de Souza, 1983-

Análise da germinação, regulação do crescimento e qualidade do perfil fitoquímico de *Uncaria guianensis* cultivada *in vitro* / Clarice Sales Moraes de Souza Pedrosa; orientador Dr. Frederico H. da S. Costa. – 2019.

116 f.: il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Rio Branco, 2019.

Incluem referências bibliográficas, apêndices e anexos.

1. Unha - de - gato. 2. 6 - Benzilaminopurina. 3. Plantas medicinais. I. Costa, Frederico H. da S. (Orientador). II. Título.

CDD: 338.1

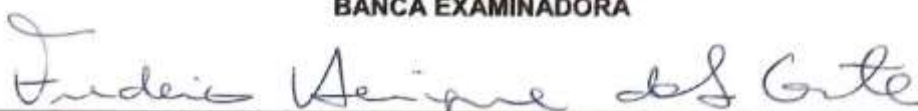
CLARICE SALES MORAES DE SOUZA PEDROSA

**ANÁLISE DA GERMINAÇÃO, REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO E QUALIDADE
DO PERFIL FITOQUÍMICO DE *Uncaria guianensis* CULTIVADA *IN VITRO***

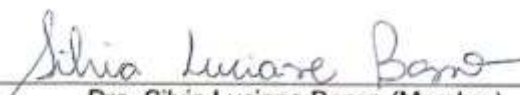
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

APROVADA em 30 de outubro de 2019.

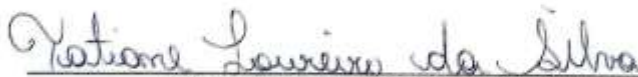
BANCA EXAMINADORA



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



Dra. Silvia Luciane Basso (Membro)
Centro Universitário Uninorte



Dra. Tatiane Loureiro da Silva (Membro)
Instituto Federal do Acre



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



Dra. Bêrenice Kussumoto de Alcântara da Silva (Membro)
Universidade Federal do Acre

Aos meus pais

Maria Adileusa Sales de Lima e Lincoln Moraes de Souza (*in memoriam*)

Ao meu esposo e filho

Weydson Luiz Pedrosa da Silva e Miguel Moraes e Pedrosa

Pelo apoio, segurança emocional e compreensão durante o curso de doutorado.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela possibilidade e oportunidade de realizar este trabalho com perseverança e dedicação.

Ao meu pai Lincoln (*in memoriam*) pelo incentivo e apoio durante a minha vida de estudante.

As minhas melhores amigas Maria Adileusa Sales (mãe) e Beatriz Sales (avó), por ser o alicerce da minha vida, transmitindo-me sempre conhecimentos, sabedorias e orações.

Ao meu esposo Weydson Luiz, que vem me apoiando desde a graduação, acreditando sempre em mim, transmitindo o seu amor, com paciência e dedicação.

A Universidade Federal do Acre e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, por ter contribuído na minha formação acadêmica.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento do projeto de pesquisa, a partir do processo nº 408296/2013-5 (chamada MCTI/CNPq/CT- Amazônia Nº 77/2013).

Ao Prof. Dr. Frederico Henrique da Silva Costa pela orientação e suporte para a condução da pesquisa.

A Profa. Dra. Rita Nunomura pela disponibilidade de tempo e o recebimento em seu laboratório para a realização das análises químicas das plantas.

A Roger Ventura e Nadja Rayad pela disponibilidade de tempo, paciência e transferência de conhecimentos em estatística.

A Érica Lima e Yrle Fontenelle pela amizade construída antes da pós-graduação, durante e agora ao longo da vida.

As amigadas construídas e os apoios doados durante a realização da pesquisa no laboratório de propagação de plantas *in vitro*, como Nadja Rayad, John Douglas, João Bosco, Roger Ventura, Márcio Chaves, Letícia, Janai Albuquerque, Camilla Mendes, Janaína, quero deixar os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas da turma 2015 que compartilharam comigo momentos especiais de aprendizado durante as disciplinas.

A todas as pessoas que conheci durante este período, que me proporcionaram conhecimentos novos, gestos de amizade e transferência de energias positivas para a concretização deste sonho de me tornar Doutora em Produção Vegetal.

Luz do sol,
Que a folha traga e traduz,
Em verde novo
Em folha, em graça, em vida, em força, em luz...

Caetano Veloso

RESUMO

A ausência de técnicas de propagação e a obtenção extrativista da matéria-prima são os principais fatores de erosão genética e perda do potencial econômico de espécies medicinais nativas do bioma Amazônico. Como alternativa, métodos biotecnológicos são aplicados visando à padronização dos constituintes químicos e estabelecimento de plantios regulamentados. Nesse contexto, esta pesquisa teve por objetivo a análise da germinação, regulação do crescimento e avaliação da qualidade do perfil fitoquímico de *Uncaria guianensis* cultivada *in vitro*. Para tanto, três experimentos foram realizados. No primeiro ensaio, foi realizada a análise da germinação de sementes em função da planta matriz e da formulação do meio de cultura. No experimento 2, foram avaliados a fonte de luz e concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) como fatores de regulação do crescimento *in vitro* e sua influência no perfil fitoquímico. Por fim, o terceiro experimento objetivou estudar os efeitos do ácido salicílico (AS) no crescimento e qualidade do perfil fitoquímico das plantas cultivadas *in vitro*. De acordo com os resultados obtidos, todos os fatores estudados influenciaram significativamente a propagação *in vitro* de *U. guianensis*. Houve efeito ($p < 0,05$) das matrizes e formulações de meios nas variáveis da análise de germinação das sementes, bem como no crescimento e formação das plantas. Para a etapa de multiplicação, a suplementação do meio de cultura com BAP aumentou o número e tamanho de brotações, enquanto o uso de luz tubular fluorescente branca proporcionou resultados superiores. Quanto ao perfil cromatográfico, plantas cultivadas *in vitro* tiveram maior presença de picos comparado à planta matriz, independente da concentração de BAP. A adição de ácido salicílico ao meio de cultura influenciou negativamente o crescimento das plantas, porém não causou modificações na qualidade do perfil fitoquímico. O AS pode ser utilizado para regulação do crescimento *in vitro* de unha-de-gato visando à manutenção de germoplasma.

Palavras-chave: Unha-de-gato. 6-Benzilaminopurina. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The absence of propagation techniques and extraction of raw materials are the main factors of genetic erosion and loss of economic potential of medicinal species native to the Amazon biome. As an alternative, biotechnological methods are applied with a view to standardizing chemical constituents and establishing regulated plantations. In this context, this research aimed to analyze the germination, growth regulation and quality evaluation of the phytochemical profile of *Uncaria guianensis* grown *in vitro*. For this, three experiments were carried out. In the first test, the analysis of seed germination was performed according to the matrix plant and the formulation of the culture medium. In experiment 2, the light source and concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) were evaluated as growth regulation factors *in vitro* and their influence on the phytochemical profile. Finally, the third experiment aimed to study the effects of salicylic acid (AS) on the growth and quality of the phytochemical profile of plants grown *in vitro*. According to the results obtained, all factors studied significantly influenced the *in vitro* propagation of *U. guianensis*. There was an effect ($p < 0.05$) of the matrices and media formulations on the variables of the analysis of seed germination, as well as on the growth and formation of plants. For the multiplication step, supplementation of the culture medium with BAP increased the number and size of shoots, while the use of white fluorescent tubular light provided superior results. As for the chromatographic profile, plants grown *in vitro* had a higher presence of peaks compared to the parent plant, regardless of BAP concentration. The addition of salicylic acid to the culture medium negatively influenced the growth of the plants, but did not cause changes in the quality of the phytochemical profile. AS can be used to regulate *in vitro* growth of cat's claw to maintain germplasm.

Keywords: Cat's claw. 6-Benzylaminopurine. Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	(A) Inflorescência (B) infrutescência seca (C) sementes (D) folhas secas e (E) caule principal e ramos secundários, Rio Branco, Acre, 2019.....	22
FIGURA 2	Localização das matrizes de <i>U. guianensis</i> utilizadas na pesquisa, Rio Branco, Acre, 2019.....	35
FIGURA 3	Etapas da metodologia descrita no processo de desinfestação das sementes de <i>U. guianensis</i> , sob condições assépticas: (A) capela de fluxo laminar horizontal; (B) sementes imersas em agentes desinfetantes sob agitador magnético e (C) sementes em placa de Petri logo após a retirada dos resíduos, Rio Branco, Acre, 2019.....	36
FIGURA 4	Etapas da metodologia utilizada da pré-aclimatização e aclimatização das plantas de <i>U. guianensis</i> : (A) transferência de tubos para os copos; (B) acondicionamento na pré-aclimatização; (C) sete dias após a pré-aclimatização e (D) aclimatização em estufa, Rio Branco, Acre, 2019.....	40
FIGURA 5	(A) Planta de <i>U. guianensis</i> aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , submetida ao meio WPM (B) Segmento caulinar da planta com um par de gemas axilares.....	41
FIGURA 6	Fontes de luz utilizadas para o cultivo <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> na indução de brotações, em sala de crescimento, UFAC, RIO BRANCO, 2019.....	42
FIGURA 7	Distribuição das curvas espectrais em resposta relativa das lâmpadas LED's e lâmpadas fluorescentes, adaptado de BELLO-BELLO <i>et al.</i> , 2017.....	42
FIGURA 8	Etapas da metodologia utilizada na separação das amostras dos tratamentos para purificação dos extratos (<i>clean-up</i>), Manaus, Amazonas, 2019	47
FIGURA 9	Eventos do processo germinativo de sementes de <i>U. guianensis</i> (A) intumescimento; (B) rompimento do envoltório; (C) rompimento do tegumento pela protusão da radícula; (D) pigmentação; (E) curvatura do hipocótilo, Rio Branco, Acre, 2019.....	49
FIGURA 10	Frequência relativa da germinação (FRGS) <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> das três amostras submetidas nas formulações de meios de cultivo, Rio Branco, Acre, 2019.....	54

FIGURA 11	Número de brotações (NB) em cada concentração do BAP, no primeiro subcultivo, a partir de segmentos nodais de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	59
FIGURA 12	Tamanho da maior brotação (TMB) em cada concentração de BAP, no primeiro subcultivo a partir de segmentos nodais de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	60
FIGURA 13	Número de brotações (NB) de <i>U. guianensis</i> em cada concentração de BAP, no segundo subcultivo, a partir de segmento nodais, Rio Branco, Acre, 2019.....	61
FIGURA 14	Tamanho da maior brotação (TMB) em concentrações de BAP, no segundo subcultivo, a partir de segmentos nodais de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	62
FIGURA 15	Plantas de <i>U. guianensis</i> restabelecidas, após dois subcultivos de 60 dias com a presença do BAP em diferentes fontes de luz Rio Branco, Acre, 2019.....	69
FIGURA 16	Plantas de <i>U. guianensis</i> oriundas de propagação <i>in vitro</i> , e posterior aclimatização em mini estufa da UFAC, Rio Branco, Acre, 2019.....	70
FIGURA 17	Perfil cromatográfico comparativo das folhas de <i>U. guianensis</i> (matriz) e das cultivadas <i>in vitro</i> sob efeito de concentrações de BAP, Rio Branco, Acre, 2019.....	72
FIGURA 18	Explantos das plantas de <i>U. guianensis</i> cultivados sob efeito de ácido salicílico (μM) <i>in vitro</i> aos 60 dias de estabelecidas, Rio Branco, Acre, 2019.....	76
FIGURA 19	Altura da parte aérea (APA) dos explantes em função das concentrações de ácido salicílico (AS), aos 60 dias de cultivo, Rio Branco, Acre, 2019.....	77
FIGURA 20	Porcentagem de enraizamento dos tipos de explantes em função das concentrações de ácido salicílico (AS) aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	77
FIGURA 21	Perfil cromatográfico comparativo das folhas de uma planta matriz (M) de <i>U. guianensis</i> e das cultivadas <i>in vitro</i> sob efeito de tratamentos com AS após a aclimatização, Rio Branco, Acre, 2019.....	80
FIGURA 22	Plantas de <i>U. guianensis</i> oriundas de propagação <i>in vitro</i> com AS (μM), e posterior aclimatização em mini estufa da UFAC, Rio Branco, Acre, 2019.....	84

FIGURA 23 Perfil cromatográfico comparativo das folhas de uma planta matriz (M) de *U. guianensis* e das cultivadas *in vitro* sob efeito de tratamentos com AS após a aclimatização, Rio Branco, Acre, 2019.....

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Triagem fitoquímica dos picos semelhantes dos extratos alcoólicos das folhas de <i>U. guianensis</i> de planta de campo com as cultivadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	73
QUADRO 2	Triagem fitoquímica dos picos semelhantes dos extratos alcoólicos das folhas de <i>U. guianensis</i> de planta de campo com as cultivadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	81
QUADRO 3	Composição inorgânica e orgânica do meio WPM (Lloyd, McCown, 1980) e MS (Murashige; Skoog, 1946) utilizadas no experimento 1, Rio Branco, Acre, 2019.....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Germinabilidade (G) das sementes dentro das formulações de meios para o cultivo <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	50
TABELA 2	Tempo médio de germinação (TMG) das formulações de cultivo <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	51
TABELA 3	Coefficiente de Velocidade de Germinação (CVG) de <i>U. guianensis</i> submetidas a formulações de meios de cultivo <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	52
TABELA 4	Índice de Velocidade de Emergência (VE) de <i>U. guianensis</i> em função da formulação de meios de cultura e matrizes cultivadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	53
TABELA 5	Altura da parte aérea (APA) em função de matrizes e formulações de meios de cultivo, aos 90 dias de plantas estabelecidas de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	55
TABELA 6	Número de pares de folhas expandidas (NPFE) das plantas de <i>U. guianensis</i> em formulações dos meios de cultivo, aos 90 dias de cultivo <i>ex vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	56
TABELA 7	Altura da parte aérea (APA) das plantas de <i>U. guianensis</i> , aos 30 dias de aclimatização em casa de vegetação, UFAC, Rio Branco, Acre, 2019.....	57
TABELA 8	Número de pares de folhas expandidas (NPFE) de <i>U. guianensis</i> , aos 30 dias de aclimatização em casa de vegetação, Rio Branco, Acre, 2019.....	57
TABELA 9	Número de brotações (NB) de <i>U. guianensis</i> , no segundo subcultivo a partir de segmentos nodais, Rio Branco, Acre, 2019.....	60
TABELA 10	Tamanho da maior brotação (TMB) de <i>U. guianensis</i> , no segundo ciclo de multiplicação, Rio Branco, Acre, 2019.....	61
TABELA 11	Clorofila a (Chl a) e total nos tipos de luz em concentrações de BAP no primeiro subcultivo <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	66
TABELA 12	Clorofila b (Chl b) nos tipos de luz e nas concentrações de BAP no primeiro subcultivo <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	67

TABELA 13	Clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), total e carotenóides (Car.) nas concentrações de BAP no segundo subcultivo <i>in vitro</i> de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	68
TABELA 14	Número de pares de folhas expandidas (NPFE), avaliadas após a aclimatização de plantas de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	71
TABELA 15	Massa seca da parte aérea (MSPA) de <i>U. guianensis</i> aos 37 dias de aclimatização, oriundas do cultivo <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	71
TABELA 16	Clorofila a (Chl a) e clorofila total (mg.g ⁻¹ de MF) dos explantes de <i>U. guianensis</i> , em função das concentrações de ácido salicílico aos 60 dias de cultivo. Rio Branco, Acre, 2019.....	78
TABELA 17	Altura da parte aérea (APA) das plantas aclimatizadas de <i>U. guianensis</i> aos 30 dias em casa de vegetação, Rio Branco, Acre, 2019.....	82
TABELA 18	Massa fresca da raiz (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) de plantas aclimatizadas de <i>U. guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	83

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A	Pressupostos e resumo da análise de variância da germinabilidade (G), tempo médio (TM), Coeficiente de velocidade de germinação (CVG), Velocidade de emergência (VE), índice de sincronização de germinação ou incerteza ($flog_2fi$) de sementes de <i>Uncaria guianensis</i> , de três matrizes e cinco tipos de formulações de meios de cultivo, UFAC, Rio Branco, 2019.....	107
APÊNDICE B	Pressupostos e resumo da análise de variância de <i>Uncaria guianensis in vitro</i> , das variáveis altura da parte aérea (APA) e número de pares de folhas expandidas (NPFE) de três matrizes e cinco tipos de formulações de meios de cultivo, Rio Branco, Acre, 2019.....	107
APÊNDICE C	Pressupostos e resumo da análise de variância de <i>Uncaria guianensis</i> aos 30 dias de aclimatização, das variáveis altura da parte aérea (APA) e número de pares de folhas expandidas (NPFE), de três matrizes e cinco tipos de formulações meios de cultivo, Rio Branco, Acre, 2019.....	108
APÊNDICE D	Pressupostos e resumo da análise de variância para o número de brotações (NB) e tamanho da maior brotação (TMB), avaliados no primeiro subcultivo de <i>Uncaria guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	108
APÊNDICE E	Pressupostos e resumo da análise de variância para os pigmentos fotossintetizantes (Chl a, Chl b, total e carotenóides), avaliados no primeiro subcultivo de <i>Uncaria guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	109
APÊNDICE F	Pressupostos e resumos da análise de variância para o número de brotações (NB) e tamanho da maior brotação (TMB), avaliados no segundo subcultivo de <i>Uncaria guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	109
APÊNDICE G	Pressupostos e resumo da análise de variância dos pigmentos fotossintetizantes (Chl a, Chl b, total e carotenóides), avaliados no segundo subcultivo de <i>Uncaria guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	110
APÊNDICE H	Pressupostos e resumo da análise de variância do restabelecimento de <i>Uncaria guianensis</i> cultivada em meio básico aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	110

APÊNDICE I	Pressupostos e resumo da análise de variância da aclimatização de <i>Uncaria guianensis</i> em casa de vegetação, das variáveis altura da parte aérea (APA), tamanho das raízes (TR), número de pares de folhas expandidas (NPFE), massa fresca da parte aérea (MSPA), massa fresca das raízes (MFR) e massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR) e massa seca total (MST), aos 37 dias de cultivo <i>ex vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	111
APÊNDICE J	Pressupostos e resumo da análise de variância da altura da parte aérea (APA) de <i>Uncaria guianensis</i> , avaliados aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> de plantas submetidas ao AS, Rio Branco, Acre. 2019.....	111
APÊNDICE K	Pressupostos e resumo da análise de variância dos pigmentos fotossintetizantes (Chl a, Chl b, total e carotenóides), avaliados aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	112
APÊNDICE L	Pressupostos e resumo da análise de variância do subcultivo dos explantes de <i>Uncaria guianensis</i> sob efeito do AS aos 60 dias no meio WPM, das variáveis altura da parte aérea (APA) e número de pares de folhas expandidas (NPFE), Rio Branco, Acre, 2019.....	112
APÊNDICE M	Pressupostos e resumo da análise de variância da aclimatização de <i>Uncaria guianensis</i> em casa de vegetação, das variáveis altura da parte aérea (APA), tamanho das raízes (TR), número de pares de folhas expandidas (NPFE), massa fresca da parte aérea (MSPA), massa fresca das raízes (MFR) e massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR) e massa seca total (MST), aos 37 dias de cultivo <i>ex vitro</i> , Rio Branco, Acre, 2019.....	113

LISTA DE SIMBÓLOS E ABREVIATURAS

AS Ácido Salicílico
APA Altura da parte aérea
BAP 6- Benzilaminopurina
HPLC High Performance liquid chromatography
MS Murashige e Skoog
m/z Razão massa sobre carga
NPFE Número de pares de folhas expandidas
MFPA Massa fresca da parte aérea
MFR Massa fresca da raiz
MFT Massa fresca total
MSPA Massa seca da parte aérea
MSR Massa seca da raiz
MST Massa seca total
PC Parque Chico Mendes
PZ Parque Zoobotânico
SM Sena Madureira
TMB Tamanho da maior brotação
TR Tamanho de raiz
UFAC Universidade Federal do Acre
WPM Wood Plant Medium
UV Ultra violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 <i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J. F.Gmell.....	20
2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....	23
2.2.1 Germinação <i>in vitro</i>	24
2.2.2 Micropropagação.....	25
2.2.3 Citocininas.....	27
2.3 FOTOMORFOGÊNESE.....	28
2.4 ELICITOR (ÁCIDO SALICÍLICO) - AS.....	30
2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	35
3.2 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES.....	36
3.3 EXPERIMENTO 1.....	37
3.4 EXPERIMENTO 2.....	40
3.5 EXPERIMENTO 3.....	43
3.6 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	45
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 EXPERIMENTO 1.....	49
4.2 EXPERIMENTO 2.....	58
4.3 EXPERIMENTO 3.....	76
5 CONCLUSÕES	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
APÊNDICES.....	106
ANEXO.....	114

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais por comunidades tradicionais constitui a base do tratamento de enfermidades. Como consequência, ainda é observada maior conservação de espécies vegetais em países sob estado de desenvolvimento (HONÓRIO *et al.*, 2016). Além disso, a presença de florestas tropicais nesses lugares favorece o uso *in natura* das plantas com potencial terapêutico em pesquisas científicas, tecnológicas e na manipulação de medicamentos (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

O Brasil detém de uma infinidade de plantas que servem de matéria-prima para a produção de fitofármacos – especificamente espécies nativas da região Amazônica. No entanto, a obtenção predatória dos insumos vegetais e à falta de tecnologias de cultivo acarretam em erosão genética e redução da diversidade das espécies. Segundo Simões e colaboradores (2017) muitos insumos para manipulação de fármacos são conseguidos pela coleta extrativista, resultando no surgimento de componentes químicos diferentes, de plantas que são morfologicamente semelhantes.

Dessa forma, um dos principais desafios é realizar plantios regulamentados de espécies medicinais, evitando-se assim o extrativismo e a variação dos perfis bioquímicos (Poulev *et al.*, 2003). Todavia, para obter cultivos regularizados de algumas plantas são necessários ciclos de exploração econômica, iniciando-se por estudos da matéria-prima; análise da ocorrência de um limite dos recursos naturais; e, por fim, o esgotamento do recurso e a necessidade de inserção de tecnologias de domesticação.

Associado à necessidade de plantios regulamentados, a inclusão de algumas plantas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) justifica a pesquisa e desenvolvimento científicos. O principal objetivo desse programa foi priorizar o uso de espécies com potencial curativo, direcionando os conhecimentos regionais adquiridos, valorizando as práticas de consumo e o resgate de múltiplos usos das mais diversas cadeias produtivas (SANTOS *et al.*, 2011).

Entre as espécies de importância farmacológica e comercial, presentes na região Amazônica e na América Central, estão incluídas a *Uncaria guianensis* e a *Uncaria tomentosa*. Ambas diferenciam-se quanto ao tipo de composto químico

produzido, à citogenética, ao sequestro de radicais livres, à proteção contra a desoxirribose, ao inibidor de peroxidação lipídica e à supressão de fator de necrose tumoral (TNF- α) (TEPPNER *et al.*, 1984; SANDOVAL *et al.*, 2002; GATTUSO *et al.*, 2004; VALENTE, 2006; ZEVALLOS POLLITO; TOMAZELLO, 2010).

A *Uncaria guianensis* possui efeito anti-inflamatório no sistema imunológico, através da produção dos constituintes químicos, como os alcaloides oxindólicos e indólicos, os glicosídeos, os terpenos e os taninos (URDANIBIA; TAYLOR, 2018). Porém, a espécie *U. guianensis* possui menos estudos científicos, 25 artigos entre 1983-2014 nas bases de dados da PUBMED e Scielo (Honório *et al.*, 2018). Outra limitação associada à *Uncaria* consiste na ausência de métodos de propagação eficientes e seus efeitos no perfil fitoquímico das plantas produzidas.

Como alternativa aos métodos tradicionais, a aplicação de técnicas biotecnológicas consiste de espécies medicinais é cultura de células e órgãos vegetais (MURTHY *et al.*, 2014): uma linha de pesquisa atrativa que contribui com informações relevantes para a produção em plantios regulamentados.

Diante do potencial terapêutico e ausência de estudos agrônômicos, o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas constitui uma importante estratégia para reprodução, plantio e padronização fitoquímica de *Uncaria guianensis*. Esta pesquisa teve por objetivo a análise da germinação, regulação do crescimento e avaliação da qualidade do perfil fitoquímico de *Uncaria guianensis* cultivada *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Ao longo do processo de domesticação, as espécies utilizadas como fonte de energia foram inicialmente mais valorizadas comparadas às plantas medicinais. Como consequência, o desenvolvimento de métodos eficientes de propagação visando à reprodução e manutenção das propriedades medicinais passou a ser prioritário (ZAYOVA *et al.*, 2013). A justificativa é que o crescimento vegetal, a quantidade e a qualidade dos componentes químicos, bem como a interação com outras espécies (PIRBALOUTI *et al.*, 2019), são influenciados por fatores genéticos, quimiotipo, manejo agrônomo, fatores ecológicos e ambientais.

2.1 *Uncaria guianensis* (Aubl) J. F. Gmel.

Identificada em 1775 nas Guianas como *Orouparia guianensis* (Aubl.), a espécie utilizada na presente pesquisa, foi modificada como *Uncaria guianensis* após 20 anos (VILCHES, 1997). Sua divulgação científica é atribuída ao professor Arturo Brell, quando se interessou pela cultura indígena em 1930 e a compartilhou com os etnologistas Klaus Keplinger e Luis Oscar Schuler em 1960, dando início a produção de medicamentos fitoterápicos (VALENTE, 2006).

A classificação taxonômica foi realizada por Cronquist em 1981, conforme abaixo:

- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Subclasse: Asteridae
- Ordem: Rubiales
- Família: Rubiaceae
- Gênero: *Uncaria*

O gênero *Uncaria* é representado por 60 espécies distribuídas em regiões da África e Ásia, sendo *U. guianensis* encontrada entre as coordenadas 08°04'00" N-17°32'00" S e 44°56'00" W-78°25'42" W e em altitudes de 7-1.010 m. Essa espécie ocorre na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. No Brasil, é reportada no Acre, Amazônia, Amapá, Maranhão,

Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (PEREIRA; LOPES, 2006; HONÓRIO *et al.*, 2016).

A germinação é caracterizada como epígea, com a radícula primária axonomórfica, branca, longa, e com raízes secundárias, longas e ramificadas. O hipocótilo é cilíndrico, três-quatro milímetros de comprimento e um milímetro de diâmetro. O epicótilo é ligeiramente quadrangular – ambas as estruturas são glabras e brancas avermelhadas (ZEVALLOS POLLITO; FLORES BENDEZÚ, 2003).

Os cotilédones dessas plantas formam-se em pares, opostos e foliáceos. O pecíolo possui um-dois mm de comprimento, branco esverdeado. Folha inteira, ovalada, 2-2,5 mm de comprimento por 1,5-1,8 mm de largura, obtuso ou arredondada no vértice, de base arredondada ou pecíolo estreitamente truncado, com a nervura central dificilmente visível. Ambas as faces verdes claros e glabros (ZEVALLOS POLLITO; FLORES BENDEZÚ, 2003).

Segundo Zevallos Pollito e Tomazello Filho (2010), essa espécie possui estípulas interpeciolares, em forma de garra, estrutura que a caracterizou em alguns países como o nome unha-de-gato. De acordo com os mesmos autores, as flores são andróginas, com frutos do tipo cápsula septícida e elipsoide.

As sementes são do tipo fusiformes, aladas, com asas membranáceas, com uma extremidade linear e a outra em duas líneas, de tamanho em 5 a 8 mm, de modo que um milhão de sementes possui em média 5-7 quilogramas (QUEVEDO, 1995; ZEVALLOS POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2010).

Com relação a viabilidade de suas sementes, não foi encontrado na literatura menção sobre o período de armazenamento, mas pesquisas realizadas com a *Uncaria tomentosa* revelaram que suas sementes obtiveram sucesso na germinação por 12 meses em câmara fria (10 °C) (SILVA, 2010).

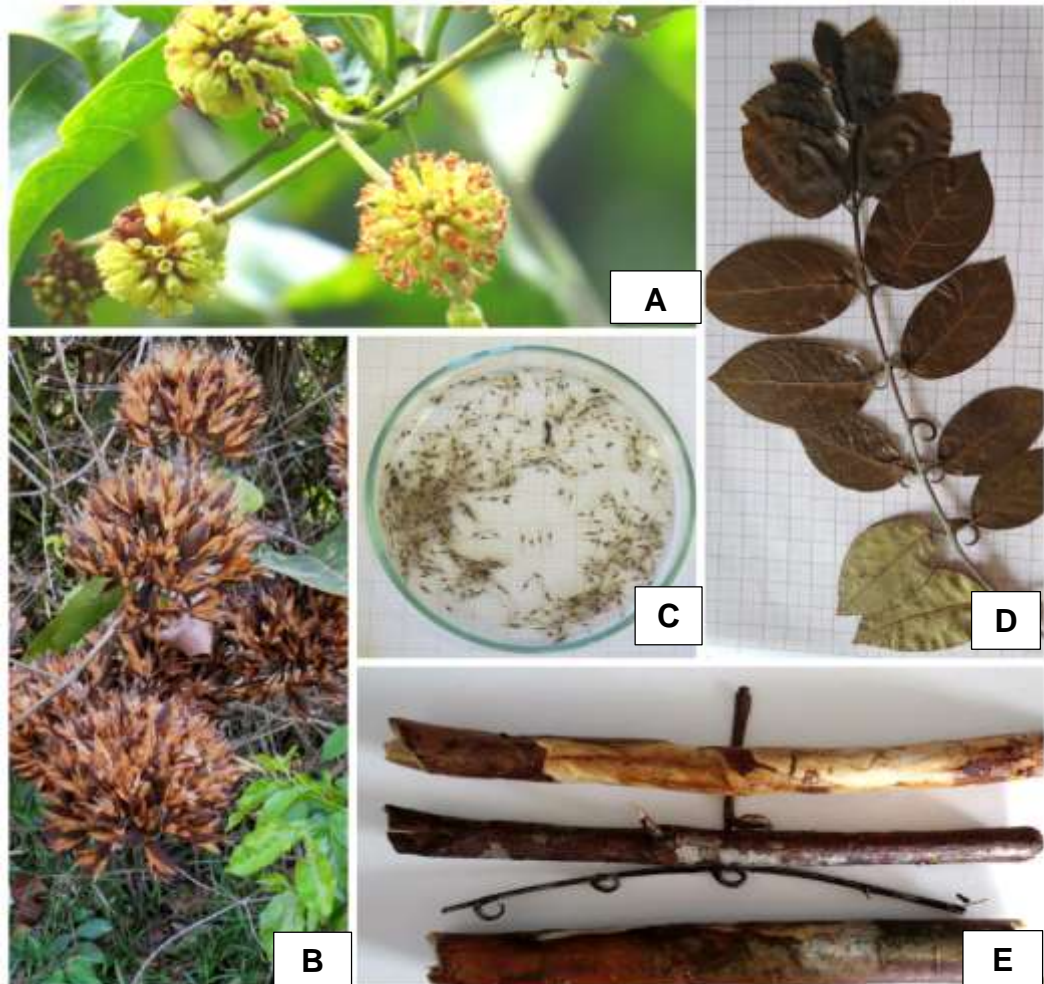
As inflorescências são do tipo glomérulo axilares, pedunculados, com flores amareladas (LORENZI; MATOS, 2008). É caracterizada como lianas lenhosas ou arbustos rasteiros, caule cilíndrico, podendo atingir 20 metros de comprimento e 10 centímetros de diâmetro (ZEVALLOS POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2010).

A superfície externa do caule é marrom, fibrosa, fissurada, cor de canela com estriamento longitudinal, parcialmente laminar e resistente. A casca interna é cor ouro parda ou vermelho-amarelada, laminar-fibrosa, possuindo uma secreção aquosa, adstringente (GATTUSO *et al.*, 2004; ZEVALLOS-POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2010).

Na Amazônia sul ocidental, a floração ocorre de maio a julho, a frutificação de julho a agosto e a maturação dos frutos e dispersão das sementes de agosto a outubro (RAPOSO *et al.*, 2010). Por ser uma espécie tipicamente de clima tropical e subtropical úmido, ela possui hábito de crescimento favorável em florestas secundárias, margens de rios ou estradas, com fototropismo positivo e percentagem de iluminação que não precisa ser excessiva – um local onde há abertura de luz na copa é o suficiente (CANALES-SPRINGETT *et al.*, 2013).

Conforme a descrição botânica, as estruturas vegetativas e reprodutivas da *Uncaria guianensis* podem ser visualizadas na Figura 1.

FIGURA 1 - (A) Inflorescência (B) infrutescência seca (C) sementes (D) folhas secas e (E) caule principal e ramos secundários, Rio Branco, Acre, 2019



Fonte: autoria própria (2019).

Essa espécie possui elevada capacidade de colonizar em áreas degradadas, como também pode ser caracterizada como invasora em áreas de pastagens

abandonadas, fato que ocorre de forma natural (HONÓRIO *et al.*, 2016). No tocante à parte comercial da planta, podem ser utilizados o caule, a raiz e/ou as folhas. Entretanto, por razões de conservação e também pelas dificuldades encontradas na colheita, não se recomenda o aproveitamento das raízes (MARQUES, 2008).

Segundo Honório *et al.* (2016), a produção de fitoterápicos a partir das folhas podem facilitar o manejo da espécie, pois, para a retirada da casca do caule, necessita-se de um intervalo de 10 anos de cultivo. Além disso, a retirada de folhas ocasiona menores danos ao estado fitossanitário e à preservação da planta.

A espécie atua no sistema imunológico pela presença de agentes antioxidantes, antivirais, antirreumática e também proporciona a cura na recuperação pós-parto e em irregularidades menstruais (HEITZMAN *et al.*, 2005). De acordo com Gattuso *et al.* (2004), no modo de preparação para chás ela pode ser utilizada a partir da casca interna do caule, em pedaços ou fragmentos planos de 6 a 10 cm de comprimento e 5 a 10 mm de espessura. A bebida é caracterizada com um sabor adstringente, ligeiramente amargo.

O cultivo foi realizado por meio de uma pesquisa elaborada no Acre, divulgando que as plantas de *U. guianensis* se desenvolvem com mais frequência em várzea (33 plantas/ha) do que em floresta secundária (11 plantas/ha) e em terra firme (1.7 plantas/ha) (SHANLEY *et al.*, 2012).

2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Refere-se ao crescimento e à diferenciação de células, tecidos e órgãos isolados da planta-mãe, cultivados em meios artificiais facilitados de consistência sólida ou líquida, sob condições assépticas e controladas de temperatura e umidade (BELLO-BELLO *et al.*, 2017).

A técnica se baseia no princípio da totipotência celular, em que se aperfeiçoa o tempo e a qualidade do produto.

Nos últimos anos, com a evolução da técnica e dos princípios da biotecnologia vegetal, a cultura de tecidos vegetais tem sido enfoque em diversas pesquisas – desde a descoberta de fitorreguladores de crescimento, bem como a organogênese, embriogênese somática, mutagênese, conservação, intercâmbio de germoplasma e a produção de metabólitos secundários (QUISEN; ANGELO, 2008).

2.2.1 Germinação *in vitro*

A germinação de uma semente inicia-se com a absorção de água, fato que provoca a formação de um gradiente de potencial e se completa com a aparência do embrião ou, em maioria, da radícula (NONOGAKI *et al.*, 2010).

O sucesso da germinação de sementes e o estabelecimento de uma plântula são normalmente as características determinantes para a propagação via assexuada de espécies vegetais e de sua importância ecológica e econômica (RAJJOU *et al.*, 2012).

Assim, garantir a qualidade universal de testes de germinação requer observar a contagem diária, as curvas do progresso de germinação, as taxas de germinação ao longo do tempo e uma avaliação relativa para caracterizar o “vigor” (MATTHEWS *et al.*, 2012). De acordo com Janssen (1973), uma completa descrição da germinação deve-se incluir a germinação total, a velocidade de germinação e a variação da velocidade com o tempo.

O processo germinativo pode exibir variações entre indivíduos dentro de uma mesma espécie, devido às influências ambientais durante a formação da semente e a variabilidade genética. No entanto, estudos de germinação com diferentes matrizes têm sido pouco abordados (SILVA *et al.*, 2014).

Ademais, não é germinação de uma única semente que é de interesse, mas sim as propriedades de germinação de um grande número ou de uma população de sementes – por exemplo, todas as sementes produzidas por uma planta ou em florescência, ou todas coletadas em uma amostra de solo, ou todas sujeitas a um determinado tratamento experimental (BEWLEY *et al.*, 2013).

Quando se estabelece um material *in vitro*, a principal característica é informar a origem da planta-matriz para garantir uma qualidade genética e fitossanitária desse material vegetal (PASQUAL *et al.*, 2010).

Além dessa seleção de um material vegetal, outros fatores podem influenciar no cultivo *in vitro*, como os tipos de meios nutritivos, que podem ser modificados ou diluídos de acordo com a necessidade nutricional de cada espécie (MONFORT *et al.*, 2015). Desse modo, a realização de testes de germinação em diferentes meios de cultura *in vitro* pode favorecer a maximização da taxa de germinação (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Entre os meios de cultivo *in vitro*, o mais utilizado é o MS (Murashige; Skoog, 1962), por causa da maior quantidade de nitrogênio na forma de nitrato de amônio (NH_4NO_3). O nitrogênio difere dos demais macronutrientes no meio de cultivo porque apresenta-se na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrato e nitrito), em que o nitrato é a única fonte de nitrogênio responsável pelo crescimento. Entretanto, podem ter espécies cultivadas *in vitro* que não cresçam bem com o nitrato na formulação do meio (CALDAS *et al.*, 1998).

As doses de nitrogênio para o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* não dependem apenas da espécie vegetal, mas também do cultivar (CORDEIRO *et al.*, 2011). Podar (1997), citado por Santos (2009), afirmou que pesquisas divulgaram que o nitrato de amônio pode influenciar em níveis de fitohormônios, e conseqüentemente, no processo germinativo. É por essa razão que a micropropagação, quando adotada de forma adequada, nos permite solucionar alguns dos entraves supracitados acima, desde o processo germinativo até aclimatização dessas plantas.

2.2.2 Micropropagação

Consiste na multiplicação rápida de plantas por meio de repicagens ou subcultivos de alguma estrutura vegetativa, com a possibilidade de se obter elevados número de explantes a partir de uma matriz. No entanto, a multiplicação deve ter um limite de subcultivos, pois a indução de subcultivos sucessivos por um longo tempo, ou até mesmo muito frequentes, ocasionará modificações genéticas ou epigenéticas, denominadas de variação somaclonal do material micropropagado (LEE; GERALD, 2011).

Uma das principais vantagens dessa técnica é a viabilidade na multiplicação de espécies nativas ou exóticas com a finalidade de padronização de mudas ou resguarde de algum material genético (SOUZA *et al.*, 2007). No processo, pode-se obter um elevado número de plantas, através de protocolos, com início a partir do estabelecimento de um material vegetativo até a transferência das mudas para o campo (SOUZA; PEREIRA, 2007). Quando o objetivo é realizar pesquisas com a micropropagação de plantas medicinais, uma das principais finalidades pode ser a solução da sazonalidade na produção de fitoquímicos (NICIOLI, 2006).

Sendo assim, o processo de micropropagação é realizado em etapas, até se obter a planta em campo. Correspondem a esses estágios: estágio 0 (seleção de planta-mãe - matriz), o estágio I (estabelecimento *in vitro*), estágio II (multiplicação), estágio III (alongamento e enraizamento) e, por fim, o estágio IV (aclimação) (BELLO-BELLO *et al.*, 2017).

Para os métodos utilizados para a multiplicação, podemos citar que a relevância da organogênese (corresponde a formação de novos órgãos vegetais com outra organização celular a partir de tecidos que não existiam, como brotações e raízes) (LEMOS, 2014; SOARES *et al.*, 2007). Esse método de propagação se torna eficiente a partir da relação de fitohormônios citocinina/auxina, induzindo a formação de órgãos a partir de brotações, raízes e ou segmentos do explante (organogênese direta) ou de formação de calos (organogênese indireta) (BATISTA, 2012). O material genético pode ter maior estabilidade quando a regeneração é direta, através de brotações adventícias (SCHUCH; ERIG, 2005).

A organogênese depende de diversos fatores, como a aquisição de competência, a indução e a diferenciação. Inicia-se com respostas do tecido cultivado à indução da organogênese, em seguida ocorre a formação de órgãos específicos (devido aos componentes do meio de cultura), e por último, mesmo na ausência de reguladores de crescimento, acontece a indução e a formação de raízes ou eixos caulinares (SEMPREBOM, 2008).

A regeneração de plântulas *in vitro* a partir de cultura de brotações pode proporcionar qualidade nos teores de metabólitos secundários (RODRIGUES; ALMEIDA, 2010; VELLOSO *et al.*, 2009). Além da escolha da técnica e do material vegetal, a otimização do meio – incluindo nutrientes, reguladores e precursores – pode ser uma estratégia biológica que podem proporcionar qualidade na produção de metabólitos secundários (KUO *et al.*, 2012).

Após a otimização do meio, deve-se observar o enraizamento que depende dos níveis de auxina endógena, da idade da planta (explante), dos sais minerais do meio de cultura, das concentrações exógenas de reguladores de crescimento e carboidratos, para posterior retirada das plantas *in vitro* para um ambiente *ex vitro* (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Assim, quando a planta encontra-se estabelecida em cultivo artificial, vem uma das etapas mais importantes, que é a retirada das plantas para o campo. De alguma forma isso pode inviabilizar todo o processo da micropropagação (SOUZA; PEREIRA,

2007), pois as plantas necessitam de um período indeterminado de pré-adaptação, devido às mudanças reversíveis anatômicas e fisiológicas mediante a transferência de um ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (BARBOZA *et al.*, 2006).

De acordo com Luna-Palencia e colaboradores (2013), em plantas micropropagadas de espécies de *Uncaria tomentosa*, após serem aclimatizadas em casa de vegetação, foi avaliado o teor de alcaloides totais de acordo com a idade das plantas e a produção foi superior em mudas aos seis meses.

Na planta medicinal *Cinchonas* já foram realizados, a exemplo, experimentos com cultivo *in vitro* com a finalidade de aumentar a produção de alcaloides (ARMIJOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2016), assim como também a propagação e a recuperação de populações naturais que possivelmente estejam sendo reduzidas em decorrência às explorações irracionais de suas próprias matérias-primas.

Em consequência disso, o cultivo *in vitro* é uma alternativa viável para a produção de metabólitos secundários, podendo ser produzido em qualquer época do ano e induzir maiores proporções do que pela forma natural (COPELAND, 2015), como também pode garantir uma padronização da matéria-prima e dos ativos para as espécies de *Uncaria* (HONORIO, 2016).

2.2.3 Citocininas

A química das citocininas deriva da base nitrogenada purina, adenina. Elas diferem-se entre si pelas cadeias laterais que se prendem à adenina. Podem ser encontradas em vegetais, fungos e bactérias. São sintetizadas no ápice da raiz e translocadas para o caule pelo xilema, mas podem ser encontradas em frutos e sementes. São consideradas substâncias livres ou associadas a açúcares, fósforo e RNA transportador (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os níveis endógenos de citocininas são regulados com precisão nas plantas em relação a eventos de desenvolvimento, com o crescimento de gemas axilares e também fatores ambientais, como luz e nutrição (BREDMOSE; COSTES, 2017).

As citocininas são compostos essenciais no processo de divisão celular das células eucarióticas, como também possuem a função de alterar a taxa metabólica, a atividade enzimática e a indução de órgãos vegetativos. Suas concentrações podem ser reduzidas com a dominância apical – responsável por mobilizar nutrientes e retardar a senescência (KERBAUY; PERES, 2008).

No cultivo *in vitro* elas são utilizadas para suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios dos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz (DONINI *et al.*, 2008).

Assim, o termo citocinina inclui os derivados da adenina e das feniluréias. Elas podem ser sintéticas ou naturais, porém só as últimas derivam da adenina. Entre as citocininas conhecidas, estão a 6-furfurilaminopurina (cinetina), a 6-benzilaminopurina (BAP), a isopenteniladenina (iP), a zeatina e seus derivados e o thidiazuron (TDZ).

Phillips e Garda (2019) indicaram que a 6-benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais utilizada com 31% das citações, seguida pela cinetina, com 7,5%, Thidiazuron (TDZ) e 2-isopenteniladenina (2-IP) foram citados com menor frequência (4% das citações cada). As citocininas naturais, como a zeatina (ZEA), são caras e quimicamente menos estáveis, já o BAP, disponível comercialmente, apresentam mais eficácia e menor custo.

Portanto, a adoção de reguladores de crescimento, em exemplo as citocininas, são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, proporcionando crescimento da parte aérea e com recomendações de concentrações ideais entre 0,1 a 5,0 mg.L⁻¹ desse tipo de fitorregulador (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

2.3 FOTOMORFOGÊNESE

A luz, fonte primária de energia, controla a morfogênese das plantas desde a germinação das sementes, passando pelo desenvolvimento das plântulas, pelo crescimento vegetativo, pela síntese de pigmentos e pela floração (RIBEIRO *et al.*, 2009; GAZOLLA-NETO *et al.*, 2013).

Nas salas de crescimento *in vitro*, há muito tempo utilizam-se fonte de luz artificial, dos tipos de sódio de alta pressão, iodetos metálicos, incandescentes e fluorescentes (entre as mais utilizadas). Entretanto, as fluorescentes possuem desvantagens por gerar muito calor e por possuírem comprimentos de ondas desnecessários para o crescimento das plantas (GUPTA; JATOTHU, 2013).

Em contrapartida, os diodos emissores de luz (LED) são avanços nos métodos para a cultura de tecidos vegetais em relação a iluminação – que visem reduzir possíveis efeitos deletérios em explantes. Com diversas vantagens em relação às lâmpadas fluorescentes, eles possuem durabilidade, vida longa útil, temperatura de

emissão muito baixa e seleção de comprimentos de onda específicos para uma resposta direcionada (MASSA *et al.*, 2008; GUPTA; JATOTHU, 2013).

Fonte de luz com cores de LED ou em combinações são de uso comum para o cultivo *in vitro*, com os tipos de brancas, vermelhas, azuis e umas misturas de azul com vermelho (BELLO-BELLO *et al.*, 2017).

Segundo Goessling *et al.* (2016), a luz azul é mais energética que a luz vermelha; contudo, a luz vermelha é absorvida apenas pelas clorofilas, já a luz azul é adicionalmente absorvida pela enorme quantidade de carotenoides. Portanto, o fornecimento do mesmo nível de energia luminosa entre essas cores deve fornecer cerca de 2,5 vezes mais luz vermelha do que luz azul.

Sendo assim, pesquisas relacionadas à qualidade de luz na micropropagação ainda são incipientes e não conclusivas sobre os seus efeitos no crescimento de plântulas – mesmo adicionalmente com reguladores de crescimento no meio de cultura (BRAGA *et al.*, 2009).

Mesmo modificando as lâmpadas com melhor qualidade e quantidade de luz, as condições de cultura *in vitro* diferem significativamente do ambiente natural. Múltiplos fatores podem desencadear fontes de estresse abiótico, como o aumento da umidade, a baixa irradiância e a presença de açúcares no meio (ECKSTEIN *et al.*, 2012).

Segundo Dutra *et al.* (2009), a micropropagação independente da fonte de luz pode proporcionar deficiências nas estruturas anatômicas, causadas pelo ambiente de cultivo, devido à menor quantidade de luz disponível e à ausência de trocas gasosas, o que resulta em maior número de estômatos e deficiência na formação de ceras na epiderme da folha.

Assim, a irradiância fornecida por qualquer tipo de fornecimento de luz pode afetar o desenvolvimento das plantas, por meio de alterações fotomorfogênicas (formação dos tecidos do mesófilo e ineficiência do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, afetando sua funcionalidade) (REZENDE *et al.*, 2008).

A luminosidade, associada com as citocininas, controla o crescimento, o desenvolvimento e os processos fisiológicos das plantas (KARATAS *et al.*, 2016). Fankhauser (2002) afirma que existe uma conexão entre a luz e a sinalização mediada pelas citocininas, e que os sinais hormonais possuem pontos convergentes com a diferenciação dos cloroplastos.

Sendo assim, a ação básica da citocinina nos cloroplastos é a de modulador necessário para ajustar as funções da organela, presumivelmente mediando sinais ambientais (CORTLEVEN; SCHIMULLING, 2015).

Mediante a quantificação dos pigmentos produzidos em diferentes ambientes de cultivo *in vitro*, torna-se interessante poder relacionar respostas fisiológicas das plantas com as condições ideais de seu cultivo.

Embora várias clorofilas funcionem como pigmentos de coleta de luz, apenas a clorofila depende do seu ambiente proteico, funcionando como um coletor de luz (ou como um participante na captura de excitação eletrônica) e em eventos de transporte de elétrons nos centros de reação dos fotossistema II e I (BJORN *et al.*, 2009).

2.4 ELICITOR (ÁCIDO SALICÍLICO) - AS

Esse hormônio vegetal atua no crescimento e desenvolvimento de plantas (LIU *et al.*, 2011). É um composto fenólico, considerado um mensageiro importante relacionado à resposta de defesa da planta, o que explica seu papel como eliciador do metabolismo secundário (GORNI *et al.*, 2017).

A aplicação de ácido salicílico pode inibir a germinação e o crescimento da planta, interferir na absorção das raízes, reduzir a transpiração e causar a abscisão das folhas, bem como alterar o transporte de íons, induzindo uma rápida despolarização das membranas, ocasionando um colapso no potencial eletroquímico (KERBAY, 2008). Quando utilizado de forma exógena, como elicitor abiótico, o ácido salicílico estimula a síntese de vários metabólitos vegetais, como os polifenóis e os compostos nitrogenados (OKADA *et al.*, 2007).

O AS pode induzir a expressão de genes relacionados à produção de algumas classes de metabólitos secundários em plantas e ativar a fenilalanina amônia-liase (PAL), uma enzima chave entre o metabolismo primário e o secundário, envolvida na rota de produção do composto fenilpropanóide da planta (DURRANT; DONG, 2004).

A produção de metabólitos secundários pode ser melhorada através de elicitores, que podem ativar respostas de defesa das plantas (incluindo a síntese de proteínas com outras alterações celulares) (SHABANI *et al.*, 2009). O tipo de elicitor utilizado pode ter efeito diferente sobre a produção de compostos secundários, uma vez que operam em vias de sinalização de forma distintas e respondem de forma diferente aos estresses abióticos e bióticos (COSTE *et al.*, 2011).

De acordo com Poulev *et al.* (2003) o ácido salicílico é classificado pela Food and Drug Administration como "substância geralmente reconhecida como segura", que permite seu uso no cultivo comercial de espécies medicinais visando o mercado de fitoterápicos.

Assim, quando se expõe plantas medicinais em cultivo *in vitro* com a presença de elicitores, caso do ácido salicílico, ele funciona como uma ferramenta para estimular a produção de grupos específicos de compostos biologicamente ativos (PASTERNAK *et al.*, 2005).

A aplicação exógena de ácido salicílico no meio de cultura *in vitro* por quatro semanas, nas concentrações de 50, 100 e 150 μM , provocou uma variedade de respostas na quantidade da substância Camptothecine, em valores maiores do que a planta-matriz (NAGESHA *et al.*, 2018). A concentração ótima de compostos de sinalização para ocorrer a elicitação pode variar de compostos, do tempo de exposição e de espécie para espécie (SHABANI *et al.*, 2009).

Para estudar os efeitos abióticos nas plantas, o cultivo *in vitro* pode configurar um planejamento em condições experimentais baseadas na adição de compostos ao meio de crescimento, trazendo condições que podem ser inerentemente imperfeitas, mas que oferecem vantagens práticas (CLAEYS *et al.*, 2014).

2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem uma diversificada variedade de compostos orgânicos. Esses, por sua vez, são de forma restrita à grupo de espécies, e às vezes não participam diretamente no crescimento e desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2013). Tais compostos possuem relação direta com a disponibilidade de luz, influenciando igualmente para a fotossíntese, além da função de responder às adversidades do ambiente, que se caracterizam com atividades farmacológicas (CZELUSNIAK *et al.*, 2012).

Os ativos e os fitoativos mais valiosos são produtos do metabolismo secundário das plantas, com complexidade química ou estrutural, de modo que a síntese artificial é difícil, inexistente pelo meio químico (ROUT *et al.*, 2000; VENUTOLO, 2010). Eles são produzidos principalmente em seus tecidos de crescimento ativo, como nas regiões meristemáticas e no armazenamento em vacúolos (MENDONÇA *et al.*, 2013).

As principais moléculas são os compostos fenólicos, os terpenos e o grupo dos nitrogenados, não sendo encontrados regularmente no reino vegetal devido à especificidade de cada espécie de planta (FUMAGALI *et al.*, 2008). No entanto, a produção desses compostos pode ser realizada de forma sazonal, em virtude de serem influenciados pelas mudanças ambientais (temperatura e condições hídricas) ao longo do ano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Assim, os fatores externos (abióticos) podem conduzir à variação dos compostos ativos de muitas espécies vegetais e a hereditariedade pode originar a ocorrência de diferentes quimiotipos (MARQUES, 2008). Além disto, a idade e o estágio das plantas podem apresentar melhores atividades biossintéticas para a produção e a quantidade de compostos secundários (MORAIS, 2009).

Miranda *et al.* (2001) afirmam que muitos fatores internos e ambientais afetam o comportamento das plantas de *Uncaria spp.*, mas faltam estudos que expliquem a interação entre as variáveis dessas espécies cultivadas em floresta e as que crescem em áreas de cultivo artificial.

Logo, pode-se afirmar que o acúmulo de produtos secundários em cultivo artificial depende da composição do meio de cultura, incluindo os tipos e as quantidades de reguladores, dos sais minerais e das fontes de carbono utilizadas, além das condições ambientais (STAFFORD *et al.*, 1986; ROUT *et al.*, 2000). Dessa forma, o ambiente *in vitro* pode gerar um espectro de compostos do metabolismo secundário que podem diferir daqueles originados na planta-matriz (CARDOSO, 2014).

Laus (2004) explica que os compostos principais do gênero *Uncaria* são os alcaloides, os terpenóides e os flavonoides. Phillipson e Hemingway, na década de 1970, caracterizaram fitoquimicamente a espécie de *U. guianensis* com a presença de alcaloides oxindólicos e N-oxi-oxindólicos, além de citarem uma mistura de compostos como glicosídios, terpenóides e taninos (VALENTE, 2006; URDANIBIA; TAYLOR, 2018).

Pesquisas realizadas por Phillipson *et al.* (1978) relatam que o rincofilina e o isorincofilina foram encontrados como os principais alcaloides nas folhas de *U. guianensis* de plantas coletadas na Bolívia, Brasil, Suriname e Venezuela.

Na Guiana, os alcaloides que prevaleceram foram a mitrafilina e a isomitrafilina. Já nas raízes de plantas coletada na Guiana Francesa, os relatos foram de prevalência de mitrafilina, pteropodina (uncarine C) e especiofilina (uncarine D)

(LAVAUULT *et al.*, 1983). Laus e Keplinger (2003) encontraram nas folhas a cocorynoxeine e isocorynoxeine. Na casca do caule foram isolados quatro glicosídeos de ácido quinóico (YEPEZ *et al.*, 1991).

Os alcaloides são os grupos mais importantes de metabólitos secundários reportados das espécies *U. guianensis*, que produzem muito mais nas folhas do que na casca do caule (HONÓRIO *et al.*, 2016), mas podem também ser encontrados em toda extensão do sistema vascular da espécie, bem como nas flores e sementes (PEREIRA; LOPES, 2006).

Honório e colaboradores (2018) afirmaram que o alcaloide mitrafilina é o marcador químico dos medicamentos produzidos a partir de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. No entanto, foram realizados experimentos com a proposta de avaliar os marcadores químico e molecular da *U. guianensis*. A mitrafilina e a isomitrafilina não estavam presentes nas populações avaliadas no Brasil, sugerindo que essas substâncias não sejam os marcadores químicos da espécie. De acordo com Sandoval *et al.* (2002), as ações terapêuticas da *U. guianensis* não estão relacionadas com o conteúdo dos alcaloides, pois suas quantidades são irrelevantes. Por isso, o poder anti-inflamatório deve ser devido a uma gama de constituintes químicos.

Plantas de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* foram avaliadas a partir de suas folhas após 24 meses de cultivo quanto ao perfil dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, e a quantidade total de alcalóide de *U. tomentosa* (19,8 mg.g⁻¹ de MF) foi cerca de quatro vezes maior que na *U. guianensis* (4,43 mg.g⁻¹ de MF) (PEREIRA *et al.*, 2008).

Assim como a idade da planta pode influenciar na quantidade de princípios ativos, o ambiente também pode favorecer a produção. Silva (2017), realizando experimentos com a influência no ambiente de cultivo na produção de óleos essenciais de acessos de *Varronia curassavica*, concluiu que os rendimentos dos óleos foram influenciados pelo ambiente, afirmando que a biossíntese dos princípios ativos de plantas medicinais e aromáticas é influenciada por fatores genéticos, fisiológicos e também ambientais, e que a avaliação desses fatores é necessária para obter matéria-prima de melhor qualidade, já que a qualidade das plantas medicinais e sua eficácia terapêutica estão relacionadas ao seu teor de princípios ativos.

Já realizaram pesquisas com diferentes espécies medicinais, com a finalidade de determinar a produção e a composição química de metabólitos secundária de

plantas cultivadas *in vitro* (REIS *et al.*, 2009). Segundo Bertol *et al.* (2012), dois subtipos de alcaloides oxindole, pentacíclicos (POA) e tetracíclicos (TOA) foram encontrados em *U. tomentosa* e seu perfil variou de forma sazonal e geográfica.

Morais (2009) e Fumagali *et al.* (2008) asseveram que as informações sobre a influência do ambiente no metabolismo secundário de plantas provêm de pesquisas para maximizar a produção de constituintes ativos, que envolvam a propagação com os compostos identificados e as variedades de amostras de espécies. Eles, posteriormente, podem ser selecionados um genótipo com os teores de metabólitos de interesse. Sendo assim, quando a pretensão é explorar uma determinada espécie vegetal, as propostas de investigação devem ser das suas melhores formas de propagação e viabilidade econômica (FERREIRA; GONÇALVES, 2007).

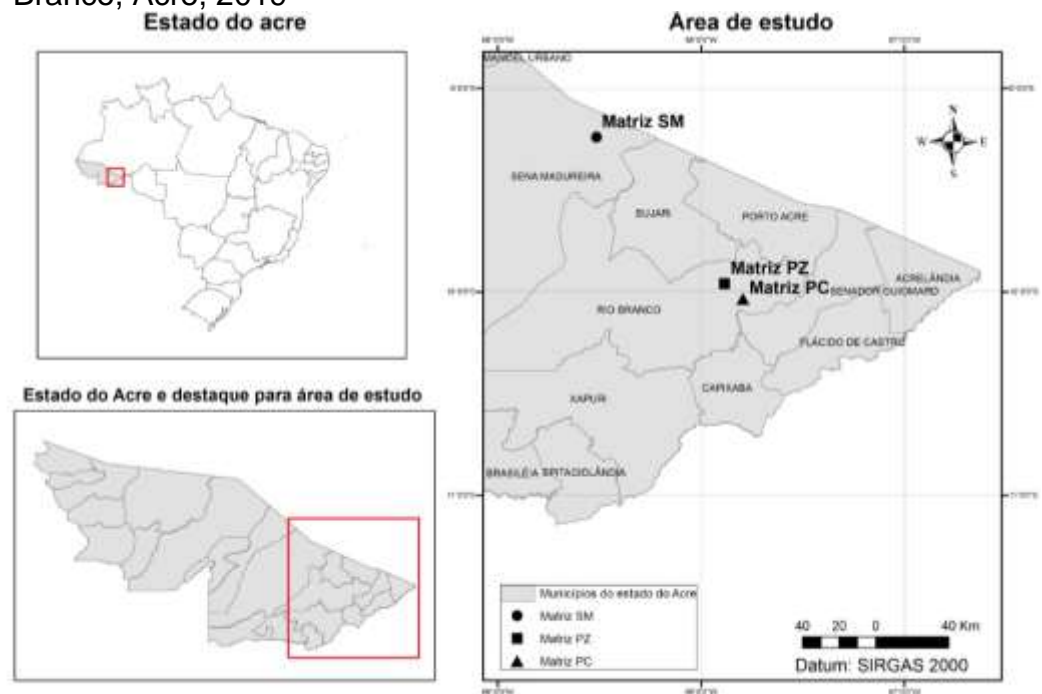
3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi constituído por três experimentos em Laboratório de propagação *in vitro* de plantas, localizado na Universidade Federal do Acre, Rio Branco. O experimento 1 foi realizado no período de abril a agosto de 2016. Os experimentos 2 e 3 foram conduzidos no período de julho de 2018 a março de 2019.

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

As sementes da espécie de unha-de-gato, foram coletadas a partir de três matrizes de plantas em setembro de 2015 situadas no Acre. As amostras estavam nas seguintes coordenadas geográficas: (-631827.44463/-8890361.9290) Parque Chico Mendes (amostra 1), (-623331.35355/-8899714.9646) Parque Zoobotânico (amostra 2), e (-550968.78905/-8981656.9172) Sena Madureira (amostra 3) todos em UTM (Universal Transverse Mercator) (FIGURA 2).

FIGURA 2 - Localização das matrizes de *U. guianensis* utilizadas na pesquisa, Rio Branco, Acre, 2019



PC: Parque Chico Mendes; PZ: Parque Zoobotânico; SM: Sena Madureira.

A distância entre as amostras 3 (Sena Madureira) e amostra 1 (Parque Chico Mendes) é de 121,75 km, e esta a amostra 2 (Parque Zoobotânico) é de 12,59 km. As

amostras 1 e 2, estavam em parques urbanos. Já, a amostra 3, encontrava-se nas margens da rodovia. As exsicatas da espécie estudada foram depositadas no herbário da Universidade federal do Acre, sob voucher 20567.

Após a coleta das infrutescências, as sementes foram conduzidas ao laboratório, beneficiadas com auxílio de pinça, identificadas de acordo com cada amostra e armazenadas em *ependorf* sob refrigeração, com temperatura de 6 ± 2 °C durante seis meses.

3.2 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES

Adaptado do protocolo de desinfestação de Raposo e Teixeira (2011), as sementes de unha-de-gato foram acondicionadas em peneira comum e lavadas em água corrente por cinco minutos, em seguida sob condição de fluxo laminar horizontal, foram submersas em álcool etílico 70% (v/v) durante 1 minuto, após a retirada do álcool, foram imersas por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (1,25% de cloro ativo v/v), homogeneizando-as sob agitador magnético.

Por fim, as sementes foram lavadas três vezes com água de osmose reversa autoclavada para a remoção de resíduos dos agentes desinfetantes. Posteriormente, com o auxílio de pinça, as sementes foram separadas em placas de Petri, e imediatamente transferidas para placas de Petri ou tubos de ensaio, conforme os experimentos detalhados a seguir (FIGURA 3).

FIGURA 3 - Etapas da metodologia descrita no processo de desinfestação das sementes de *U. guianensis*, sob condições assépticas: (A) capela de fluxo laminar horizontal; (B) sementes imersas em agentes desinfetantes sob agitador magnético e (C) sementes em placa de Petri logo após a retirada dos resíduos, Rio Branco, Acre, 2019



3.3 EXPERIMENTO 1

O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), sob esquema fatorial 3 x 5, totalizando 15 tratamentos, aos quais constituíram-se por sementes de três amostras de *Uncaria guianensis*, estabelecidas em cinco tipos de formulações de meios de cultura: MS pleno (MURASHIGE; SKOOG, 1962), MS com redução das concentrações dos macronutrientes (nitrato de amônio e nitrato de potássio) em 25%; 50%; 75% e o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), perfazendo quatro repetições de 25 sementes, totalizando 1500 sementes.

Os meios de cultivo *in vitro* foram acrescidos com 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 5,8 ± 0,1 e solidificado com 2,2 g.L⁻¹ de Phytigel™. O processo de esterilização do meio de cultura foi por autoclave de calor úmido a 121 °C e 1,05 atm. de pressão, por 20 minutos.

O volume de meio de cultura *in vitro* foi racionado em 30 mL dentro das placas de Petri, em capela de fluxo laminar, com posterior semeadura de modo equidistante dentro das placas. Os tratamentos foram mantidos em condições de sala de cultivo *in vitro* à temperatura de 25 ± 2 °C e 16 horas de fotoperíodo, fornecido por duas lâmpadas tubulares fluorescentes (76 µmol.m².s⁻¹).

Para o critério de avaliação e das medidas calculadas, os tratamentos foram monitorados diariamente há cada 24 horas. A confirmação para o evento germinativo, foi através do rompimento do tegumento a partir da emissão de qualquer estrutura aparente. Desta forma, a confirmação do evento (ruptura do tegumento) foi realizada através da visualização do equipamento estereomicroscópio.

A partir da coleta dos dados, foram calculadas as medidas de germinação, que incluem a germinabilidade, tempo médio de germinação, coeficiente de velocidade de germinação, índice de velocidade de emergência, índice de sincronização ou incerteza e frequência relativa de germinação.

3.3.1 Conceitos e fórmulas

3.3.1.1 Germinabilidade (G%):

É o número de sementes nas quais o processo de germinação pode ir até o fim, mediante o crescimento intra seminal, que conduz a emergência de um embrião

vivo. Sendo, a razão entre o número de sementes germinadas (NGE) e a quantidade total semeadas (LABORIAU, 1983):

$$G (\%) = \frac{NSG}{Total} X 100, \text{ em que NSG é o número de sementes germinadas}$$

divididas pelo total de sementes semeadas.

3.3.1.2 Tempo médio de germinação (TM) (LABORIAU, 1983):

É o desenvolvimento das sementes no intervalo de tempo, utilizando-as como peso de ponderação (RANAL; SANTANA, 2006):

$$t = \frac{\sum_{i=1}^k ni \cdot ti}{\sum_{i=1}^k ni}, \text{ em que } ti: \text{ É o tempo entre o início do experimento e a } i\text{-ésima}$$

observação; ni : Número de sementes desenvolvidas no tempo t_i ; k : Último tempo de desenvolvimento das sementes.

3.3.1.3 Coeficiente de velocidade de germinação (CVG) (NICHOLSON; HEYDECKER, 1968):

Determina o grau de dispersão das sementes até o desenvolvimento ao redor do tempo médio, avaliando-se a uniformidade:

$CVG = (\sum_{i=1}^K fi / \sum_{i=1}^k fixi) \cdot 100$, em que fi : Número de sementes germinadas no i -ésimo dia; xi : Número de dias contados da semeadura até o dia da leitura (i); k : Último dia da observação.

3.3.1.4 Índice de Velocidade de emergência (IVE) (MAGUIRE, 1962):

Indica o número de sementes germinadas em laboratório, transcorridos desde a semeadura, caracterizando “o vigor” das sementes (RANAL; SANTANA, 2006):

$VE = (\text{número de plântulas normais/dias até a primeira contagem} + \dots + \text{número de plântulas normais/dias até a contagem final})$.

3.3.1.5 Índice de sincronização ou incerteza (RANAL; SANTANA, 2006):

Quantifica a variação da germinação das sementes ao longo do tempo:

$E = -\sum_{i=1}^k f_i \log_2 f_i$, em que f_i : frequência relativa de germinação; \log_2 : logaritmo de base 2; k : último dia de observação.

3.3.1.6 Frequência relativa de germinação (FRG) (LABOURIAU; VALADARES, 1976):

Observa ao longo do tempo, o comportamento das sementes, de acordo com sua distribuição de frequência:

$f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$, em que n_i : número de sementes germinadas no dia i ; k : último dia de observação.

3.3.2 Estabelecimento das plantas em tubos de ensaio

Para avaliar o crescimento das plantas provenientes da germinação *in vitro*. Transferiu-se em câmara de fluxo laminar horizontal, 30 plantas das placas de Petri para tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura conforme os tratamentos e condições de cultivo do experimento 1.

Aos 90 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o número de pares de folhas expandidas (NPFE) e altura da parte aérea (APA, cm). Com posterior transferência das plantas para condições *ex vitro*.

3.3.3 Pré-aclimatização e aclimatização das plantas

Decorridos 90 dias de cultivo *in vitro* (placa de Petri e tubo de ensaio), as plantas de cada tratamento foram submetidas ao ambiente *ex vitro*. Para tanto, estas foram retiradas dos tubos de ensaio, submetidas à lavagem das raízes em água corrente com retirada do excesso de meio de cultura aderido.

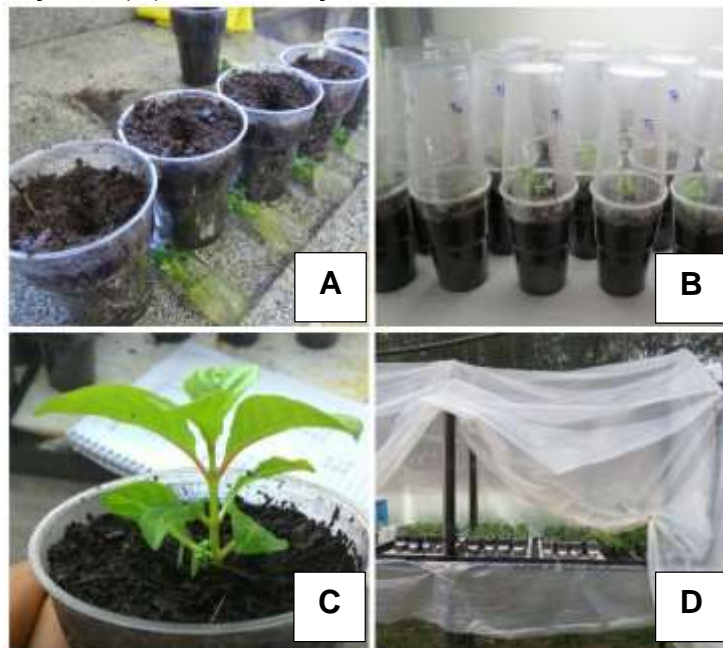
As plantas foram individualmente acondicionadas em copo descartável transparente (300 mL), perfurado e preenchido com substrato comercial.

Durante a pré-aclimatização, o substrato foi previamente umidificado com 50 mL de água de osmose reversa, antes de transferir as plantas. Imediatamente depois do plantio, e com objetivo de propiciar condições de uma câmara úmida, os copos foram tampados com copos descartáveis de mesmo volume, vedados com película aderente (filme de PVC).

Estas plantas foram mantidas por sete dias em sala de cultivo, conforme as condições do item 3.3. Após a pré-aclimatização (7 dias), as plantas foram submetidas à aclimatização em mini estufa localizada dentro de casa de vegetação com 50% de sombreamento. Foram mantidas em aclimatização por 30 dias com irrigação (capacidade de campo) diária (FIGURA 4).

Aos 30 dias foram avaliados a taxa de sobrevivência, o número de pares de folhas expandidas (NPFE) e altura da parte aérea (APA, cm).

FIGURA 4 - Etapas da metodologia utilizada da pré-aclimatização e aclimatização das plantas de *U. guianensis*: (A) transferência de tubos para os copos; (B) acondicionamento na pré-aclimatização; (C) sete dias após a pré-aclimatização e (D) aclimatização em estufa, Rio Branco, Acre, 2019



3.4 EXPERIMENTO 2

Sementes coletadas da amostra 1 (Parque Chico Mendes) foram submetidas à desinfestação conforme o item 3.2, em seguida após este processo, foram transferidas para tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de

cultura WPM, acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, com pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e solidificado com $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel™.

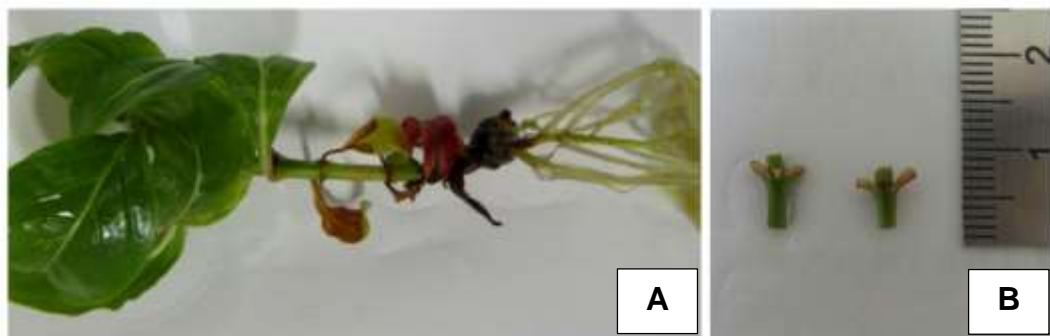
O processo de esterilização do meio de cultura foi por autoclave de calor úmido a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1,05 \text{ atm.}$ de pressão, por 20 minutos. As sementes foram mantidas por 60 dias em sala de cultivo *in vitro*, sob temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas por duas lâmpadas tubulares fluorescentes ($76 \text{ } \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$).

3.4.1 Instalação do experimento

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3×5 , representados por fontes de luzes (L1- lâmpada tubular fluorescente; L2 - Módulo Green Power e L3 - LED tubular) e concentrações de (0; 4,44; 8,88; 13,32; $17,76 \text{ } \mu\text{M}$) da citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP), com 15 repetições, totalizando 225 microestacas.

Para avaliar o efeito destes fatores na propagação *in vitro* de *U. guianensis*, utilizou-se explantes de segmentos de posição nodal, com $\pm 1 \text{ cm}$ de comprimento (FIGURA 5), contendo um par de gemas axilares de plantas que foram germinadas *in vitro* de acordo com o item 3.4.

FIGURA 5 - (A) Planta de *U. guianensis* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, submetida ao meio WPM (B) Segmento nodal da planta com um par de gemas axilares.



As fontes de luz utilizadas se diferenciam quanto à marca comercial, as densidades de fluxo de fótons e ao comprimento de onda fornecido.

O fluxo de fótons foi medido através do equipamento (IRGAN - LICOR 64000), embaixo de cada prateleira antes da instalação do experimento. A caracterização da lâmpada tubular fluorescente branca de marca comercial (Empalux®-20 W) com $76,00 \text{ } \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$, a LED tubular branca de marca comercial (Decorlux®-10 W) com $101,00$

$\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e o Módulo Green Power de cor vermelha e azul alternadas da marca comercial (Philips®) na proporção de 5:2 em linha única, com $98,00 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ (FIGURA 6), e os seus comprimentos de onda (FIGURA 7).

FIGURA 6 - Fontes de luz utilizadas para o cultivo *in vitro* de *U. guianensis* na indução de brotações, em sala de crescimento, UFAC, Rio BRANCO, 2019

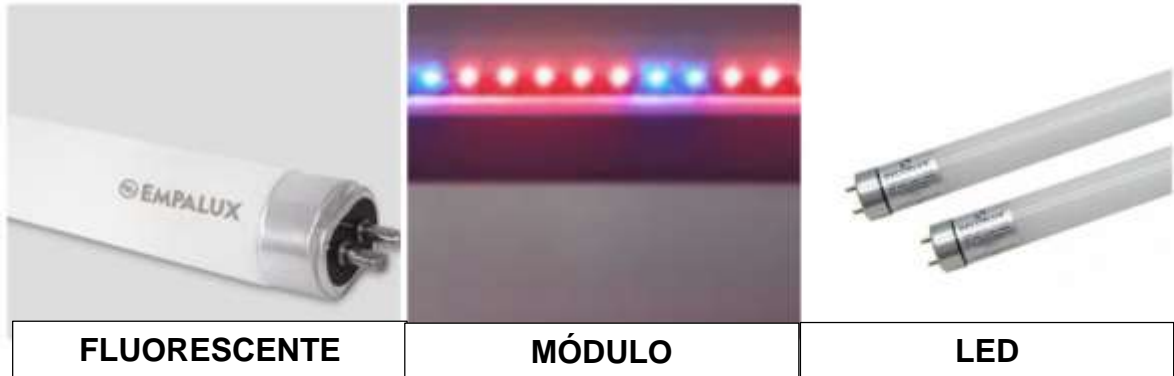
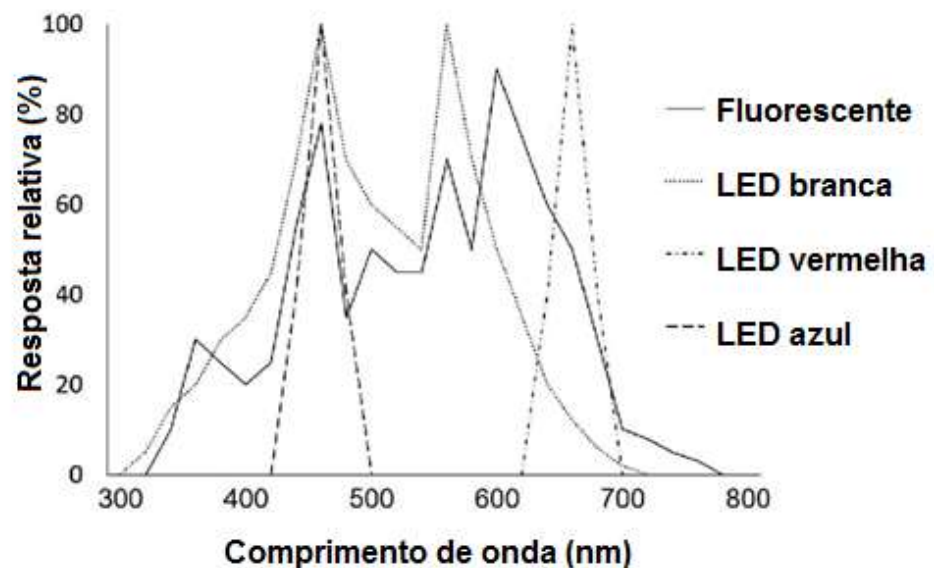


FIGURA 7 - Distribuição das curvas espectrais em resposta relativa das lâmpadas LED's e lâmpadas fluorescentes, adaptado de BELLO-BELLO *et al.*, 2017



A citocinina utilizada neste experimento foi a 6-benzilaminopurina (BAP), de massa molecular de $225,2 \text{ g.mol}^{-1}$ e fórmula $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$. O BAP foi dissolvida com NaOH (Hidróxido de sódio), e diluído em água de osmose reversa autoclavada.

As concentrações do fitorregulador foram retiradas de uma solução estoque, armazenadas sob condições refrigeradas.

Foram realizados dois subcultivos a partir de segmentos nodais com a presença do fitorregulador e nas condições dos tipos de luz, em intervalos de 60 dias. Ao final destes períodos, as brotações foram avaliadas ao fim de cada subcultivo.

Sendo assim, as variáveis respostas foram o número de brotações por explante (NBE), tamanho da maior brotação (TMB, cm), e os teores de pigmentos fotossintetizantes clorofilas *a* e *b*; total e carotenóides.

3.4.2 Condições de restabelecimento

No final do segundo subcultivo com a presença do fitorregulador, após as avaliações, as plantas foram novamente subcultivadas para um meio de cultura WPM, conforme item 3.4 e condições de cultivo nas três fontes de luz.

Aos 60 dias de cultivo, foram avaliadas a altura da parte aérea (APA), número de pares folhas expandidas (NPFE) e a presença de raiz (PR).

3.4.3 Pré-aclimatização e aclimatização das plantas

Decorridos 60 dias do restabelecimento, as plantas de cada tratamento foram submetidas às condições de pré-aclimatização descritas no item 3.3.3 e mantidas nas três fontes de luz, por sete dias em sala de cultivo. Após a pré-aclimatização, as plantas foram submetidas à aclimatização conforme o item 3.3.3.

Aos 30 dias foi avaliada a sobrevivência, altura da parte aérea (APA, cm), número de pares de folhas expandidas (NPFE), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MST) e a qualidade dos metabólitos secundários em comparação com a planta matriz de campo do Parque Chico Mendes.

3.5 EXPERIMENTO 3

A obtenção dos explantes (segmento nodal e apical) foi através da germinação de sementes pertencentes à amostra 1 (Parque Chico Mendes), as quais foram desinfestadas conforme o item 3.2, com posterior, transferência para tubos de ensaio

(25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura WPM, com suplementação do meio de cultura e esterilização igual ao item 3.4.

As sementes foram mantidas por 60 dias em sala de cultivo *in vitro*, sob temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas com lâmpada tubular LED branca ($101 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$).

3.5.1 Instalação do experimento

Para avaliar o efeito de concentrações do ácido salicílico (AS) e tipos de explante na propagação *in vitro* de *U. guianensis*, os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, representados por dois tipos de explantes (região mediana e apical das plantas) e cinco concentrações de ácido salicílico (0; 100; 200; 300 e 400 μM), com 10 repetições, totalizando 100 explantes, constando-se (T1=apical+0 μM), (T2=apical+100 μM), (T3=apical+200 μM), (T4=apical+300 μM), (T5=apical+400 μM), (T6= nodal+0 μM), (T7=nodal+100 μM), (T8=nodal+200 μM), (T9=nodal+300 μM) e (T10=nodal+400 μM).

Utilizou-se segmentos com um par de gemas para o nodal ou apical com um primórdio foliar, ambos com aproximadamente 1 cm de comprimento, provenientes da germinação *in vitro* de sementes. A unidade experimental consistiu em um explante estabelecido verticalmente em tubo de ensaio (150 mm x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultivo WPM com adição das concentrações de AS. As condições de cultivo estão conforme o item 3.5.

O ácido salicílico utilizado foi o de cultura de células, com massa molar 138,12 g/mol e fórmula molecular ($\text{C}_7\text{H}_3\text{O}_7$), dissolvido em etanol, posteriormente diluído com água de osmose reversa e distribuído entre os tratamentos propostos.

Para a avaliação destes fatores, verificou-se aos 60 dias de cultivo as porcentagens de sobrevivência (PS), porcentagem de enraizamento (PER), teores de pigmentos fotossintetizantes (clorofilas total, *a* e *b*; e carotenóides), altura das plantas (APA, cm) e a qualidade dos metabólitos secundários em comparação com a planta matriz de campo do Parque Chico Mendes.

3.5.2 Condições de restabelecimento

Após a avaliação, as plantas foram transferidas para um meio de cultura fresco de WPM, conforme item 3.4.1 nas mesmas condições de cultivo. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliadas a altura da parte aérea (APA), número de pares folhas expandidas (NPFE) e a presença de raiz (PR).

3.5.3 Pré-aclimatização e aclimatização das plantas

Decorridos 60 dias do restabelecimento, plantas de cada tratamento foram submetidas às condições de pré-aclimatização e aclimatização, por sete e 30 dias, respectivamente, conforme o item 3.3.3.

Aos 37 dias foi avaliada a sobrevivência, altura da parte aérea (APA, cm), número de pares de folhas expandidas (NPFE), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MST) e a qualidade dos metabólitos secundários semelhantes em comparação com a planta matriz de campo do Parque Chico Mendes.

3.6 ANÁLISES

3.6.1 Determinação dos pigmentos fotossintetizantes

As clorofilas a e b, total e carotenoides foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Lichtenthaler e Wellburn (1983).

Aos 60 dias foram retiradas 25 mg de folhas de plantas propagadas *in vitro* de quatro repetições em tratamentos individualizados. As folhas foram cortadas com tesoura e acondicionadas em solução de 5 mL de acetona a 80% em cada microtubo.

Os recipientes foram tampados e cobertos com papel alumínio, permanecendo por 24 horas sob refrigeração. A solução foi filtrada e medida a absorvância do sobrenadante em Clorofila a: 664 nm/ Clorofila b: 646 nm/ Carotenóides: 470 nm, usando um espectrofotômetro UV. Os pigmentos foram avaliados e expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca, usando as seguintes fórmulas:

$$\text{Chl a (mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{): } 12,21 \times A_{664} - 2,81 \times A_{646}$$

Chl b (mg.L⁻¹): $20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{664}$

Chl total (mg.L⁻¹): $17,3 \times A_{646} + 7,18 \times A_{664}$

Carotenóides (mg.L⁻¹): $(1000 \times A_{470} - 3,27 \times [\text{Chl a}] - 104 \times [\text{Chl b}]) / 229$

3.6.2 Determinação da massa fresca e seca

Para obtenção da massa fresca, as plantas foram limpas em água corrente para a retirada do substrato, em seguida foram separadas quanto as estruturas vegetativas (parte aérea e raiz) e pesadas imediatamente em balança digital (em gramas).

Posteriormente foram acondicionadas em papel tipo Kraft sob condições de estufa em ventilação forçada de ar, em temperatura de 40° C por aproximadamente 60 horas. O material vegetal foi pesado duas vezes até atingir o valor da massa constante.

3.6.3 Fitoquímica

As folhas secas em estufa das plantas aclimatizadas de *U. guianensis* e da planta matriz em campo, foram trituradas em moinho elétrico, e pesadas em balança analítica com massa de 45 mg de extrato seco do material vegetal. Em seguida, o material triturado, foi solubilizado em 1 mL de metanol HPLC, filtrado e posteriormente transferido para o banho em ultrassom durante 20 minutos. Adaptado da metodologia de Oliveira (2014) como relação as etapas utilizadas de qualificação das amostras.

3.6.3.1 Análise cromatográfica dos extratos

Em Manaus, na Central Analítica de Química da Universidade Federal do Amazonas, foram realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), com separações analíticas em fase reversa, TLC sílica gel 60 RP-18, utilizando-se placas com 5 cm de altura. Utilizados 4 tipos de eluição com dois solventes, em diferentes proporções.

O extrato metanólico foi eluído com ácido fórmico 0,1%/MeOH nas proporções (9:1; 7:3; 1:1 e 100% de MeOH) e revelado com luz UV (365 nm) e analisado com sulfúrico.

3.6.3.2 Extração em fase sólida (SPE) e Cromatografia líquida acoplada a análise de espectrometria de massa (LC-MS)

Antes de realizar as análises por LC-MS para caracterização de compostos químicos, as amostras foram tratadas por extração em fase sólida, com cartuchos C-18 e eluídas com metanol HPLC (FIGURA 8).

FIGURA 8 - Etapas da metodologia utilizada na separação das amostras dos tratamentos para purificação dos extratos (*clean-up*), Manaus, Amazonas, 2019



As amostras ficaram em repouso por quatro dias, em condições de armazenamento sob refrigeração.

Utilizou-se o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica, modelo Acella® (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Acess (Thermo Scientific), fonte de ionização APCI monitorando-se no intervalo de m/z 100-1000 Da. Foi utilizada uma coluna analítica Luna C18 (5 μm , 150 x 460 mm) Phenomenex com fluxo de 1 mL/min. A concentração da amostra foi de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solubilizada em metanol grau HPLC. O detector DAD foi ajustado para o monitoramento 200-600 nm.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Os dados coletados foram submetidos à normalidade dos erros por Shapiro; Wilk (1965) e homogeneidade das variâncias por Bartlett (1937). As variáveis que não atenderam os pressupostos da análise de variância efetuaram-se a transformação. Pelo teste F na análise de variância verificou-se a significância ($p < 0,05$) dos efeitos isolados e combinados dos fatores. Quando significativos, efetuou-se o desdobramento, e comparação entre as médias pelo teste de Tukey (1949) para

fatores qualitativos, e a análise de regressão quando houve a presença de fatores quantitativos. Todas as tabelas com as fontes de variação e os quadrados médios se encontram nos apêndices.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fatores utilizados (sementes de matrizes de *U. guianensis*, redução de constituintes dos meios de cultivo, fontes de luz, concentrações do BAP, tipos de segmentos e concentrações do ácido salicílico) interferiram significativamente ($p < 0,05$) na maioria das variáveis avaliadas nos experimentos.

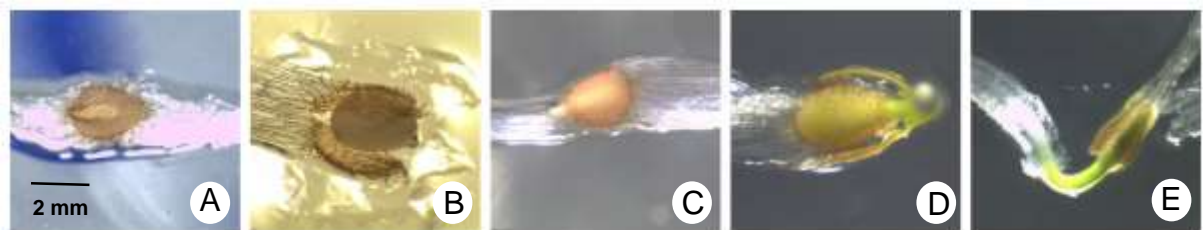
4.1 EXPERIMENTO 1

A análise de variância detectou interação dos fatores para a germinabilidade (G), efeito isolado das formulações tanto para o tempo médio de germinação (TMG) quanto para o coeficiente de velocidade de germinação (CVG), e efeito isolado para ambos os fatores na velocidade de emergência (VE) (Apêndice A).

O processo de germinação foi avaliado durante 20 dias após a semeadura, devido aos eventos de ruptura dos tegumentos se repetirem dentro dos tratamentos. Constatou-se que em todos os tratamentos houveram sementes consideradas germinadas, independente da amostra ou das formulações dos meios de cultivo *in vitro*.

Caracterizou-se com 24 horas o intumescimento e quebra do envoltório (Figura 9-b) e o rompimento do tegumento a partir das 48 horas (Figura 9-c).

FIGURA 9 - Eventos do processo germinativo de sementes de *U. guianensis* (A) intumescimento; (B) rompimento do envoltório; (C) rompimento do tegumento pela protusão da radícula; (D) pigmentação; (E) curvatura do hipocótilo, Rio Branco, Acre, 2019



Observou-se que os tipos de amostras de sementes da espécie unha-de-gato resultaram em respostas distintas dentro das formulações dos meios de cultivo *in vitro*. Embora sejam sementes da mesma espécie, pode-se justificar que estavam em locais

de cultivo diferentes com relação à disponibilidade hídrica, sombreamento, condições edáficas e fatores genéticos.

Sendo assim, avaliando-se a amostra 1 (Parque Chico Mendes) quando estabelecidas em meios de cultivo *in vitro* em WPM e MS75%, estes tratamentos proporcionaram maior ($p < 0,05$) germinabilidade quando comparado às sementes estabelecidas em meio MS. No entanto, para a amostra 2 (Parque Zoobotânico) e amostra 3 (Sena Madureira), a germinação foi similar ($p > 0,05$) em todas as formulações.

Com relação a mesma variável, observou-se que as amostras estabelecidas no meio MS pleno e MS25% se comportaram de modo similar ($p > 0,05$). De modo que nos meios WPM e MS75%, a amostra 1 obteve maior média do que a amostra 2, no entanto, para o meio MS50%, as amostras 1 e 2 foram semelhantes na germinação (TABELA 1).

TABELA 1 - Germinabilidade (G) das sementes dentro das formulações de meios para o cultivo *in vitro* de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

Amostras	Formulações dos meios para o cultivo <i>in vitro</i>				
	MS	WPM	MS25%	MS50%	MS75%
1	0,60 aB	0,94 aA	0,84 aAB	0,79 aAB	0,90 aA
2	0,65 aA	0,60 bA	0,92 aA	0,84 aA	0,63 bA
3	0,63 aA	0,67 abA	0,63 aA	0,46 bA	0,66 abA

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (PC: Parque Chico Mendes; PZ: Parque Zoobotânico e SM: Sena Madureira);

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE A.

A germinabilidade das três matrizes foi influenciada no presente estudo pelos meios diluídos apenas em um tipo de genótipo de *U. guianensis*, que foi o da amostra 1 (Parque Chico Mendes). Pesquisas realizadas por Garwoog (1983) confirmam que a causa da heterogeneidade na germinação de espécies pode estar associada às oscilações climáticas e ecológicas que houveram durante a polinização, formação e maturação dos frutos e sementes.

Com relação aos resultados neste trabalho, que se apresentaram com diferenças na germinação para as formulações dos meios de cultivo, já existiam relatos na literatura, mas com outras espécies. Sendo assim, Stein e colaboradores (2007) realizando experimentos para avaliar a germinação da espécie *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (Fabaceae), foi observado uma diferença na germinação para os

meios WPM e MS pleno, em respectivamente em 66% e 30%. Já, em pesquisas realizadas por Nascimento e colaboradores (2017), ao avaliarem a germinação com a espécie *Genipa americana* (Rubiaceae) semeadas nos meios nutritivos MS e WPM, resultaram em 100% de sementes germinadas em todos os tratamentos, em que os autores concluíram que os meios supriram as necessidades nutricionais. Soares e colaboradores (2007) observaram que as formulações dos meios WPM e MS, não influenciaram nas porcentagens de germinação com *Hancornia speciosa* (Apocynaceae).

Para a variável tempo médio (TM), foi observado que os tipos de amostras não interferiram no tempo necessário para as sementes germinarem. De acordo com os resultados, apenas o tipo de formulação influenciou para esta variável. O tempo de germinação foi influenciado pelas concentrações de sais que possuem em cada formulação de meios de cultivo. Desta forma, quanto menores as médias de dias de avaliação do tempo médio, melhores resultados são alcançados, devido o lote de sementes germinarem mais rápido naquelas condições. Desta forma, observou-se que o meio WPM diferiu ($p < 0,05$) do MS (TABELA 2).

TABELA 2 - Tempo médio de germinação (TMG) das formulações de cultivo *in vitro* de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

Formulações de cultivo	Dias
MS	11,96 a
WPM	8,99 c
MS25%	9,96 bc
MS50%	10,22 bc
MS75%	10,64 ab

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade;

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE A.

De acordo com Bewley e colaboradores (2013) os cursos de períodos de germinação revelam informações sobre o tempo, uniformidade e extensão da germinação em populações de sementes. De modo que a variação do tempo médio de germinação, pode refletir na distribuição temporal desta em torno da média, o que permite avaliar se a germinação de dado conjunto de sementes é uniforme (pequena variação) ou irregular (grande variação) (BORGHETTI; FERREIRA, 2004).

Sendo assim, a diferença no comportamento do TMG, pode ser justificada segundo Pierine *et al.* (2019) afirmam que durante a germinação e desenvolvimento

in vitro, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultivo, além de exercerem efeito nutritivo, podem também influenciar osmoticamente no crescimento celular e na morfogênese.

Segundo Fleck e colaboradores (2001), eles afirmam que elevadas concentrações de sais solúveis aumentam a pressão osmótica, fazendo com que as sementes podem diminuir a quantidade de absorção de água, dificultando o início do processo de germinação. Justificando assim, o tempo para o processo germinativo dentro de cada formulação neste experimento, pois a diferença entre os tratamentos são justamente os sais presentes nos meios de cultivo, em menor proporção no WPM do que no MS.

Para a variável coeficiente de velocidade de germinação (CVG), Nakagawa (1999) afirma que quanto maior o seu valor numérico, maior a velocidade de germinação, indicando que mais vigoroso é o lote ou a amostra de diásporos em estudo. Assim, para a variável coeficiente de velocidade de germinação (CVG) deste experimento, houve efeito isolado para as formulações de meios de cultivo, onde o meio WPM diferiu ($p < 0,05$) das demais formulações (TABELA 3). Observou-se que o meio WPM se apresentou com resultados superiores em relação ao meio MS para as variáveis CVG e TMG.

TABELA 3 - Coeficiente de Velocidade de Germinação (CVG) de *U. guianensis* submetidas a formulações de meios de cultivo *in vitro*, Rio Branco, Acre, 2019

Meios de cultivo	Porcentagem (%)
MS	8,00 c
WPM	11,00 a
MS25%	10,00 b
MS50%	9,00 b
MS75%	9,00 b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE A.

De acordo com Ranal e Santana (2004) o índice de velocidade de emergência (IVE) quanto maior o seu valor numérico, maior será o “vigor” da amostra de sementes analisadas.

As sementes que possuem origem de plantas cultivadas em diferentes condições de cultivo, podem apresentar respostas diferenciadas na germinação

devido a condições fisiológicas das espécies como das variações genéticas entre as populações, afirmando Botezelli *et al.* (2000). Roach e Wulff (1987) relatam que as sementes carregam um efeito materno que podem influenciar no fenótipo de sua prole, confirmado através de estudos ecofisiológicos e genéticos.

Desta forma, observou-se neste experimento, das amostras utilizadas para a espécie de unha-de-gato, a que favoreceu maior índice de velocidade de emergência (IVE), foi a amostra 1 (Parque Chico Mendes), e as demais amostras foram semelhantes ($p > 0,05$) (TABELA 4). Em experimentos utilizando duas amostras de *Genipa americana* (Rubiaceae) para avaliar o índice de velocidade de germinação (IVG), foi observado que os valores foram distintos entre as amostras, atribuindo a diferença devido ao pool genético das populações (BRANDANI *et al.*, 2018).

Com relação as formulações dos meios de cultivo, o meio WPM e o MS25% promoveram maior ($p < 0,05$) índice de velocidade de emergência (IVE), comparado ao meio MS pleno (TABELA 4). Neste experimento, o meio de cultura MS pleno, foi o que se apresentou com menor média no coeficiente de velocidade de germinação (CVG), sendo confirmado para o índice velocidade de emergência (IVE).

TABELA 4 - Índice de Velocidade de Emergência (VE) de *U. guianensis* em função da formulação de meios de cultura e matrizes cultivadas *in vitro*, Rio Branco, Acre, 2019

Fonte de variação	Sementes dia ⁻¹
Amostras	
1	2,34 a
2	1,95 b
3	1,65 b
Formulações	
MS	1,50 b
WPM	2,24 a
MS (25%)	2,24 a
MS (50%)	1,90 ab
MS (75%)	2,00 ab

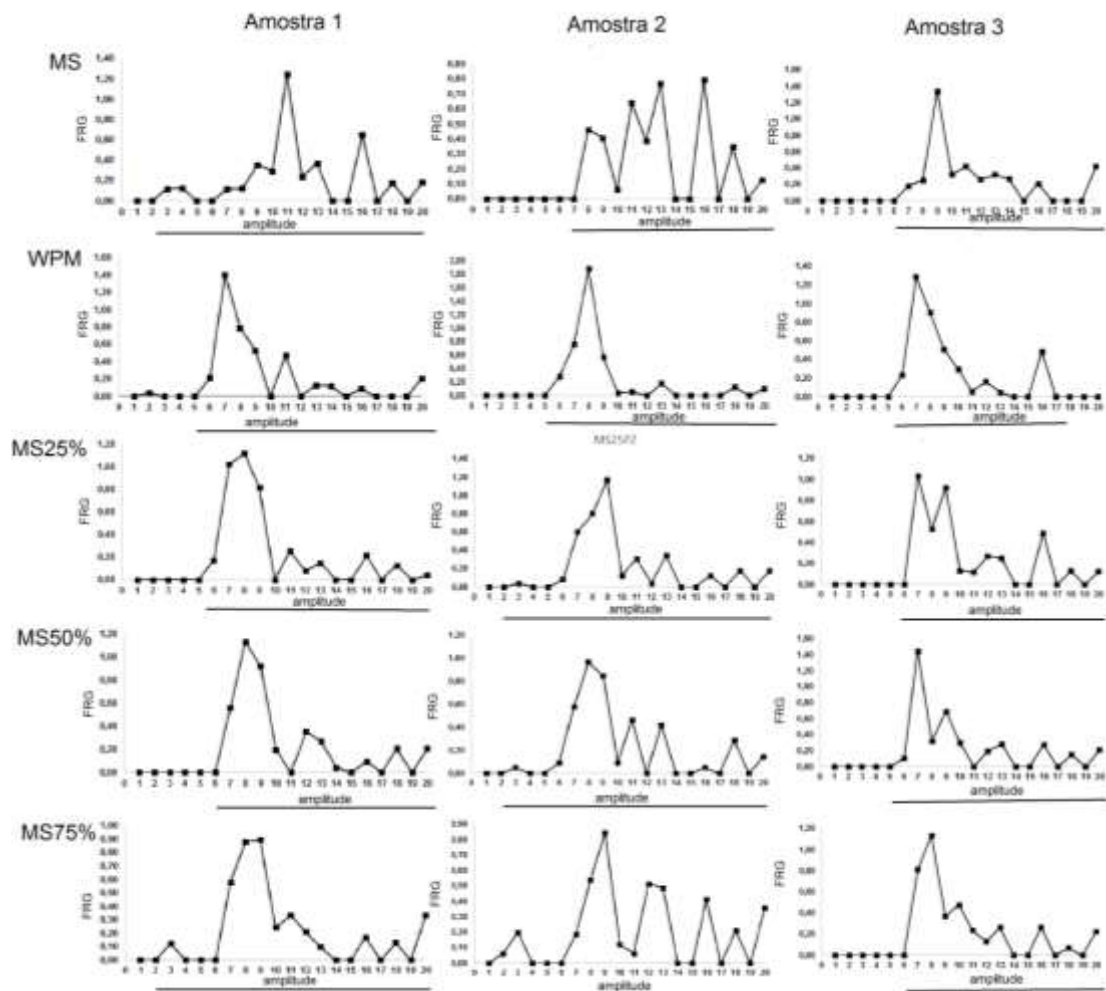
⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE A.

Experimentos aos quais se utilizam sementes oriundas de uma matriz, podem comprometer todo um processo germinativo, pois podem inserir plantas menos vigorosas, que influenciarão na aptidão das adversidades naturais (DORNELES *et al.*, 2013).

Para a variável índice de sincronização (I), não houve efeito isolado ou combinado (Apêndice A). No entanto, mesmo não havendo sincronia no processo germinativo para estas amostras em estudo, é possível quantificar a desuniformidade, expressando em porcentagem de sementes acumuladas na amplitude (dias).

FIGURA 10 - Frequência relativa da germinação de sementes (FRGS) *in vitro* de *U. guianensis* das três amostras submetidas nas formulações de meios de cultivo, Rio Branco, Acre, 2019



A amplitude temporal para a germinação de sementes das três amostras em função das formulações dos meios de cultivo *in vitro*, comprova a diferença para o início da germinação e o seu término a partir da frequência de picos em cada

tratamento. Desta forma, diante da variabilidade dos resultados das amostras, que foi observada através da heterogeneidade da germinação, a explicação para a distribuição assíncrona pode ser explicada por ser uma espécie selvagem, sem domesticação e melhoramento genético (SILVA *et al.*, 2014).

O tempo, a porcentagem de germinação, a homogeneidade e sincronia são características importantes não apenas para os fisiologistas e tecnólogos de sementes, como também para os ecologistas, por ser possível prever o grau de sucesso de uma espécie, em decorrência do tempo de germinação de suas sementes.

Após as avaliações das medidas de germinação *in vitro*, verificou-se que para a formação de plantas, os tipos de matrizes e formulações dos meios de cultivo, exerceram também influencia nas variáveis na altura da parte aérea (APA) e número de pares de folhas expandidas (NPFE). Houve interação para a APA e efeito isolado para as formulações no NPFE (APÊNDICE B).

As plantas da amostra 1 estabelecidas em meio MS25% teve maior ($p < 0,05$) incremento em altura em relação às plantas que estavam no meio MS pleno, assim como, as plantas da amostra 2, em meio WPM e MS50% tiveram altura superior comparado com a plantas em MS pleno, e por fim, as plantas da amostra 3, que estavam no meio WPM diferiu ($p < 0,05$) apenas das plantas do meio MS pleno. As plantas de todas as amostras estabelecidas no meio MS pleno e MS75% não diferiram ($p > 0,05$) entre si. No entanto, as plantas da amostra 2 obtiveram média superior nos meios WPM e MS50%, e por fim, no meio MS25%, as amostras 1 e 2 foram similares (TABELA 5).

TABELA 5 - Altura da parte aérea (APA) em função de matrizes e formulações de meios de cultivo, aos 90 dias de plantas estabelecidas de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

Amostras	APA (cm)				
	MS	WPM	MS25%	MS50%	MS75%
1	2,18 aC	3,13 bAB	3,87 aA	2,78 bBC	3,14 aAB
2	2,20 aC	4,03 aA	3,56 aAB	3,73 aA	2,65 aBC
3	2,25 aC	3,17 bA	2,47 bAB	2,63 bAB	2,54 aAB

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (PC: Parque Chico Mendes; PZ: Parque Zoobotânico e SM: Sena Madureira);

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE B.

Conforme a tabela 6 pode-se observar que as maiores médias para o NPFE, encontram-se nas amostras estabelecidas no meio WPM com relação as estabelecidas no meio MS pleno ($p > 0,05$).

TABELA 6 - Número de pares de folhas expandidas (NPFE) das plantas de *U. guianensis* em formulações dos meios de cultivo, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, Rio Branco, Acre, 2019

Meios de cultivo	Médias
MS	4,18 b
WPM	5,32 a
MS25%	4,75 ab
MS50%	4,71 ab
MS75%	4,72 ab

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade;

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE B.

De acordo com George e colaboradores (2008) cada espécie tem sua própria composição de característica elementar que pode ser usada para adaptar-se aos tipos de formulação do meio de cultura *in vitro*. Kanashiro (2005) afirma que diversas variáveis, entre as quais o comprimento das plantas, pode ser influenciado pelas concentrações diluídas das fontes de macronutrientes e pela espécie. Conforme os resultados apresentados, as plantas podem ser visualizadas e caracterizadas quanto ao tipo de população, estabelecidas dentro de cada formulação de meio de cultivo *in vitro* (FIGURA 10).

Desta forma pode-se afirmar que a concentração de nitrogênio e a razão de suas formas podem influenciar a divisão celular, diferenciação, crescimento e desenvolvimento de plantas na cultura de tecidos (SILVESTRE *et al.*, 2019). Sendo assim, Hand e Reed (2014) afirmam que o nitrogênio é fortemente dependente da cultivar.

Quanto às plantas que foram aclimatizadas deste experimento, foi observado que o tipo de amostra e as formulações, proporcionaram diferenças dos resultados com relação às variáveis avaliadas, assim como nas estas de germinação e estabelecimento. Sugerindo que as plantas *ex vitro* sofreram efeito dos tratamentos.

Sendo assim, constatou-se efeito isolado das formulações para a altura da parte aérea (APA) e combinado para o número de pares de folhas expandidas (NPFE).

As plantas de todas as amostras deste experimento tiveram maior altura as que

foram submetidas durante o cultivo *in vitro* no meio WPM (TABELA 7).

TABELA 7 - Altura da parte aérea (APA) das plantas de *U. guianensis*, aos 30 dias de aclimatização em casa de vegetação, UFAC, Rio Branco, Acre, 2019

Meios de cultivo	APA (cm)
MS	2,98 c
WPM	5,41 a
MS25%	4,24 b
MS50%	3,60 bc
MS75%	3,62 bc

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE C.

Com relação ao NPFE, observou-se que as plantas da amostra 1 apresentaram quantidades de folhas semelhantes, independente da origem dos meios de cultivo. Para a amostra 2, as plantas sob efeito de tratamentos com o WPM, se apresentaram com médias superiores com relação aos outros meios de cultivo. Já para a amostra 3, as plantas sob efeito de tratamentos com o WPM, foi superior apenas as estabelecidas no meio MS pleno (TABELA 8).

TABELA 8 - Número de pares de folhas expandidas (NPFE) de *U. guianensis*, aos 30 dias de aclimatização em casa de vegetação, Rio Branco, Acre

Amostras	Meios				
	MS	WPM	MS25%	MS50%	MS75%
1	5,90 aA	6,20 aA	5,70 aA	6,00 aA	5,60 aA
2	4,10 cB	6,10 aA	4,88 aB	4,30 bB	4,71 aB
3	5,00 bB	6,10 aA	5,10 aAB	5,60 aAB	5,60 aAB

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (PC: Parque Chico Mendes; PZ: Parque Zoobotânico e SM: Sena Madureira);

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE C.

Quanto às amostras em cada formulação, observou-se que as plantas aclimatizadas oriundas dos meios de cultivo com WPM, MS25% e MS75% foram semelhantes independentes do tipo de amostras. Já, para o meio MS pleno, as amostras 1 foi superior as demais, e no meio MS50%, as amostras 1 e 3 foram semelhantes.

O presente estudo possibilitou verificar a eficiência dos processos de germinação, estabelecimento e formação de plantas oriundas de sementes coletadas

a partir de matrizes de *Uncaria guianensis* cultivadas em locais distintos e submetidas a formulações de meios de cultivo *in vitro*.

Mediante estas etapas, observou que o meio WPM neste experimento se destacou ou sempre esteve entre os melhores, desde as variáveis avaliadas das medidas de germinação, crescimento e posterior aclimatização.

A formulação do meio de cultivo *in vitro* MS pleno é bastante utilizada na cultura de tecidos em diversas espécies, no entanto, algumas espécies não se adaptam ao mesmo, quanto ao crescimento e desenvolvimento.

Gamborg *et al.* (1976) afirmaram que os altos níveis de íons de amônio podem interferir em vários processos de crescimento das plantas. A formulação de meio de cultivo WPM é um tipo de meio básico para plantas lenhosas que contêm quantidades menores dos sais de macronutrientes. Tanto o meio MS diluído como o WPM, são amplamente utilizados para plantas lenhosas, mas vale salientar, que ainda que o meio MS, o WPM possui ainda menor quantidade de nitrogênio total e amônio (PHILLIPS; GARDA, 2019).

4.2 EXPERIMENTO 2

A análise de variância identificou efeito isolado para o fator concentrações de BAP, nas variáveis números de brotações (NB) e tamanho da maior brotação (TMB) para o primeiro subcultivo (Apêndice D), e efeito isolado para os dois fatores nas variáveis NB e TMB, para o segundo subcultivo (Apêndice F).

As brotações emitidas no primeiro subcultivo não foram influenciadas pelas diferentes condições ambientais do cultivo *in vitro*, sugerindo que a espécie se adaptou inicialmente às diferentes fontes de luz. A citocinina exógena utilizada ainda neste subcultivo influenciou em suas concentrações independentes da fonte de luz. No entanto, no segundo subcultivo, a citocinina exógena e as fontes de luz influenciaram de forma distintas nas variáveis respostas para a espécie.

De acordo com Casal (2013), as plantas respondem de forma complexa as mudanças da sinalização luminosa, pois a percepção da qualidade e quantidade de luz pelos fotorreceptores (fitocromos) podem modificar o crescimento delas em conformidade com a mudança ambiental. Sendo assim, a fotomorfogênese pode ser parcialmente adaptada pelo crescimento de plântulas na presença de citocinina

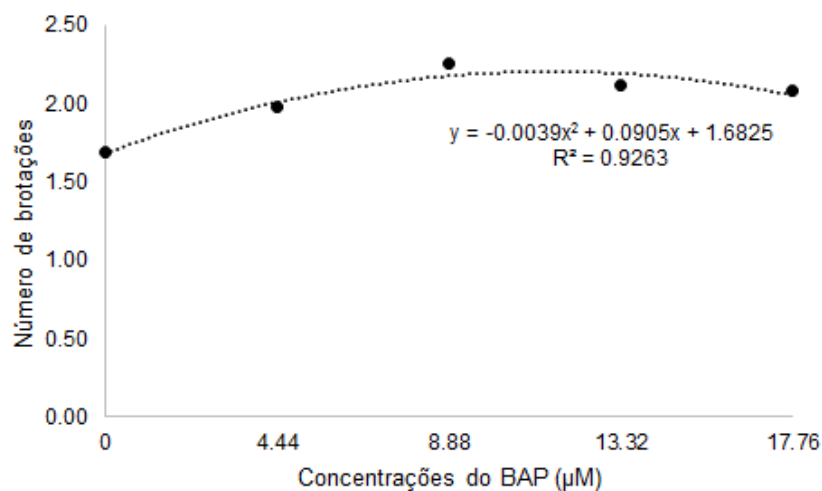
exógena ou por elevação de citocinina endógenas (CHORY *et al.*, 1994; LOCHMANOVA *et al.*, 2008).

Segundo Kurepin e colaboradores (2014), as plantas utilizam citocininas endógenas que respondem rapidamente tanto na biossíntese quanto no metabolismo catabólico das mudanças ambientais em seu habitat.

Desta forma, correspondendo ao primeiro subcultivo de *U. guianensis*, o número de brotações (NB) foi influenciado apenas pelas concentrações de BAP utilizadas, promovido até uma concentração máxima do fitorregulador (FIGURA 11).

O número de brotações apresentou comportamento quadrático, em que, se observou incremento de brotações (2,20 brotações/explante) na concentração de 11,60 μM de BAP.

FIGURA 11 - Número de brotações (NB) em cada concentração do BAP, no primeiro subcultivo, a partir de segmentos nodais de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

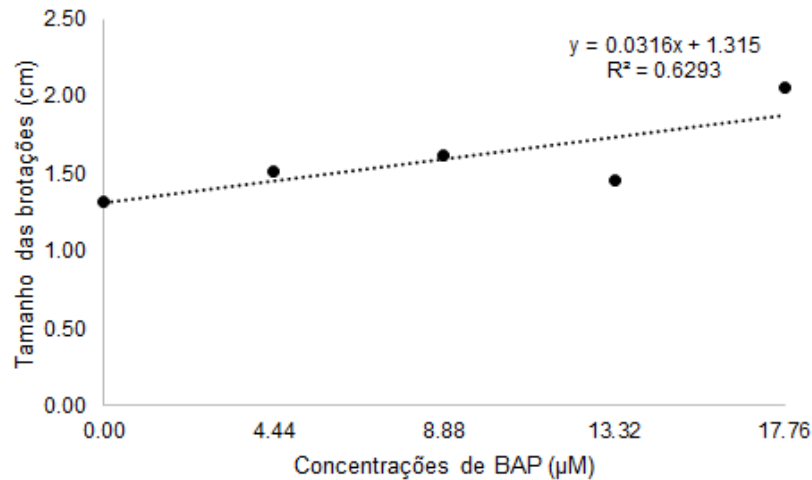


(¹) Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE D

Para o tamanho das maiores brotações (TMB), observou-se que o BAP adicionado no meio de cultivo influenciou de modo proporcional na resposta desta variável com o aumento de suas concentrações. A resposta para esta variável, foi de uma reta linear crescente.

Desta forma, esta citocinina exógena foi responsiva para a multiplicação de plantas de *Uncaria guianensis* durante este cultivo, uma vez, que o tamanho das brotações aumentou com a presença do fitorregulador. Observou-se que o TMB a partir dos segmentos ausentes de BAP variou de 1,32 cm a 2,05 cm quando utilizado a maior concentração de 17,76 μM (FIGURA 12).

FIGURA 12 - Tamanho da maior brotação (TMB) em cada concentração de BAP, no primeiro subcultivo, a partir de segmentos nodais de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019



(¹) Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE D

Para o segundo subcultivo, o número de brotações (NB) e o tamanho das maiores brotações (TMB) tiveram influência tanto da fonte de luz quanto para as concentrações do BAP utilizadas.

O número de brotações e a altura delas foram influenciados pela fonte de luz, do tipo lâmpada fluorescente tubular, em ambas variáveis.

A luz do tipo fluorescente tubular promoveu maior ($p > 0,05$) número de brotações (NB) com relação às demais fontes de luzes utilizadas (TABELA 9). Observou-se também que as duas fontes de luz LED, induziram número de brotações semelhantes.

TABELA 9 - Número de brotações (NB) de *U. guianensis*, no segundo subcultivo a partir de segmentos nodais, Rio Branco, Acre, 2019

Tipo de luz	NB
Fluorescente	2,14 a
Módulo Green Power	1,86 b
LED tubular	1,89 b

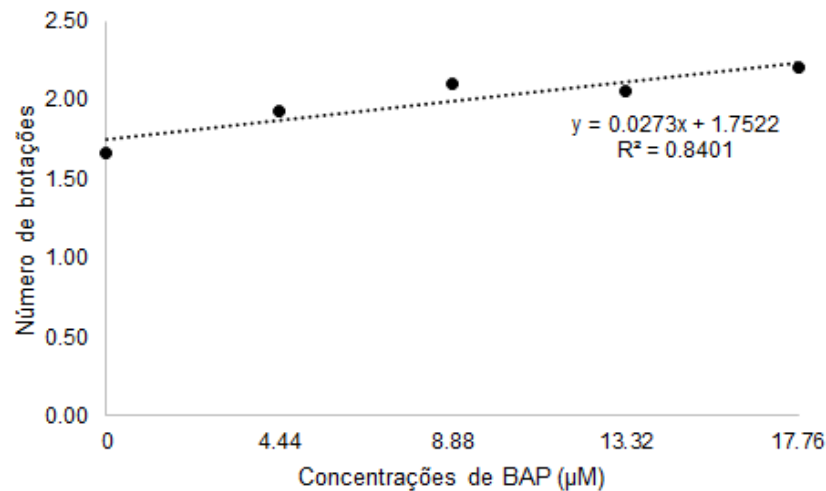
(¹) As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade;

(²) Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE F.

O número de brotações (NB) neste subcultivo, foi maior à medida que aumentava a concentração de BAP, já para o tamanho das maiores brotações (TMB) ocorreu até uma concentração ideal utilizada do fitorregulador.

A resposta da curva para o NB se comportou de forma linear crescente para as concentrações utilizadas de BAP, em que a média do número de brotações variou de 1,67 brotações/explante da ausência até a maiores concentrações de BAP com 2,21 brotações/explante (FIGURA 13).

FIGURA 13 - Número de brotações (NB) de *U. guianensis* em cada concentração de BAP, no segundo subcultivo a partir de segmento nodais, Rio Branco, Acre, 2019



(1) Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE F.

A concentração máxima utilizada neste experimento proporcionou maiores números de brotações, provavelmente concentrações de BAP acima de 17,76 µM de BAP sejam capazes de obter seu limite máximo desta variável até o decréscimo do mesmo. O mesmo efeito isolado para os tipos de luz e concentração de BAP, foram evidenciados para o tamanho da maior brotação (TMB) (TABELA 10).

TABELA 10 - Tamanho da maior brotação (TMB) de *U. guianensis*, no segundo ciclo de multiplicação, Rio Branco, Acre, 2019

Tipo de luz	CMB (cm)
Fluorescente	2,13 a
Módulo Green Power	1,46 b
LED tubular	1,66 b

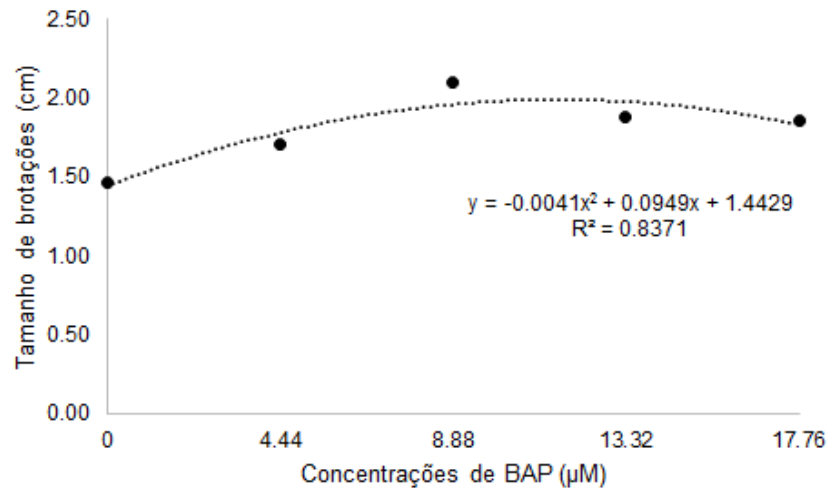
(1) As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade;

(2) Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE F.

A luz do tipo fluorescente tubular promoveu maiores TMB com relação aos outros tratamentos. De forma semelhante para a variável NB, em que as lâmpadas LEDs promoveram respostas iguais para o TMB.

O tamanho da maior brotação (TMB) apresentou comportamento quadrático, em que, valores do TMB (1,99 cm) foram observados na concentração de 11,60 μM de BAP (FIGURA 14).

FIGURA 14 - Tamanho da maior brotação (TMB) em concentrações de BAP, no segundo subcultivo, a partir de segmentos nodais de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019



(1) Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE F.

A fonte de luz tradicional no cultivo *in vitro* é a lâmpada tubular fluorescente, no entanto, o seu consumo de energia é mais oneroso e produz um comprimento de onda (350-750 nm) desnecessário para o desenvolvimento da planta (BELLO-BELLO *et al.*, 2017). Apesar deste autor afirmar que possuem desvantagens com relação a forma de transferência de luz e ao comprimento de onda, estudos já foram divulgados a comprovação que plantas podem se desenvolver melhor sob esta condição.

Conforme resultados semelhantes ao presente estudo com relação ao destaque para a lâmpada tubular fluorescente, foi observado em experimento realizado por Cruz (2018) com *Vaccinium ashei* Reade (Ericaceae), uma planta medicinal, exótica e presente no Brasil, quando propagada a partir de segmentos nodais sob três tipos de espectro de luz, modificando de acordo com a proteção com acetato vermelho, azul e fluorescente normal, mantidas em meio WPM com e sem a presença de 2-iP (citocinina exógena). Aos 60 dias, observaram que a altura das brotações foram superiores na condição de cultivo com lâmpadas tubulares fluorescentes.

Experimento realizado por Maluta *et al.* (2013) com cana-de-açúcar realizando cinco subcultivos à cada duas semanas, observaram que à altura das brotações, em

diferentes qualidades de luz (LED vermelha e azul, em diferentes proporções) e fluorescente branca, resultou em maiores médias de altura foi sob luz fluorescente branca.

No presente estudo, foi observado que a espécie emite brotações a partir dos segmentos nodais independente do fitorregulador. No entanto, a presença do BAP, favoreceu maior número de brotações por explante.

Em estudos realizados por Raposo e Teixeira (2011) trabalhando com a unha-de-gato cultivada *in vitro*, os autores afirmaram não ser necessário adicionar o BAP para induzir formação de brotações múltiplas. Contudo, para espécie do mesmo gênero (*Uncaria tomentosa*), cultivada *in vitro* a partir de segmentos nodais em meio MS sólido com 10 mg.L⁻¹ de BAP por 30 dias, e subcultivados no mesmo meio básico com 2 mg.L⁻¹ de BAP, observaram que o fitorregulador favoreceu maior número de brotações adventícias (VENUTOLO, 2010).

Pesquisas recentes realizadas por Souza *et al.* (2019) utilizaram BAP em 0,0; 1,12; 2,25 e 3,37 mg.L⁻¹ em meio MS, e observaram que a indução das respostas morfogênicas do hipocótilo em *Genipa americana* (Rubiaceae), formaram calos e posterior indução de brotações nas concentração de 1,12 mg.L⁻¹ de BAP, e o aumento em 3,37 mg.L⁻¹ não se mostrou eficaz na indução de brotações adventícias. No presente estudo, o primeiro subcultivo teve uma concentração ideal para o número de brotações, que foi até 2,62 mg.L⁻¹ de BAP e com maiores concentrações, também não favoreceu a indução de brotações.

Sá e colaboradores (2016) efetuaram a indução de brotações adventícias em *Genipa americana* (Rubiaceae), avaliados aos 30, 60 e 90 dias em função de duas concentrações de BAP (0 e 1 mg.L⁻¹), e verificaram que o maior número de brotações foi na presença deste fitorregulador.

A porcentagem de brotações em *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), uma planta medicinal, cultivada por 30 dias na presença do BAP, apresentou maior número de brotações sob concentrações de 1,8 mg.L⁻¹, e que maiores concentrações a esta, se apresentou menos efetiva, conforme Silva *et al.* (2015).

Segmentos nodais da planta medicinal *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), cultivados em meio MS com o BAP, nas concentrações 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg.L⁻¹, apresentaram aumento significativo do número de brotações, verificou-se uma tendência linear proporcional ao aumento da concentração do regulador de

crescimento, obtendo-se média de 2,2 brotos por explante na concentração de 10 mg.L⁻¹ (GOELZER *et al.*, 2019).

Shekhawat *et al.* (2015) realizaram o aprimoramento de multiplicação de *Morinda citrifolia* (L.) (Rubiaceae) através de explantes nodais, na qual testaram o BAP nas concentrações de 1 à 6 mg.L⁻¹. Logo, verificaram que as concentrações de 4 mg.L⁻¹ de BAP, promoveram aumento no números de brotações, em média de 4,6 brotações.

Na multiplicação com hortelã-pimenta (Lamiaceae), planta medicinal, micropropagada por segmentos nodais em meio MS com BAP de 1 e 2 mg.L⁻¹, resultando em maior número de brotações nas concentrações 2 mg.L⁻¹ de BAP (ASMAR *et al.*, 2011). No presente estudo, as concentrações de BAP também tiveram comportamento linear para o número de brotações em que foram observadas nas concentrações de 4 mg.L⁻¹ deste fitorregulador em plantas estabelecidas no segundo subcultivo de *U. guianensis*.

Leitzke *et al.* (2010), realizaram micropropagação com a frutífera amoreira-preta (*Rubus* sp. Cultivar Xavante) (Rosaceae), testando dois tipos de meio de cultura (MS e WPM), com o BAP, em três concentrações (7,5; 15 e 22,5 µM). Como resultados observados por estes autores, o maior número de brotações foi em meio MS com adição de BAP com 13,33 µM. E para o BAP em meio WPM, o número de brotações aumentaram à medida que se aumentava a concentração desta citocinina.

É importante salientar que o sucesso de uma cultura a ser cultivada com a presença de fitorregulador, depende do tipo e da concentração de citocinina aplicada, pois sua absorção, transporte e metabolismo diferem entre espécies de plantas, bem como podem interagir com as citocininas endógenas (VAN STADEN *et al.*, 2008).

Posteriormente, avaliando-se o tamanho da maior brotação, no primeiro subcultivo deste experimento, observou-se que os segmentos necessitaram de concentrações maiores para responderem, em que, quanto maior a concentração do BAP inserida no meio, maior o tamanho das plantas. No segundo subcultivo, o tamanho foi influenciado até uma concentração, e posteriormente os explantes se apresentaram com tamanhos menores.

Anjusha *et al.* (2016) trabalhando com a planta medicinal *Gynochthodes umbellata* (Syn: *Morinda umbellata*) (Rubiaceae) cultivada em meio MS com o BAP nas concentrações de 0 a 5 mg.L⁻¹, micropropagadas a partir de segmento nodais, foi avaliada aos 30 dias de cultivo. A citocinina na concentração de 2 mg.L⁻¹ propiciou a

melhor média para o número de brotações e tamanho delas, e que em concentrações elevadas a esta, os efeitos foram negativos, com decréscimo.

Avaliando a organogênese em brotações adventícias na planta medicinal *Paederia foetida* L. (Rubiaceae), Behera e seus colaboradores (2017) observaram que no meio de cultivo MS com o BAP nas concentrações 0,0; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0 mg. L⁻¹, verificaram uma média de 6 brotações/explante e de 3 cm no tamanho delas após 30 dias de cultivo no meio MS com 3 mg.L⁻¹ de BAP.

Zayova *et al.* (2013) utilizando o BAP no meio MS para a multiplicação com duas concentrações de 0,5 e 1 mg.L⁻¹, para a espécie medicinal *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae), observaram o dobro de brotações adventícias com 1 mg.L⁻¹ de BAP, uma média de 3,6 brotações/explante, após 4 semanas de cultivo.

De Hsie e colaboradores (2019) realizando a multiplicação com a espécie medicinal, *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae), através de segmentos nodais na presença do BAP, nas concentrações 0,0; 2,22; 6,66; 11,10 e 15,54 µM, observou que aos 45 dias de cultivo, o comprimento das brotações foi reduzido acima de 11,10 µM, variando entre 1,16 e 1,19 cm.

Observado por Asmar *et al.* (2012) em plantas medicinais de *Lippia alba* (Verbenaceae) aos 60 dias de estabelecidos os segmentos nodais em meio MS com o BAP nas concentrações de 0,0; 0,5, 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹, observaram-se que o tamanho das brotações foi maior na ausência deste regulador e o BAP interferiu de forma negativa nesta variável.

Experimento conduzido por Garlet *et al.* (2011) com a planta medicinal *Mentha x gracilis* Sole (Lamiaceae), multiplicada a partir de segmentos nodais, cultivada no meio MS com concentrações de BAP de 0,5;1,0 e 2,0 µM, em que após 30 dias foi avaliado quanto ao comprimento das brotações, e observaram uma redução do alongamento com o aumento do BAP de 2,2 cm (0,5 µM) para 1,7 cm (2,2 µM).

O tamanho da maior brotação no primeiro subcultivo ausente de fitorregulador foi de 1,32 cm, até a máxima concentração de BAP foi de 2,05 cm, no segundo subcultivo o tamanho ausente de fitorregulador foi de 1,50 cm, aumentando com o BAP para 1,99 cm. Pode-se observar que o BAP favoreceu o alongamento das brotações em cada subcultivo dos explantes de *U. guianensis* neste experimento, demonstrando que o explante foi responsivo.

Para as variáveis respostas dos explantes para o teor de pigmentos fotossintéticos, observou-se efeito combinado para a clorofila a (Chl a e total) no

primeiro subcultivo, e efeito isolado para os dois fatores para a clorofila b (Chl b) (Apêndice E). Para o segundo subcultivo, constatou-se efeito isolado para as concentrações utilizadas do BAP, nas clorofilas (a, b e total) e para os carotenóides (Apêndice G).

Constatou-se que a presença do BAP, influenciou na Chl a, nas maiores concentrações deste fitorregulador para as três fontes de luz. O tratamento L2 se destacou ($p < 0,05$) com relação aos demais, nas concentrações do BAP em 13,32 e 17,76 μM (TABELA 11).

TABELA 11 - Clorofila a (Chl a) e total nos tipos de luz em concentrações de BAP no primeiro subcultivo *in vitro* de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

Fonte de variação	Pigmentos		
	Fontes de Luz		
	Clorofila a (Chl a) (mg.g^{-1} MF)		
BAP $\mu\text{M/L}$	L1	L2	L3
0	1,00 aA	1,37 aA	1,93 aA
4,44	0,19 bcA	0,36 bA	0,65 bA
8,88	0,58 abA	0,41 abA	0,19 bA
13,32	0,46 abAB	0,77 abA	0,21 bB
17,76	0,18 cB	0,43 bA	0,24 bAB
	Clorofila total (Chl total) (mg.g^{-1} MF)		
0	1,57 aB	1,96 aAB	3,27 aA
4,44	1,00 abA	0,69 bA	1,03 bA
8,88	0,71 abA	0,78 abB	0,52 bA
13,32	0,45 bA	1,12 abA	0,75 bA
17,76	0,28 bA	0,62 cA	0,82 bA

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (L1: Fluorescente; L2: Módulo Green Power e L3: LED tubular);

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE E.

A presença da citocinina independente dos diferentes tipos de luz, influenciou de forma negativa nas médias para a Chl a e total. Foi observado que para a clorofila total, as médias diferiram nos tratamentos ausentes de BAP e nas concentrações de 8,88 μM (TABELA 11). No presente estudo ficou evidenciado que os pigmentos fotossintéticos de Chl a e total foram influenciados com a utilização de BAP. O que de

fato, podemos observar que as maiores médias foram na ausência deste fitorregulador, independente dos tipos de luminosidades estudadas nas condições de cultivo *in vitro*.

Sendo assim, para a clorofila b (Chl b), as condições do tipo de luz, no tratamento L2 foi o que apresentou maior ($p < 0,05$) média com relação ao tratamento L1, já o tratamento L3, foi similar ($p > 0,05$) aos demais tratamentos.

TABELA 12 - Clorofila b (Chl b) nos tipos de luz e nas concentrações de BAP no primeiro subcultivo *in vitro* de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

Fonte de variação	Clorofila b (Chl b) mg.g ⁻¹ de MF
Tipos de luz	
L1	0,32 b
L2	0,59 a
L3	0,40 ab
Concentrações de BAP (µM)	
0	0,83 a
4,44	0,32 b
8,88	0,37 b
13,32	0,38 b
17,76	0,29 b

(¹) As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade. (L1: Fluorescente; L2: Módulo Green Power e L3: LED tubular);

(²) Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE F.

Foi observado que a ausência de BAP propiciou maiores médias de pigmentos de clorofila b, tal comportamento já havia sido observado para as Chl a e total deste estudo.

As clorofilas a e b absorvem luz de comprimentos de ondas diferentes, em que ao absorverem luz, a Chl b torna-se excitada, dissipando esta energia para a Chl a, em que, segundo Casal (2013), a composição do tipo de espectro de luz, que é o caso destes tipos de luzes utilizadas neste experimento, pode alterar o equilíbrio entre os fotossistemas I e II.

Rocha e colaboradores (2010) cultivaram plantas *in vitro* de morangueiro (Rosaceae) sob luz vermelha, azul, fluorescente e verde, observaram que a maior média de pigmentos fotossintéticos de Chl b foi sob luz vermelha, em 0,87 mg.g⁻¹ de MF. Resultados foram semelhantes ao supracitado, em que o teor de pigmentos de

Chl b no presente estudo foi superior ao tratamento L2 deste mesmo pigmento comparado ao tratamento L1.

Para o segundo subcultivo, observou-se que o teor de Chl a e total nos tratamentos com ausência e nas menores concentrações de BAP, os tratamentos diferiram ($p < 0,05$) entre si. Para a Chl b, o tratamento com a menor concentração de BAP diferiu do tratamento com 13,32 μM do fitorregulador, e nos carotenóides, o tratamento ausente da citocinina diferiu dos tratamentos com 13,32 e 17,76 μM .

TABELA 13 - Clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), total e carotenóides (Car.) nas concentrações de BAP no segundo subcultivo *in vitro* de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

BAP (μM)	Pigmentos fotossintetizantes (mg.g^{-1} de MF)			
	Chl a	Chl total	Chl b	Car.
0	1,28 a	1,81 a	0,52 ab	0,21 a
4,44	1,28 a	1,85 a	0,56 a	0,19 ab
8,88	0,82 b	1,18 b	0,35 abc	0,16 ab
13,32	0,60 b	0,88 b	0,28 c	0,13 b
17,76	0,76 b	1,10 b	0,33 bc	0,13 b

⁽¹⁾ As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade;

A adição de citocininas são um dos principais reguladores *in vitro* que podem afetar o desenvolvimento e função do aparelho fotossintético de brotações, esta afirmação é relatada por Dobránszki e Mendler - Drienyovszki (2014) que obtiveram estas respostas com experimento em macieira (Rosaceae) com intuito de indução de brotações *in vitro* em meio MS com 1 mg L^{-1} de BAP. Estes autores verificaram que esta concentração do BAP influenciou de forma negativa o teor de clorofila a, b e total após ter avaliado em 4 semanas cultivo *in vitro*.

Experimentos de Genkov *et al.* (1997) em que avaliaram o efeito do BAP sobre os pigmentos fotossintéticos de brotações axilares de *Dianthus caryophyllus* L. (Caryophyllaceae), em que aos 40 dias foi observado que 0,4 mM inibiu o conteúdo fotossintético, concluindo que pode ter ocasionado uma ruptura do aparelho fotossintético, e em particular redução da abundância do complexo relativo para os centros de reação em folhas com um menor teor de pigmento.

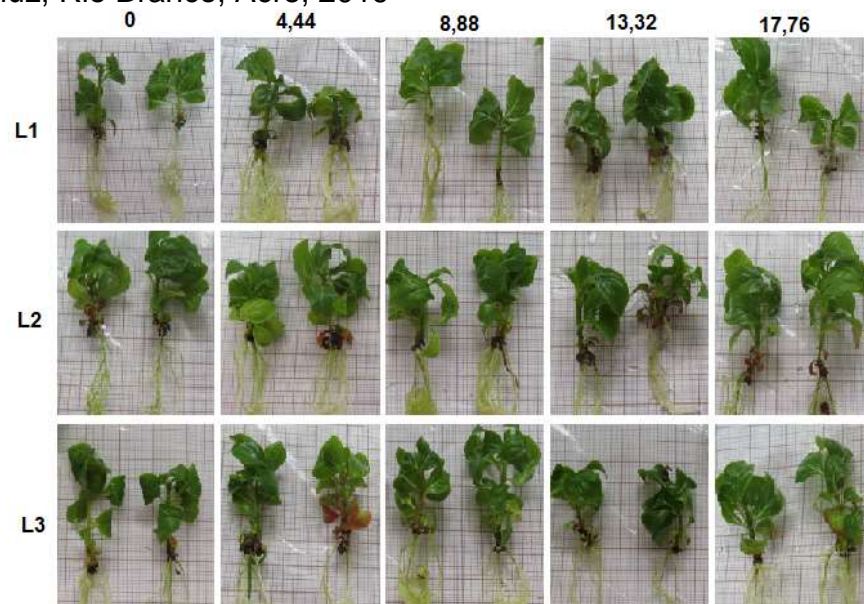
Experimentos realizados com plantas do gênero *Musa* spp. Aremu *et al.* (2012) testaram BAP e derivados do metaTopolin (citocinina), nas concentrações de 0, 10,

20 e 30 μM no meio MS, em condições de 16 horas de luz, em lâmpadas fluorescentes com fluxo de fóton de 45 $\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}$ estabelecidas até 70 dias, observaram que o período de cultivo de bananeira cultivar 'Willians' prolongada após 50 dias causou um efeito prejudicial de forma decrescente sobre o teor de clorofila a.

Cortleven e Schmulling (2015) afirmam que plantas cultivadas sobre um estado alterado de citocinina apresentam estrutura e função dos cloroplastos alterados, pois a adição de citocininas mais do que o nível normal acarreta no desenvolvimento de cloroplastos inapropriados. Podendo ser confirmado, pelos dois subcultivos, em que a presença da citocinina exógena afetou o teor de clorofila a e total, comparando com os tratamentos ausente de BAP.

Após os dois subcultivos, observou-se que as plantas no restabelecimento, não apresentaram diferenças significativas quanto as variáveis avaliadas (APÊNDICE H), conforme figura 15.

FIGURA 15 - Plantas de *U. guianensis* restabelecidas, após dois subcultivos de 60 dias na presença de concentrações de BAP em diferentes fontes de luz, Rio Branco, Acre, 2019

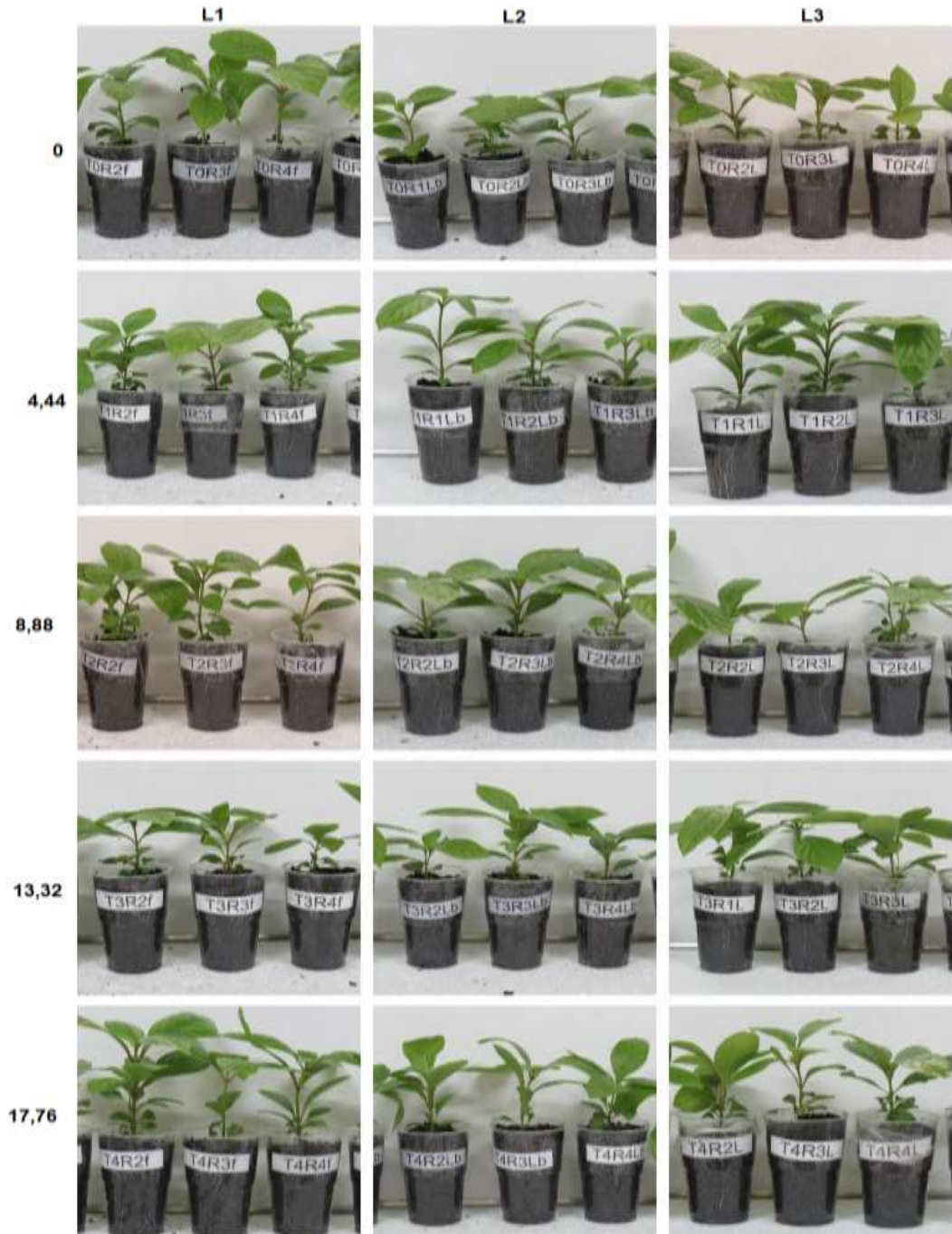


Nesta etapa, todas as plantas estavam enraizadas aos 60 dias, independente da presença ou ausência do fitorregulador dos subcultivos anteriores.

No período de aclimatização, as plantas que foram transferidas para o cultivo *ex vitro* tiveram 100% de sobrevivência, com características de boas condições

fitossanitárias. A representação das plantas após os 37 dias de aclimatização pode ser visualizada na figura a seguir (FIGURA 16).

FIGURA 16 - Plantas de *U. guianensis* oriundas de propagação *in vitro*, e posterior aclimatização em mini estufa da UFAC, Rio Branco, Acre, 2019



(¹) L1: Fluorescente; L2: Módulo green power e L3:LED tubular

As plantas em condições *ex vitro* diferiram ($p > 0,05$) quanto ao efeito dos tratamentos para as fontes de luz para a variável número de pares de folhas

expandidas (NPFE) (Apêndice I). As plantas submetidas aos tratamentos L2 e L3 diferiram quanto ao NPFE (TABELA 14).

TABELA 14 - Número de pares de folhas expandidas (NPFE), avaliadas após a aclimatização de plantas de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

Tipo de luz	NPFE
L1	6,20 ab
L2	5,44 b
L3	6,40 a

⁽¹⁾ As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade;

⁽²⁾ Ver Apêndice I. (L1: Fluorescente; L2: Módulo Green Power e L3: LED tubular);

Com relação ao acúmulo de massa fresca e seca pós aclimatização, houve interferência apenas com relação a massa seca da parte aérea (MSPA). Em que se observou efeito dos tratamentos com o BAP, apenas nas menores concentrações utilizados *in vitro*.

Com relação aos tipos de luz, para L1 e L2 as plantas não sofreram fator de interferência independente das concentrações que foram cultivadas, já para a L3, as plantas cultivadas *in vitro* com 4,44 μM de BAP diferiu das cultivadas *in vitro* ausente de regulador durante o cultivo *in vitro*. A plantas cultivadas sob LED tubular foram favorecidas na MSPA pelo maior número de brotações com efeito de tratamentos do cultivo *in vitro*, uma vez, que também obtiveram maior número de folhas expandidas.

TABELA 15 – Massa seca da parte aérea (MSPA) de *U. guianensis* aos 37 dias de aclimatização, oriundas do cultivo *in vitro*, Rio Branco, Acre, 2019

Fonte de Variação	Concentrações de BAP (μM)				
	0,00	4,44	8,88	13,32	17,76
Tipo de luz	MSPA (g)				
L1	0,44 aA	0,31 bA	0,42 aA	0,30 aA	0,42 aA
L2	0,36 aA	0,30 bA	0,29 aA	0,27 aA	0,29 aA
L3	0,27 aB	0,53 aA	0,32 aAB	0,28 aB	0,34 aAB

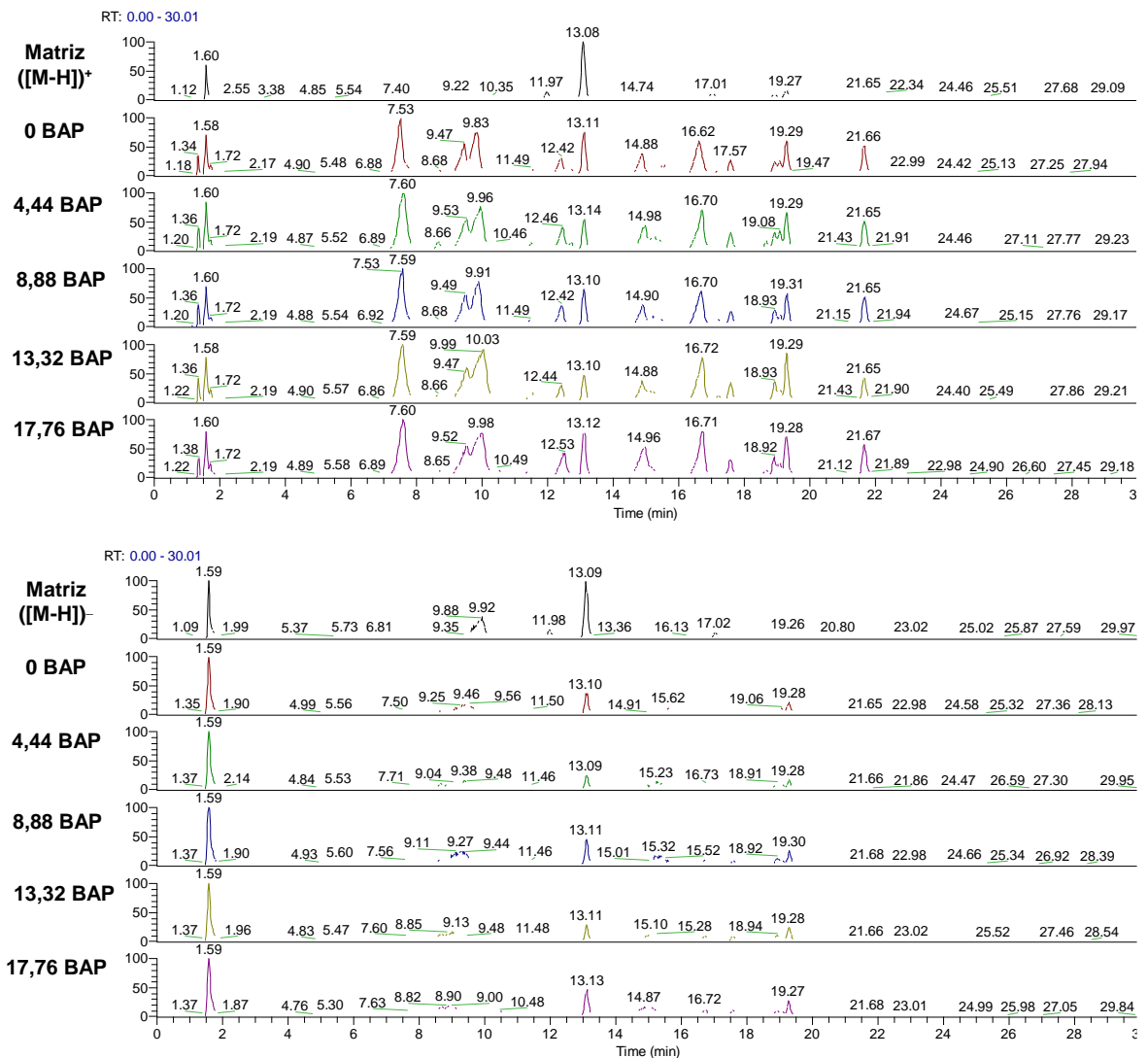
⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (L1: Fluorescente; L2: Módulo Green Power e L3: LED tubular);

⁽²⁾ Ver Apêndice I.

A seguir, avaliando-se os extratos das plantas aclimatizadas sob efeito dos tratamentos cultivados com o BAP, verificou-se que os picos na cromatografia apresentaram semelhanças com relação aos parâmetros propostos.

O perfil cromatográfico das folhas foram comparados empregando como parâmetros o tempo de retenção (Tr) e o espectro de absorção molecular obtido através do detector de arranjo de diodos acima de 30 de intensidade (FIGURA 17).

FIGURA 17 - Perfil cromatográfico comparativo das folhas de *U. guianensis* (matriz) e das cultivadas *in vitro* sob efeito de concentrações de BAP, Rio Branco, Acre, 2019



Desta forma, observou-se que em todas as amostras, houveram semelhanças de dois picos, com o tempo de retenção em comum. Os perfis cromatográficos foram

avaliados tanto dos modos positivo e negativo, dos picos para a planta matriz de *U. guianensis* e dos tratamentos conduzidos durante o cultivo *in vitro*.

O perfil cromatográfico da planta matriz de *Uncaria guianensis* se apresentou com dois picos e únicos, entre os tempos de retenção de zero e dois minutos e entre 12 e 14 minutos. As plantas propagadas *in vitro*, se apresentaram com maior número de picos do que a planta matriz.

A presença ou ausência do BAP, para o modo positivo não teve influência na qualidade do perfil, como também no modo negativo. A citocinina não foi a responsável pela qualidade do perfil cromatográfico das plantas cultivadas *in vitro*. Um dos fatores que podem ter interferido na qualidade do perfil, podem ser a idade das plantas e as condições ambientais e nutricionais das plantas cultivadas *in vitro*, segundo Moraes (2012).

Em experimento realizado por Freitas (2017) ao avaliar o perfil dos metabólitos secundários em plantas micropropagadas de *Vernonia condensata* Baker, com o uso de BAP em 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg L⁻¹, observou que aos 45 dias os componentes majoritários não diferiram quanto a presença ou ausência de BAP, mas diferiu com relação a planta matriz, apresentando-se componentes semelhantes entre a matriz e as plantas *in vitro*.

Rout *et al.* (2010) afirmam que o acúmulo de metabólitos secundários em cultura de tecidos vegetais, dependem do tipo e concentrações de reguladores de crescimento.

A partir dos perfis cromatográficos das informações obtidas dos tratamentos foi construída uma tabela contendo o número do pico, tempo de retenção (Tr), máximos de absorvância (λ) do espectro de UV e a massa molecular (m/z) (QUADRO 1). As substâncias foram sugeridas de acordo com os íons relatados na literatura para a espécie.

QUADRO 1 - Triagem fitoquímica dos picos semelhantes dos extratos alcoólicos das folhas de *U. guianensis* de planta de campo com as cultivadas *in vitro*, Rio Branco, Acre, 2019

Tratamentos	Tr (min)	λ (nm)	(m/z -)(m/z+)
Primeiro pico			
Matriz	1,6	218	239; 141; 227
0			225; 387; 127; 141; 227
4,44			225; 116; 127; 195; 227
8,88			225; 116; 127; 195; 227

13,32			225; 127; 141; 195; 227
17,76			225; 387; 127; 141; 145; 195; 227
Segundo pico			
0	7,5	233	369; 385
4,44			
8,88			
13,32			
17,76			
Terceiro pico			
0	9,47	223	369
4,44			
8,88			
13,32			
17,76			
Quarto pico			
Matriz	9,83	224	191,385
0			191; 385
4,44			191; 385
8,88			191; 385; 386
13,32			191; 386
17,76			191; 385;386
Quinto pico			
Matriz	13,11	230;233	577; 287; 433; 579
0			
4,44			
8,88			
13,32			
17,76			
Sexto pico			
0	14,88	226	355; 369
4,44			
8,88			
13,32			
17,76			
Sétimo pico			
0	16,62	229	369
4,44			
8,88			
13,32			
17,76			
Oitavo pico			
0	21,66	229	369
4,44			
8,88			
13,32			
17,76			

Tr: tempo de retenção (minutos); λ : absorção (nanômetros); m/z (relação massa/ carga).

No pico nº 1 (m/z) com máximo de absorção de 218 nm, muito semelhante a um tipo de alcaloide, devido à massa 387,71 g/mol (m/z), com sua presença apenas nos tratamentos das plantas cultivadas *in vitro*, com ou sem a presença de BAP.

No pico nº 5 (m/z) com máximo de absorção de 230/233 nm, característico do grupo dos esteroides, denominado β -sitosterol glicosídeo, com massa de 576,859 g.mol⁻¹.

Foi relatado na morfoanatomia de folhas e caule de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*, afirmando que o β -sitosterol é o principal esteroide, que tem um efeito anti-inflamatório moderado (GATUSO, 2004; SENATORE *et al.*, 1989). Beta-sitosterol é um composto derivado de vegetais encontrado em plantas como arroz, trigo, milho, nozes, amendoim, e particularmente na *Uncaria tomentosa*, onde tem sido sugerido estar envolvido na doença de propriedades anti-inflamatórias (PANIAGUA-PÉREZ *et al.*, 2017). Esta substância foi isolada pela primeira vez em folhas de *Uncaria guianensis* por Rodríguez e colaboradores em 2011. Foi encontrada esta substância na casca e raiz de *Uncaria sessilifructus* (ZHANG *et al.*, 2014).

Os picos 2, 3, 4, 6, 7, 8 do modo positivo, o íon 369/386 ([M – H] +), pode sugerir a presença do marcador químico que é um tipo de alcaloide oxindólicos pentacíclicos, com massa de 368,17 g/mol. Estes picos não foram observados na planta matriz no modo positivo.

Por meio das análises em HPLC neste experimento, pode-se detectar a presença do mesmo ponto de retenção e do UV que são característicos desta molécula. Assim, no pico nº 5 no modo positivo, foi identificado o íon 433/579, podendo sugerir a substância caempferitrina.

Valente *et al.* (2009) realizando pela primeira vez o isolamento da caempferitrina, observou em análise com HPLC-DAD-MS a presença de um composto principal (cerca de 90% de pureza) em absorção em UV λ_{max} / nm: 230, 264 e 343, com um íon pseudomolecular M + 1 a m/z 579 (27%) e fragmento de íons m/z 433 e m/z 287 no MS. De acordo com os mesmos autores citado anteriormente, a triagem de caempferitrina em folhas, caules ou casca *U. guianensis* através das técnicas de HPLC-DAD-MS revelaram presença deste composto apenas nas folhas e caules em uma proporção quase 36 vezes maior nas folhas do que no caule.

As plantas cultivadas *in vitro* apresentaram de forma semelhante às substâncias idênticas da planta matriz, em comparação aos mesmos tempos de retenção dos picos. As plantas sob efeito de tratamentos com o BAP do cultivo *in vitro*

não teve influência no perfil qualitativo e nem nos íons presentes quando comparado as plantas ausentes de citocinina exógena.

No decorrer deste experimento, observou que a citocinina utilizada na constituição do meio de cultivo *in vitro* para a indução de brotações de *U. guianensis*, influenciou para as variáveis de crescimento e pigmentos fotossintetizantes, apenas quando inseridas no meio de cultura, não apresentando efeitos nas etapas seguintes na formação de plantas da espécie em estudo. Com relação à qualidade do perfil fitoquímico das folhas, de plantas submetidas a efeito de tratamentos, não apresentaram interferência da presença ou ausência da citocinina utilizada, em que a quantidade de picos no perfil das plantas cultivadas *in vitro* deve ser devido a outro fator, que não seja o BAP. No entanto, constatou-se que a qualidade do perfil das plantas cultivadas *in vitro* foram maiores do que a matriz de *U. guianensis*.

3.3 EXPERIMENTO 3

A presença do ácido salicílico na constituição dos meios de cultivo influenciou nas variáveis respostas das plantas de *U. guianensis*. Observou-se que as plantas até 60 dias de cultivo sobreviveram a estas condições em 100% dos tratamentos. No entanto, a concentração do AS resultou em diferenças significativas com relação às alturas das plantas dentro de cada concentração de AS, independentemente do tipo de explante utilizado neste experimento (FIGURA 18).

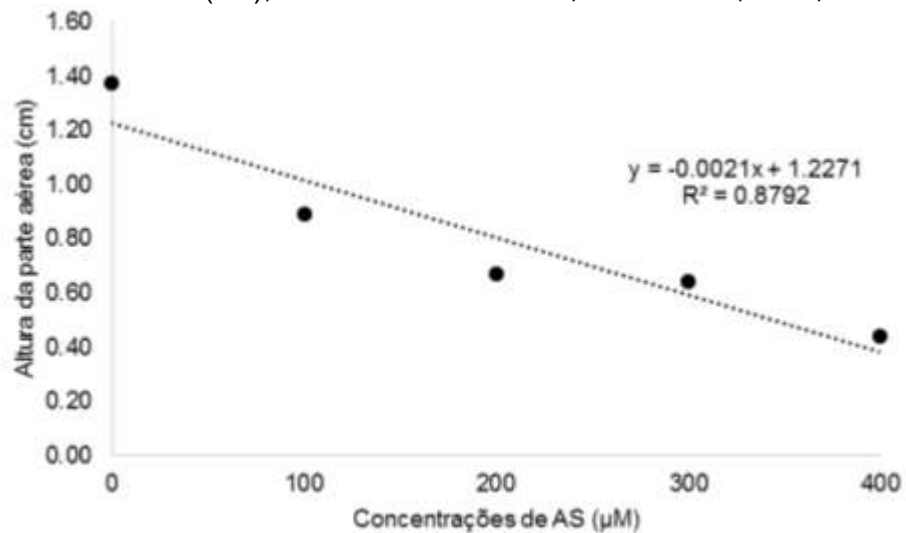
FIGURA 18 - Explantes das plantas de *U. guianensis* cultivados sob efeito de ácido salicílico (μM) *in vitro* aos 60 dias de estabelecidas, Rio Branco, Acre, 2019



Os segmentos responderam de forma linear decrescente em função do aumento da concentração do ácido salicílico. À medida que se aumentava a concentração do AS, reduzia-se o tamanho das plantas, tanto para os explantes oriundos de segmento apical como região mediana.

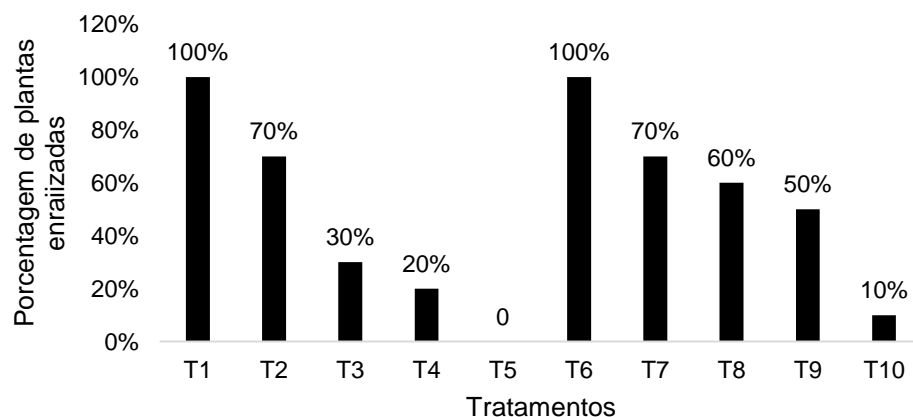
Os tamanhos iniciais dos explantes eram de 1,22 cm, e com o aumento da concentração de ácido salicílico, as brotações diminuía em 0,0021 cm. As plantas submetidas a estes tratamentos e a caracterização da variável altura da parte aérea, podem ser visualizadas na figura a seguir (FIGURA 19). Além da altura dos explantes, o AS influenciou também na porcentagem de enraizamento (FIGURA 20).

FIGURA 19 - Altura da parte aérea (APA) dos explantes em função das concentrações de ácido salicílico (AS), aos 60 dias de cultivo, Rio Branco, Acre, 2019



(1) Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE J.

FIGURA 20 – Porcentagem de enraizamento dos tipos de explantes em função das concentrações de ácido salicílico (AS) aos 60 dias de cultivo *in vitro*, Rio Branco, Acre, 2019



No tratamento T5 (região apical com 400 μM de AS), nenhuma planta enraizou, já o tratamento T10 (região mediana com 400 μM de AS) apenas 10% nesta mesma concentração enraizaram. O aumento da concentração de AS inibiu o enraizamento independentemente do tipo de explante utilizado neste experimento.

Moharramnejad *et al.* (2019) utilizando o AS nas concentrações de 50, 100 e 200 μM , observaram maior tamanho de brotações e raízes na concentração de 50 μM na cultura de *Estevia rebauniana*, com efeito negativo conforme as concentrações mais elevadas, ocasionando menor tamanho de plantas. Estes resultados corroboram no presente estudo, em que o aumento das concentrações de AS reduziu nas mesmas variáveis respostas em *U. guianensis*.

Experimento realizado por Brandão *et al.* (2016) com a espécie *Alternanthera tenella*, em que cultivou *in vitro* no meio MS acrescido de 0, 100, 200, 300 e 400 μM de ácido salicílico (AS), às variáveis de crescimento analisadas, altura, comprimento da raiz, número de gemas, massa fresca da parte aérea e raiz, o elicitor mostrou-se visivelmente prejudicial, tendo causado uma diminuição das médias observadas, já na menor concentração utilizada (100 μM).

Outras variáveis avaliadas nestes explantes foram os pigmentos fotossintetizantes, em que adição de AS interferiu apenas no teor de clorofila a (Chl a) e total. Na Chl a, a menor concentração utilizada de AS no meio de cultivo diferiu da maior concentração de AS no meio. Na Chl total, o comportamento foi semelhante ao da Chl a (TABELA 16).

TABELA 16 - Clorofila a (Chl a) e clorofila total ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) dos explantes de *U. guianensis*, em função das concentrações de ácido salicílico aos 60 dias de cultivo. Rio Branco, Acre, 2019

AS (μM)	Pigmentos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF)	
	Chl total	Chl a
0	2,52 ab	1,85 ab
100	3,23 a	2,38 a
200	2,37 ab	1,90 ab
300	1,95 ab	1,43 ab
400	0,93 b	0,70 b

⁽¹⁾ As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade;

⁽²⁾ Os pressupostos, análise de variância podem ser verificados no Apêndice K.

As concentrações de ácido salicílico podem potencializar uma gama de respostas metabólicas nas plantas, com relação aos parâmetros fotossintéticos e as relações hídricas das plantas (HAYAT *et al.*, 2010).

Conforme a literatura, foi encontrada que o AS influenciou nas avaliações de produção dos pigmentos fotossintéticos, em que na concentração de 100 μM em plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, avaliadas aos 24, 48 e 96 horas, verificaram que a clorofila a, b e total foram afetadas após 48 horas, o que ocasionou redução nas concentrações dos pigmentos em relação às plantas ausente de AS (LUCHO *et al.*, 2018).

Estes efeitos de redução nos pigmentos fotossintéticos com adição AS de plantas também foram relatados em trigo (*Triticum aestivum* L. Var. *Sonalika*) cultivadas *in vitro* foram submetidas em concentrações de AS (50, 500 e 1000 μM), e avaliadas após 7 dias quanto ao crescimento e clorofila, havendo um efeito retardador de AS sobre o crescimento e uma diminuição na concentração de clorofila, resultados verificados por Sahu e Sabat (2011).

Segundo Zaheer e Giri (2015) afirmaram que o AS não foi um bom promotor de crescimento no cultivo *in vitro* de brotações, o que resultou menor crescimento em comparação com o controle, nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM em plantas de *Andrographis paniculata*, avaliadas semanalmente, por dois meses.

Shabani *et al.* (2009) não observaram mudanças no crescimento das brotações com a adição de AS, nas concentrações 0,01; 0,1; 1,0 e 2,0 mM por 8, 24 e 48 horas de exposição de plantas cultivadas *in vitro* de *Glycyrrhiza glabra* var. *glabra*. Pedroso e colaboradores (2019) cultivou *in vitro* plantas de *Hyptis marruboides* na presença do AS nas concentrações de 50 e 60 μM em meio MS por 10 dias, subcultivados por 20 dias e avaliadas a cada três, seis e 20 dias quanto ao comprimento da parte aérea, não observando diferença entre estas concentrações com as plantas submetidas em meio sem o adição de AS.

Diante dos experimentos pesquisados, observou-se semelhança nas variáveis utilizadas neste experimento, havendo pouca tolerância das espécies a estas concentrações na presente pesquisa.

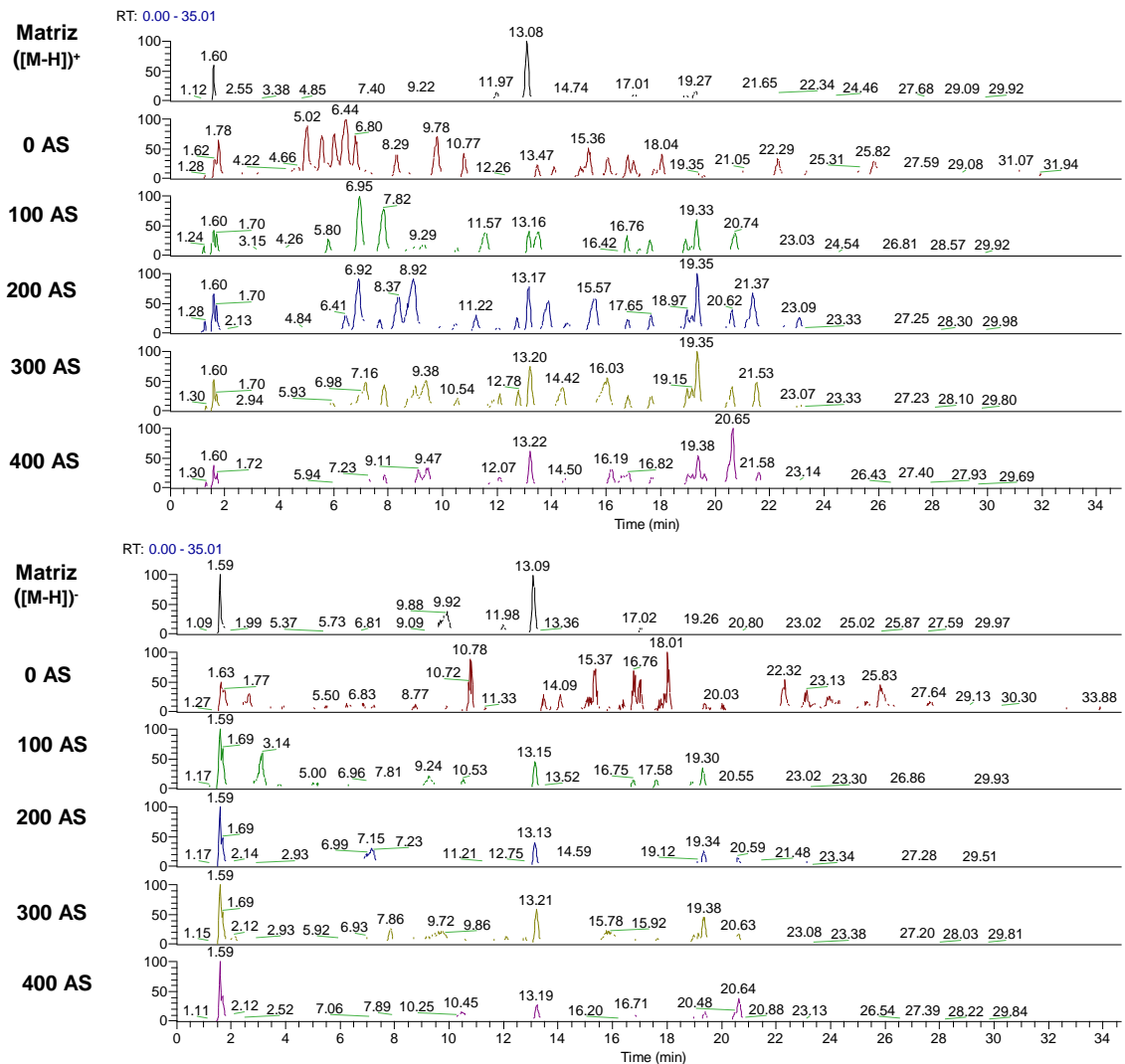
A produção de pigmentos pode ter um efeito negativo com o AS exógeno em algumas espécies, podendo ser devido ao AS ser um composto fenólico, e de acordo com Oettmeier *et al.* (1987), esta classe pode inibir a cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos, de forma semelhante que ocorrem com os herbicidas que são também

fenólicos. De acordo com Janda *et al.* (2012) uma das vias da biossíntese do AS está localizada nos cloroplastos, e conseqüentemente com adição exógena do AS afeta a fotossíntese, via indução do fechamento estomático e pela desaceleração do transporte de elétrons do fotossistema II.

Para a variável qualitativa do perfil fitoquímico das folhas da espécie optou-se por comparar os tratamentos que possuíam as concentrações do AS no meio de cultivo com a planta matriz de campo da espécie estudada.

Observou-se que a qualidade dos perfis cromatográficos diferiu tanto no modo negativo quanto no positivo de todos os tratamentos *in vitro* em comparação com a planta matriz de *Uncaria guianensis* (FIGURA 21).

FIGURA 21 - Perfil cromatográfico comparativo das folhas de uma planta matriz (M) de *U. guianensis* e das cultivadas *in vitro* sob efeito de concentrações de AS (μM), Rio Branco, Acre, 2019



Foi empregado como parâmetros o tempo de retenção (Tr) e o espectro de absorção molecular obtido através do detector de arranjo de diodos acima de 30 de intensidade. Os picos que apresentaram similaridade com relação aos parâmetros foram numerados, e sugeridos às substâncias.

A planta cultivada *in vitro* com 0 μM de AS nos meios de cultivo, diferiu tanto da planta matriz quanto de todos os tratamentos das plantas cultivadas na presença do AS. A quantidade de picos, nas plantas cultivadas *in vitro* sem a presença do AS foi maior do que todos os outros tratamentos, inclusive com relação a planta matriz de campo de *Uncaria guianensis*. Os tratamentos com 100, 200 e 300 μM de AS no modo positivo, tiveram o perfil semelhante.

A partir dos perfis cromatográficos das informações obtidas dos tratamentos foi construída uma tabela contendo os picos semelhantes entre a planta matriz e as plantas cultivadas *in vitro*, com o tempo de retenção (Tr), máximos de absorbância (λ) do espectro de UV e massa molecular (m/z) (QUADRO 2). Foram observados dois picos semelhantes, de igual tempo de retenção entre as amostras avaliadas.

QUADRO 2 - Triagem fitoquímica dos picos semelhantes dos extratos alcoólicos das folhas de *U. guianensis* de planta de campo com as cultivadas *in vitro* sob efeito de AS (μM), Rio Branco, Acre, 2019

Tratamentos	Tr (min)	λ (nm)	(m/z -)(m/z+)
Primeiro pico			
Matriz	1,6	220/224	239;141; 227
0			179;225;387;388;211; 355
100			225; 387;127; 227
200			225; 387;127;141;227
300			225;387;127;195;227
400			225;387;127;141;195; 227
Segundo pico			
Matriz	13,11	230/233	577; 287; 433; 579
0			-
100			577
200			577;433; 579
300			577;433
400			577;433; 579

Tr: tempo de retenção (minutos); λ : absorção (nanômetros); m/z (relação massa/ carga).

No primeiro pico (1,60 minutos) a sua presença estava em todas as amostras avaliadas. Houve de semelhante o íon 387 m/z podendo ser identificado como um

alcaloide, apresentando-se com máximo de absorção de 220/224 nm. A presença desta substância esteve presente apenas nos tratamentos das plantas cultivadas *in vitro*, independentemente do tipo de tratamento utilizado. Onde o AS não foi o responsável pela a qualidade do perfil.

No segundo pico, a presença do íon de peso molecular 577 m/z pode ser identificada como o beta-sitosterol, já divulgado na literatura para o gênero *Uncaria* por Zhang e colaboradores (2015).

Valente e colaboradores (2006), realizando pesquisas com a *Uncaria guianensis*, no desenvolvimento de cromatografia em camada delgada e no perfil dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, observou através da técnica de CLAE e UV que o tempo de retenção para este tipo de alcalóide foi de 3,86 à 7,49 min e a absorbância de 244 a 247 nm. De forma semelhante, na presente pesquisa, com estes parâmetros iguais ao desta substância nos tratamentos com (0, 100, 200 µM de AS).

Coste e colaboradores (2011) alegam que a elicitação é um processo muito complexo e dependem de muitos fatores, entre eles a concentração do eliciador, o estágio de crescimento da cultura no momento da adição do elicitador e o tempo de contato com o elicitador.

Após o período de cultivo com o AS, foi observado que no período de restabelecimento, as plantas submetidas aos tratamentos com 400 µM (região mediana e apical), sobreviveram respectivamente 1% e 4%.

Com exceção das plantas que foram submetidas a maior concentração de AS, todas as plantas que foram mantidas nestas condições em meio básico se recuperaram. Não houve efeito isolado e nem combinado para as variáveis avaliadas nestas plantas para a altura da parte aérea (APA) e número de pares de folhas expandidas (NPFE) (APÊNDICE L).

Para as plantas aclimatizadas observaram-se efeito dos tratamentos para APA, em que o tipo de explante teve influência para esta variável (TABELA 17).

TABELA 17 - Altura da parte aérea (APA) das plantas aclimatizadas de *U. guianensis* aos 30 dias em casa de vegetação, Rio Branco, Acre, 2019

Tipo de explante	APA (cm)
Apical	4,13 B
Mediana	4,80 A

⁽¹⁾ As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade;

⁽²⁾ Pressupostos e análise de variância podem ser verificados no APÊNDICE M.

As plantas formadas a partir da região mediana, tiveram maior altura ($p < 0,05$).

No acúmulo de massa fresca e seca, houve interferência das variáveis da massa fresca da raiz e total (MFR e MFT), e da massa seca da parte aérea, raiz e total (MSPA, MSR e MST).

As plantas formadas a partir do segmento apical, não tiveram influência quanto as variáveis avaliadas de MFR, MFT, MSPA, MSR e MST para o fator concentrações de AS utilizadas durante o cultivo *in vitro*. Já as plantas formadas a partir do segmento nodal, tiveram diferenças entre os tratamentos quanto a ausência do AS e dos tratamentos com a presença do AS, ou seja, o acúmulo de MFR, MFT, MSPA, MSR e MST foram interferidos de forma negativa nestas variáveis, devido ao efeito dos tratamentos com ácido salicílico durante o cultivo *in vitro*.

TABELA 18 - Massa fresca da raiz (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) de plantas aclimatizadas de *U. guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

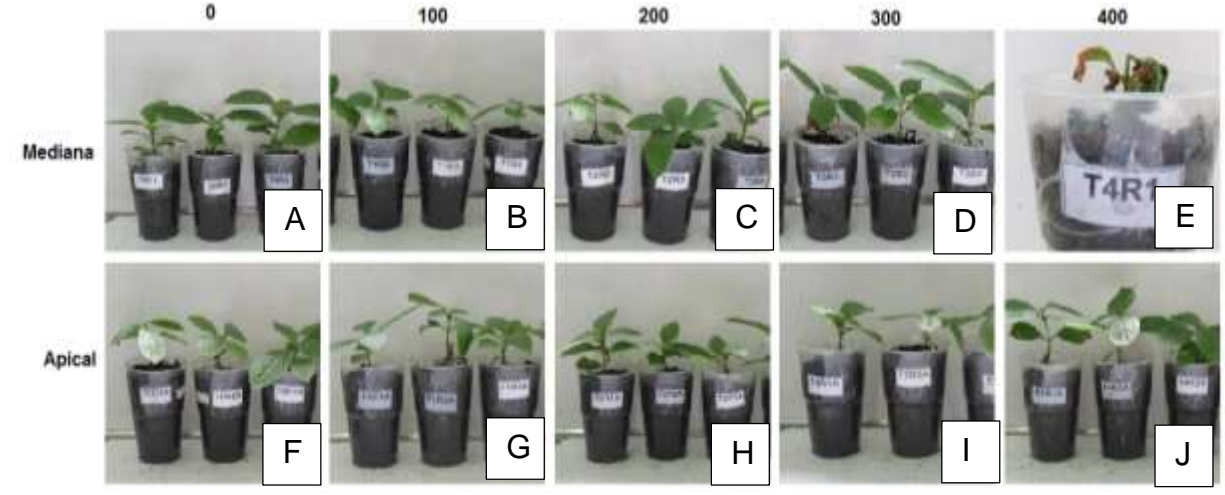
Segmentos	Concentrações (μM)			
	0	100	200	300
MFR (g)				
Apical	0,65 bA	0,72 aA	0,65 aA	0,71 aA
Mediana	1,26 aA	0,55 aB	0,75 aB	0,72 aB
MFT (g)				
Apical	1,88 bA	1,84 aA	2,20 aA	1,87 aA
Mediana	3,19 aA	1,68 aB	1,98 aB	2,23 aAB
MSPA (g)				
Apical	0,17 bA	0,17 aA	0,20 aA	0,14 bA
Mediana	0,27 aA	0,14 aB	0,19 aAB	0,24 aB
MSR (g)				
Apical	0,07 bA	0,08 aA	0,07 aA	0,07 aA
Mediana	0,10 aA	0,04 bB	0,08 aAB	0,07 aAB
MST (g)				
Apical	0,24 bA	0,25 aA	0,28 aA	0,22 bA
Mediana	0,37 aA	0,19 aB	0,27 aAB	0,32 aB

⁽¹⁾ As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Pressupostos e análise de variância podem ser verificados no Apêndice M.

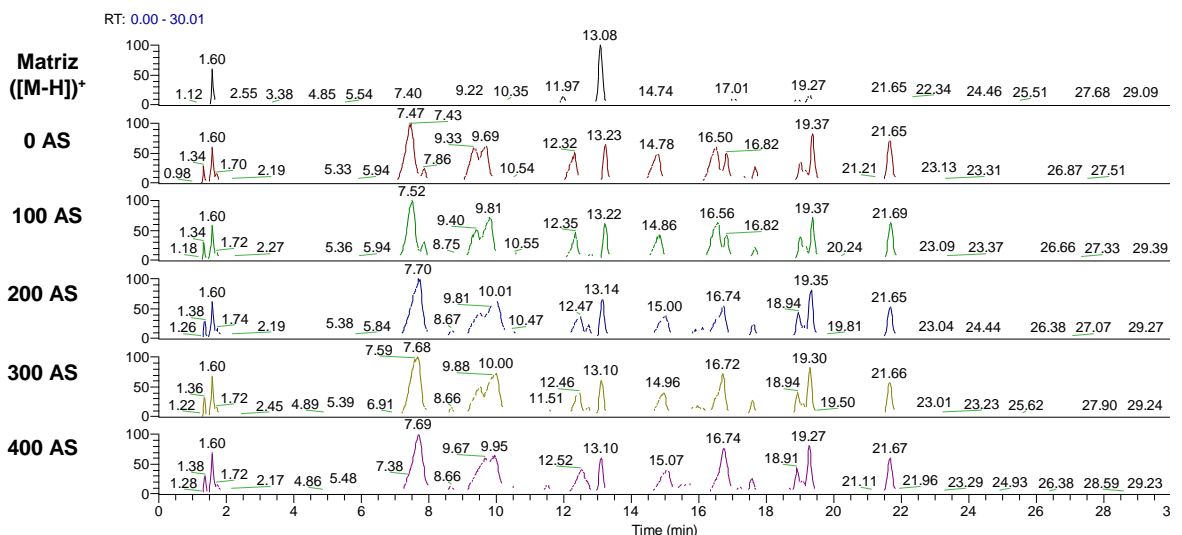
As plantas submetidas a estes tratamentos e a caracterização das variáveis avaliadas, podem ser visualizadas na figura a seguir (FIGURA 22).

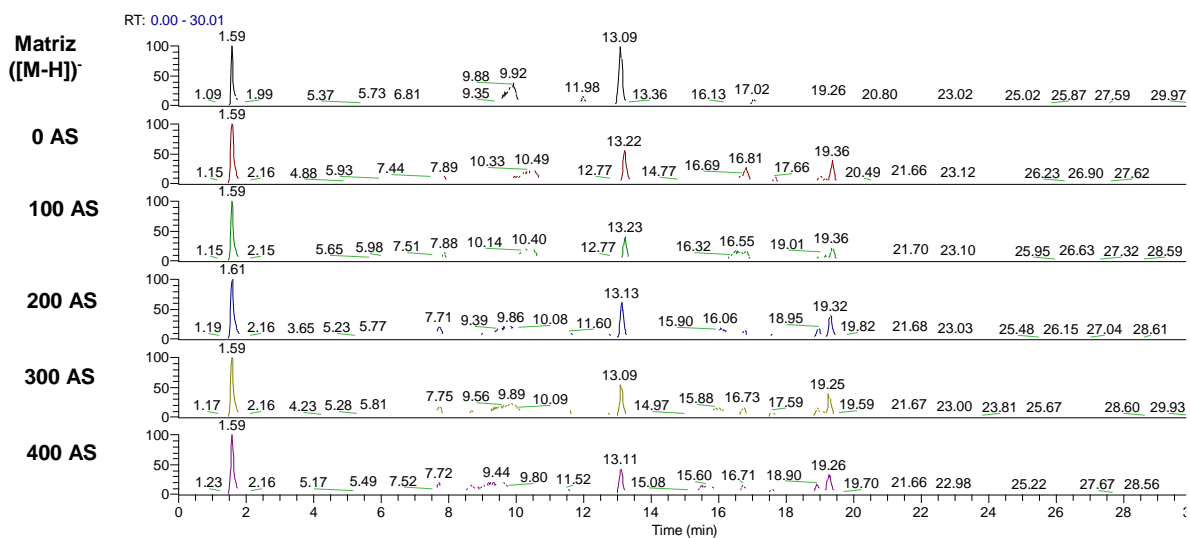
FIGURA 22 - Plantas de *U. guianensis* oriundas de propagação *in vitro* com AS (μM), e posterior aclimatização em mini estufa da UFAC, Rio Branco, Acre, 2019



Sendo assim, foi realizado o perfil cromatográfico destas folhas pós-aclimatização, com o material seco, para se evitar a presença de água, que poderia acarretar no comprometimento da qualidade dos princípios ativos (Rosado *et al.*, 2011), e observou que não houve diferenças qualitativas quanto aos picos majoritários no modo positivo e nem negativo das plantas oriundas do cultivo *in vitro* com relação as concentrações do AS.

FIGURA 23 - Perfil cromatográfico comparativo das folhas de uma planta matriz (M) de *U. guianensis* e das cultivadas *in vitro* sob efeito de tratamentos com AS após a aclimatização, Rio Branco, Acre, 2019





As plantas sob efeito de tratamento com AS não apresentaram diferenças no perfil com relação ao tratamento ausente de AS. Foi observado que para o modo negativo, o perfil se assemelhou ao da planta matriz de *U. guianensis*.

Diante dos resultados, observou que as concentrações de AS no meio de cultivo para esta espécie não atuou como um elicitador na qualidade do perfil fitoquímico, pois aos 60 dias de cultivo *in vitro* com a presença do elicitador a amostra que mais apresentou picos foram as plantas cultivadas *in vitro*, mas que não haviam sido submetidas ao AS.

5 Conclusões

As sementes de diferentes matrizes de unha-de-gato apresentam variações nas respostas das análises de germinação;

O meio de cultivo WPM (Wood Plant Medium) favorece o crescimento da espécie estudada com relação ao meio MS (Murashige e Skoog);

A utilização de BAP e lâmpada fluorescente tubular proporcionam maior número e tamanho de brotações;

As folhas das plantas aclimatizadas a partir do cultivo *in vitro* possuem melhor qualidade do perfil cromatográfico do que a planta matriz de *Uncaria guianensis*;

A suplementação do meio de cultura com BAP não influencia o perfil fitoquímico de folhas de plantas aclimatizadas a partir do cultivo *in vitro*;

Os picos semelhantes da cromatografia entre a planta matriz de *Uncaria guianensis* e as submetidas aos tratamentos com o BAP não apresenta diferenças com relação a presença dos íons;

A adição de ácido salicílico ao meio de cultura influenciou negativamente o crescimento das plantas, porém não causou modificações na qualidade do perfil fitoquímico. O AS pode ser utilizado para regulação do crescimento *in vitro* de unha-de-gato visando à manutenção de germoplasma.

Considerações Finais

Esta tese de doutorado, realizada nos anos de 2015 a 2019 para o Programa em Produção Vegetal, teve como objetivo geral o cultivo *in vitro* de plantas de unha-de-gato, com ferramentas que possibilitassem a padronização de crescimento da espécie. Como já foi abordado, muitas plantas medicinais são retiradas no modo extrativista para a manipulação de fármacos, o que compromete a perda de componentes genéticos de plantas que ainda não são domesticadas.

Neste estudo, os resultados dos experimentos, podem ser utilizados para a propagação da espécie a partir da escolha da seleção de uma planta matriz, com um meio de cultivo definido, em condições ambientais de cultivo que favoreça uma maior quantidade de matéria-prima, sem haver a necessidade da retirada de genótipos em áreas de florestas.

A espécie até o momento, não se encontra em extinção, devido a abundância de material biológico ainda presente em seu habitat. No entanto, espécie do mesmo gênero (*Uncaria tomentosa*), com atividades medicinais e presente em bioma semelhante a espécie estudada, encontra-se em perigo de extinção a médio prazo. De acordo com a literatura, ocorre a necessidade de regularização e fiscalização nas florestas de seu habitat, como forma de evitar a extinção total.

Mediante a ausência de plantios regulamentados e o valor de existência para os povos da floresta, faz necessário a continuação de pesquisas relacionadas as formas de cultivo e as respostas da espécie *Uncaria guianensis* na produção dos seus fitoativos tanto em condições artificiais como em campo. Pesquisas relacionando a exploração sustentável dessa espécie favorecerá sua preservação e a manutenção dos conhecimentos das populações tradicionais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. S.; LÉDO, A. S.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. V. C.; SILVA JUNIOR, J. F.; DOS SANTOS, J. E.; NETA, J. L. V. Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* jenipapeiro. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 9, n. 10, p. 1-6, out./nov. 2013.
- ANJUSHA, S.; GANGAPRASAD, A. *In vitro* propagation and anthraquinone quantification in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae)-A dye yielding plant. **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 81, p. 83-90, mar. 2016.
- AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; SZÜČOVÁ, L.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Assessment of the role of meta-topolins on *in vitro* produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated 'Williams' banana. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berna, v. 34, n. 6, p. 2265-2273, nov. 2012.
- ARMIJOS-GONZÁLEZ, R.; PÉREZ-RUIZ, C. *In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae). **Journal of Forestry Research**, Amsterdã, v. 27, n. 6, p. 1229-1236, dec. 2016.
- ASMAR, A. S.; RESENDE, R.; ARARUNA, E.; MORAIS, T.; LUZ, J. BAP concentrations on *in vitro* proliferation of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown shoots. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 14, n. SPE, p.149-153, 2012.
- ASMAR, A. S.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 13, n. SPE, p. 533-38, 2011.
- BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 41, n. 2, p. 185-194, fev. 2006.
- BARTLETT, M. S. Properties os sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, may 1937.
- BATISTA, T. G. **Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BEHERA, B.; BEHERA, S.; JENA, P. K.; BARIK, D. P.; NAIK, S. K. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from internode explants of *Paederia foetida* L.:

a valuable medicinal plant. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, Bhopal, v. 14, n. 3, p. 893-900, set. 2017.

BELLO-BELLO, J. J.; PÉREZ-SATO, J. A.; CRUZ-CRUZ, C. A.; MARTÍNEZ-ESTRADA, E. Chlorophyll. In: JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I. (Org.) **Light-emitting diodes: Progress in Plant Micropropagation**. Rijeca: Ed. Intech, 2017, p. 93-103.

BERTOL, G.; FRANCO, L.; DE OLIVEIRA, B. H. HPLC Analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: Sample preparation and analysis optimisation by factorial design. **Phytochemical Analysis**, Liverpool, v. 23, p. 143-151, may 2012.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013.

BJÖRN, L. O.; PAPAGEORGIOU, G. C.; BLANKENSHIP, R. E.; GOVIND, J. E. E. A viewpoint: why chlorophylla? **Photosynthesis Research**, Berna, v. 99, n. 2, p. 85-98, feb. 2009.

BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata* vogel (baru). **Revista Cerne**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 9-18, jan./mar. 2000.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. D.; DIGNART, S. L.; BIAGIOTTI, G.; PORTO, J. M. P. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr. 2009.

BRANDANI, J. Z.; JUNGLOS, M. S.; SANTIAGO, E. F.; SCALON, S. D. P. Q.; MUSSURY, R. M. Are seeds of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) tolerance to water submersion? **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, out./dez. 2018.

BRANDÃO, I. R.; KLEINOWSKI, A. M.; RIBEIRO, M. V.; LUCHO, S. R.; MILECH, C.; BRAGA, E. J. B. Capacidade elicitora do Ácido salicílico no cultivo *in vitro* de *Alternanthera tenella*. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega**, Bagé, p. 260-271, 2016.

BREDMOSE, N.; COSTES, E. Encyclopédia: Axillary bud growth, in reference modulo in life sciences. **Scienc Direct**, Amsterdã, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.05056-1>. Acesso em: 01 dez. 2019.

CANALES-SPRINGETT, A. W.; CERONI STUVA, A.; DOMÍNGUEZ TORREJÓN, G.; CASTILLO QUILIANO, A. Respuesta de la regeneración natural de la *Uncaria guianensis* (Aubl.) JF Gmel" Uña de gato", al efecto de la luz en bosques secundários dentro del Bosque Nacional Alexander Von Humboldt, Pucallpa-Perú. **Ecología Aplicada**, Lima, v. 12, n. 2, p. 111-120, jul./dez. 2013.

CARDOSO, J. C. Cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, Brasília-DF, v. 32, n. 4, p. 383-384, out./dez. 2014.

CASAL, J. J. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 403-427, 2013.

CHORY, J.; REINECKE, D.; SIM, S.; WASHBURN, T.; BRENNER, M. A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 104, n. 2, p. 339-347, fev. 1994.

CLAEYS, H.; VAN LANDEGHEM, S.; DUBOIS, M.; MALEUX, K.; INZÉ, D. What is stress? Dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 165, n. 2, p. 519-527, fev. 2014.

COPELAND, K. K. P. G. **Calogênese e uso de fatores abióticos e bióticos na produção de metabólitos secundários da catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul.)**. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

CORTLEVEN, A.; SCHMÜLLING, T. Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 16, p. 4999-5013, jan. 2015.

COSTE, A.; VLASE, L.; HALMAGYI, A.; DELIU, C.; COLDEA, G. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 106, n. 2, p. 279-288, fev. 2011.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plant**. New York: New York Botanical Garden, 1981.

CRUZ, J. G. **Qualidade de luz na micropropagação de mirtilheiro 'Woodard' (Master's thesis)**. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A. PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 400-409, abr./jun. 2012.

DE HSIE, B. S.; BUENO, A. I. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; MARTINS, E. R.; PINTO, J. E. B. P. Growth regulators induced shoot regeneration and volatile compound production in *Lippia rotundifolia* Cham., a threatened medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 137, p. 401-409, out. 2019.

DOBRÁNSZKI, J. E.; MENDELER-DRIENYOVSZKI, N. Alterações induzidas pela citocinina no conteúdo de clorofila e fluorescência de folhas de macieira *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdã, v. 171, n. 16, p. 1472-1478, out. 2014.

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; DE FARIAS RIBEIRO, M.; DE SOUZA, J. A., SOARES, G. C. Avaliação da resposta de três cultivares de oliveira ao cultivo *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda luminosa e efeitos da combinação de zeatina e ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 229-233, abr./jun. 2008.

DORNELES, M. C.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G de. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb.) Altschut, Fabaceae, estabelecida em fragmentos florestais do cerrado, MG. **Ciência Florestal**, Santa Maria-RS, v. 23, n. 3, p. 291-304, jul./set. 2013.

DURRANTE, W. E., DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

DUTRA, L. F.; WENDING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 29, n. 58, p. 49-59, jan./jun. 2009.

ECKSTEIN, A.; ZIEBA, P.; GABRY´S, H. Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* cultured *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Berna, v. 31, n. 1, p. 90-101, jan. 2012.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 35, n. 4, p. 961-965, jul./ago. 2005.

FANKHAUSER, C. Light perception in plants: cytokinins and red light join forces to keep phytochrome B active. **Trends in Plant Science**, Amsterdã, v. 7, n. 4, p. 143-145, abr. 2002.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.1 Build 72. Lavras: DEX/ UFLA, 2007.

FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; VIDAL, R. A.; MEROTTO JÚNIOR, A. Efeitos de fontes nitrogenadas e de luz na germinação de sementes de *Bidens pilosa* e *Sida rhombifolia*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v. 25, n. 3, p. 592-600, maio/jun. 2001.

FREITAS, J. C. S. **Composição química da *Vermonia condensata* Baker cultivada *in vitro* em concentrações de benzilaminopurina (BAP)**. 2017. 51 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia Maria Milza, Salvador, 2017.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. de F. P.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. de. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabemaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Paraná, v. 18, n. 4, p. 627-641, out./dez. 2008.

GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A.; VASIL, I. K. Plant tissue culture media. ***In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Berna, v. 12, n. 7, p. 473-478, jul. 1976.

GARLET, T. M. B.; FLORES, R.; MESSCHMIDT, A. A. Influência de citocininas na micropropagação de *Mentha x gracilis sole*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 30-34, jan./mar. 2011.

GARWOOD, N. C. Seed germination in a seasonal tropical forest in Panama: a community study. **Ecological monographs**, Washington, v. 53, n. 2, p. 159-181, fev. 1983.

GATTUSO, M.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, S.; PEREYRA E. L. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. **Phytomedicine**, Londres, v. 11, n. 2, p. 213-23, nov. 2004.

GAZOLLA-NETO, A.; AUMONDE, T. Z.; PEDÓ, T.; OLSEN, D.; VILELA, F. A. Ação de níveis de luminosidade sobre o crescimento de plantas de maria-pretinha (*Solanum americanum* Mill.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 88-92, jan./mar. 2013.

GENKOV, T.; TSONEVA, P.; IVANOVA, I. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in vitro cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, Berna, v. 16, n. 3, p. 169-172, ago. 1997.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. **Plant propagation by tissue culture**, Springer, Dordrecht, p. 65-113, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Araraquara, v. 30, n. 2, p. 374-381, jan./fev. 2007.

GOELZER, A.; DÉO, T. G.; LOPES, G. B.; DAMIANI, C. R. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, Curitiba, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, set./out. 2019.

GOESSLING, J. W.; CARTAXANA, P.; KÜHL, M. Photo-protection in the centric diatom *Coscinodiscus granii* is not controlled by chloroplast high-light avoidance movement. **Frontiers in Marine Science**, Berna, v. 2, p. 115, jan. 2016.

GORNI, P. H.; BROZULATO, M. D. O.; LOURENÇÃO, R. D. S.; KONRAD, E. C. G. Increased biomass and salicylic acid elicitor activity in fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, maio 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998, p. 43-76.

GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant biotechnology reports**, Berna, v. 7, n. 3, p. 211-220, jul. 2013.

HAND, C.; REED, B. M. Minor nutrients are critical for the improved growth of *Corylus avellana* shoot cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berna, v. 119, n. 2, p. 427-439, nov. 2014.

HAYAT, Q.; HAYAT, S.; IRFAN, M.; AHMAD, A. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdã, v. 68, n. 1, p. 14-25, mar. 2010.

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

HONÓRIO, I. C. G. **Estudo da diversidade genética e química de *Uncaria tomentosa* Willd. Ex Roem. & Schult e *Uncaria guianensis* Gmel de populações naturais localizadas na Amazônia.** 2016. 101 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016.

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-RS, v. 46, n. 8, p. 1401-1410, ago. 2016.

HONÓRIO, I. C. G.; COPPEDE, J. S., DELPRETE, P. G., COSTA, F. H. S., TELLES, M. P., BRAGA, R. S., BERTONI, B. W. Genetic structure and chemical diversity in natural populations of *Uncaria guianensis* (Aubl.) JF Gmel. (Rubiaceae). **PloS one**, San Francisco, v. 13, n. 10, out. 2018.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia? **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 26, n. 74, p. 167-186, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010340142012000100012&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 01 dez. 2019.

JANDA, K.; HIDEG, E.; SZALAI, G.; KOVÁCS, L.; JANDA, T. O ácido salicílico pode influenciar indiretamente o transporte de elétrons fotossintéticos. **Jornal de fisiologia vegetal**, Campinas, v. 169, n. 10, p. 971-978, out. 2012.

JANSSEN, J. G. M. A method of recording germination curves. **Annals of Botany**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 705-708, abr. 1973.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Smith *in vitro*.** 2005. 215 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo. 2005.

KARATAŞ, M.; AASIM, M.; DAZKIRLI, M. Influence of light-emitting diodes and benzylaminopurin on adventitious shoot regeneration of water hyssop (*Bacopa monnieri* (L.) Pennell) *in vitro*. **Archives of Biological Sciences**, Belgrado, v. 68, n. 3, p. 501-508, jul./set. 2016.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal.** 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008.

KUREPIN, L. V.; PHARIS, R. P. Light signaling and the phytohormonal regulation of shoot growth. **Plant Science**, Amsterdã, v. 229, p. 280-289, dez. 2014.

KUO, C. L.; CHAO, C. H.; LU M. K. Effects of auxins on the production of steroidal alkaloids in rapidly proliferating tissue and cell cultures of *Solanum lyatum*. **Phytochemical Analysis**, Liverpool, v. 23, n. 4, p. 400-404, out. 2012.

LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. 1983, 174 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) – Organização dos Estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Série de Biologia, 1983.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 263-284, 1976.

LAUS, G. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. **Phytotherapy Research**, Nova York, v. 18, n. 4, p. 259-274, mar. 2004.

LAUS, G.; KEPLINGER, K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria guianensis* (Rubiaceae). **Phyton**, Buenos Aires, v. 43, p. 1-8, anual, 2003.

LAVAUULT, M.; MORETTI, C.; BRUNETON, J. Alkaloids of l' *Uncaria guianensis*. **Planta Medica**, New York, v. 47, n. 4, p. 244-245, dez. 1983.

LEE, L. L.; GERALD, L. T. S. Biofábrica de *Phalaenopsis*. In: GERALD, L. T. S. (Orgs.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1. ed. São Paulo: Antiqua, 2011, p. 149-175.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, abr. 2010.

LEMONS, E. E. P. de. Organogênese. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2014, p. 105-129.

LICHTENTHALER, H. K.; WELBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, Londres, v. 11, n. 5, p. 591-592, out. 1983.

LIU, P. P.; VON DAHL, C. C.; PARK, S. W.; KLESSIG, D. F. Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdã, v. 155, n. 4, p. 1762-1768, mar. 2011.

LLOYD, G. B.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use shoottip culture. **Proceedings of the international Plant Propagator's Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-437, 1980.

LOCHMANOVA, G.; ZDRAHAL, Z.; KONECNA, H.; KOUKALOVA, S.; MALBECK, J., SOUCEK, P.; VALKOVA, M.; KIRAN, N.S.; BRZOBOHATY, B. Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown *Arabidopsis*: a proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 13, p. 3705-3719, out. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LUCHO, S.; DO AMARAL, M. N.; MILECH, C.; KLEINOWSKI, A. M.; CALDRÓN, A.; BRAGA, E. J. B. Síntese de glicosídeos de esteviol e pigmentos fotossintéticos induzida por elicitores em plantas de estevia. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa**, Bagé, p. 1494-1508, 2018.

LUNA-PALENCIA, G. R.; HUERTA-HEREDIA, A. A.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C. Differential alkaloid profile in *Uncaria tomentosa* micropropagated plantlets and root cultures. **Biotechnology Letters**, New York, v. 35, n. 5, p. 791-797, maio 2013.

MAGUIRE, J. D. Speed of Germination – aid in selection and avaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, mar./abr. 1962.

MALUTA, F. A.; Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 48, n. 9, p.1303-1307, set. 2013.

MARQUES, O. C. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante**. 2008. 210 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Coimbra, Portugal, 2008.

MASSA, G. D.; KIM, H. H.; WHEELER, R. M.; MITCHELL, C. A. Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience**, Virginia, v. 43, n. 7, p. 1951-1956, dez. 2008.

MATTHEWS, S.; NOLI, E.; DEMIR, I.; KHAJEH-HOSSEINI, M.; WAGNER, M. H. Evaluation of seed quality: from physiology to international standardization. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 22, n. 1, p. 69-73, jan./mar. 2012.

MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P.; SEIXAS, E. N. C.; SANTOS, M. A. F. dos. *Rubiaceae*: aspectos ecológicos e reprodutivos. **Caderno de Cultura e Ciência**, Cariri, v. 12, n. 2, dez. 2013

MIRANDA, E. M.; SOUSA, J. A.; PERERIRA, R. de C. A. **Subsídios técnicos para o manejo sustentável da unha-de-gato (*Uncaria spp.*) no Vales do Rio Juruá, AC**. Rio Branco: Embrapa ACRE, 2001 (Documentos, 68).

MOHARRAMNEJAD, S.; AZAM, A. T.; PANAHANDAH, J.; DEHGHANIAN, Z.; ASHRAF, M. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on *in vitro* growth, stevioside production, and oxidative defense system in *Stevia rebaudiana*. **Sugar Tech**, New York, p. 1-8, abr. 2019.

MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; LIMA, A. F.; SILVA, S. T.; DA SILVA, G. M. Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atoveran. **Revista Ceres**, Lavras, v. 62, n. 2, p. 215-223, mar./abr. 2015.

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 Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, jan./mar. 2012.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília-DF, v. 27, n. 2, p. 3299 -3302, ago. 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 15, n. 3, p. 473-97, mar. 1962.

MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Glasgow, v. 118, n. 1, p. 1-16, jan./abr. 2014.

NAGESHA, B. V.; AMILINENI, U.; GUDASALAMANI, R.; KARABA, N. N.; RAMANAN, U. S. Elicitors act as a signal transducer in the enhancement of camptothecine production from *in vitro* cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. **Annals of phytomedicine-an international journal**, Shalivahana Nagar, v. 7, n. 2, p. 46-54, jan./jun. 2018.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseado no desempenho de plântulas. In: KRYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, p. 1-24.

NASCIMENTO, C. M. do; OLIVEIRA, L. A. R. de; OLIVEIRA, A. C. A. de; SANTANA, F. V.; NASCIMENTO, L. H. A.; MUNIZ, A. D. S.; LEDO, A. D. S. Influência de meios nutritivos na germinação *in vitro* de genipapeiro. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 7., 2017, Aracaju. **Anais...** Brasília-DF: Embrapa, 2017.

NICHOLSON, M. A.; HEYDECKER, W. Two approaches to the study of Germination data. **Proceedings os the Internacional Seed Testing Association**, Bassersdorf, v. 3, n. 33, p. 531-540, 1969.

NICOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination - still a mystery. **Plant Science**, Washington, v. 179, n. 6, p. 574-581, jun. 2010.

NOVACEK, M. J. (Ed.) **The Biodiversity Crisis: Losing What Counts**. New York: The New Press, 2001.

OETTMEIER, W.; KUDE, C.; SOLL, H. J. Phenolic herbicides and their methylethers: binding characteristics and inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. **Pesticide Biochemistry Physiology**, Amsterdã, v. 27, n. 3, p. 50-60, mar. 1987.

OKADA, A. Elicitor induced activation of the methyterythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 65, n. 1-2, p.177-187, set. 2007.

OLIVEIRA, V. G. **Desreplicação de substâncias fenólicas dos frutos de *Mauritia flexuosa* L.f. por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas**. 2014. 134 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

PANIAGUA-PÉREZ, R.; FLORES-MONDRAGÓN, G.; REYES-LEGORRETA, C.; HERRERA-LÓPEZ, B.; CERVANTES-HERNÁNDEZ, I.; MADRIGAL-SANTILLÁN, O.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E. Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-

sitosterol in rodent assays. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, Abuja, v. 14, n. 1, p. 123-130, nov. 2017.

PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, A. G.; PEREIRA, A. R.; Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de planta. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, p. 61-161.

PASTERNAK, T.; RUDAS, V.; POTTERS, G.; JANSEN, M.A.K. Morphogenic Effects of Abiotic Stress: Reorientation of Growth in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdã, v. 53, n. 3, p. 299-314, maio 2005.

PEDROSO, R. C. N.; BRANQUINHO, N. A. D. Á.; HARA, A. C. B. D. A.; SILVA, F. G.; KELLNER FILHO, L. C.; SILVA, M. L. A.; JANUÁRIO, A. H. Effect of salicylic acid and silver nitrate on rutin production by *Hyptis marrubioides* cultured *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 49, n. 2, fev. 2019.

PEREIRA, R. de C. A.; LOPES, J. V. M. **Aspectos botânicos, etnobotânicos, agrônômicos e fotoquímicos de unha-de-gato**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006 (Documentos, 105).

PEREIRA, R. D. C.; VALENTE, L. M.; PINTO, J. E.; BERTOLUCCI, S. K.; BEZERRA, G. M.; ALVES, F. F.; MAZZEI, J. L. *In vitro* cultivated *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* with determination of the pentacyclic oxindole alkaloid contents and profiles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 19, n. 6, p. 1193-1200, jun. 2008.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Citocininas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 250-278.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v. 55, n. 3, jun. 2019
PHILLIPSON J. D.; HEMINGWAY S. R.; RIDSDALE C. E. Alkaloids of *Uncaria*. Part V. Their occurrence and chemotaxonomy. **Lloydia**, Ohio, n. 41, p. 503–570, 1978.

PIERINE, F. R., GIANINI, P. F., PEDROSO-DE-MORAES, C. Germinação e crescimento de plântulas *in vitro* de *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) submetida a diferentes meios de cultivo. **Iheringia Série Botânica**, Porto Alegre, v. 74, n. 1, jan./maio 2019.

PIRBALOUTI, A. G.; NEKOEI, M.; RAHIMMALEK, M.; MALEKPOOR, F. Chemical composition and yield of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under foliar applications of jasmonic and salicylic acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdã, v. 19, p. 101-144, maio 2019.

POULEV, A.; O'NEAL, J. M.; LOGENDRA, S.; POULEVA, R. B.; TIMEVA, V.; GARVEY, A. S.; CRAGG, G. M. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 46, n. 12, p. 2542-2547, jul. 2003.

QUEVEDO, G. A. **Silvicultura y manejo de la "uña de gato"**. Pucallpa: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana-IIAP, 1995.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. da S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008 (Documentos, 61).

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. **Annual Review of Plant Biology**, Berkeley, v. 63, n. 1, p. 507-533, 2012.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-11, jan./mar. 2006.

RAPOSO, A.; TEIXEIRA, R. B. **Metodologia Científica: cultivo *in vitro* de unha-de-gato**. Rio Branco-AC: Embrapa Acre, 2011 (Circular técnica, 57).

RAPOSO, A.; SILVA, J. M. M. da; MIRANDA, E. M. de; SOUZA, J. A. de. Estudos de prospecção e montagem de calendário de coleta de sementes para duas espécies de unha-de-gato no estado do Acre. IN: VII Seminário Anual de Cooperação, 2010, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco-AC: UFAC, 2010, p. 250.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P; ROSADO, L. D. S.; CÔRREA, R. M. Teor de composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, maio 2009.

REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. DE. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesoni* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 821-827, maio/jun. 2008.

RIBEIRO, M.; PASQUAL, M.; DA SILVA, A. B.; RODRIGUES, V. A. Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v. 39, n. 8, nov. 2009.

ROACH, D. A.; WULFF, R. D. Maternal effects in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Washington, v. 18, n. 1, p. 209-235, 1987.

ROCHA, P. S. G. D.; OLIVEIRA, R. P. D.; SCIVITTARO, W. B.; SANTOS, U. L. D. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 40, n. 9, set. 2010.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabolitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 333-340, jul./set. 2010.

ROSADO, L. D. S.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; NICULAU, E. D. S.; ALVES, P. B. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjerição cv. Maria Bonita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 291-296, mar./abr. 2011.

ROUT, G; R.; SAMANTARAY, S. das, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, Amsterdã, v. 18 n. 2, p 91-120, abr. 2000.

SA, F. P. D.; LEDO, A. D. S.; AMORIM, J. A. E.; SILVA, A. V. C. D.; PASQUAL, M. *In vitro* propagation and acclimatization of genipapo accessions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 2, p. 155-163, mar./abr. 2016.

SAHU, G. K.; SABAT, S. C. Alterações no crescimento, teor de pigmentos e antioxidantes na raiz e tecidos foliares de plantas de trigo sob influência de ácido salicílico exógeno. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 209-218, mar. 2011.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; ZHANG, X. J.; CONDEZO, L.; LAO, J.; ANGELES, F.; MUSAH, R.; BOBROWSKI, P.; MILLER, M. J. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytotherapy**, Londres, v. 9, n. 4, p. 325-327, set. 2002.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação** – um enfoque estatístico. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004.

SANTOS, R. L.; GUIMARÃES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 14, p. 486-491, out./dez. 2011.

SEMPREBOM, T. R. **Glutamina e metabolismo antioxidante durante a organogênese adventícia em folhas de *Ananas comusus***. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SENATORE, A.; CATALDO, A.; IACCARINO, F. P.; ELBERTI, M. G. Phytochemical and biological study of *Uncaria tomentosa*. **Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale**, Roma, v. 65, n. 6, p. 517-520, maio 1989.

SHABANI, L.; EHSANPOUR, A. A.; ASGHARI, G.; EMAMI, J. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured Glycyrrhiza glabra elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 56, n. 5, p. 621-626, set. 2009.

SHANLEY, P.; CYMERYYS, M.; SERRA, M.; MEDINA, G. **Frutales y plantas útiles en la vida amazónica**. Rome: La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2013.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. Na analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Boston, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, dez. 1965.

SHEKHAWAT, M. S.; KANNAN, N., MANOKARI, M.; RAVINDRAN, C. P. Protocolo aprimorado de micropropagação de *Morinda citrifolia* L. através de explantes nodais. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Amsterdã, v. 2, n. 4, p. 174-181, dez. 2015.

SILVA, J. H. S. **Influência do ambiente de cultivo em acessos de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.)**. 2017. 41 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2017.

SILVA, J. M. M. **Germinação e armazenamento de sementes de unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* (WILLD.) D.C.)**. 2010. 53 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2010.

SILVA, R. P. A.; SILVA, E. L. G.; MELO, A. S. de; SOARES, C. de P.; HENRIQUES, A. B.; SIMÃOES-ARAÚJO, J. L.; VIDAL, M. S.; MENESES, C. H. S. G. Cultura de tecidos em feijão caupi. **Journal of Biology & Agricultural Management**, Campina Grande, v. 10, n. 4, p. 1-16, out./dez. 2014.

SILVA, T. L. da; PEREIRA, M. A. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Propagação *in vitro* de sacaca (*Croton cajucara* Benth.): entendimentos sobre a dificuldade no desenvolvimento de protocolos de micropropagação da espécie. **Biotemas**, Florianópolis, v. 28, n. 4, p. 41-50, out./dez. 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEN, E. P.; MENTZ, L. A. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2017.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Harconia speciosa* gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinas**, Campinas, v. 9, n. 4, p. 103-106, out./dez. 2007

SOUZA, R. R. de; OLIVEIRA PAIVA, P. D. de; DA SILVA, R. R.; DA SILVA, D. P. C., DOS REIS, M. V.; PAIVA, R. Potencial morfogênico de diferentes fontes de explantes para regeneração eficiente *in vitro* de Genipa-SP. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 136, n. 1, p. 153-160, jan. 2019.

STAFFORD, A.; MORRIS, P.; FOWLER, M. W. Plant cell biotechnology: a perspective. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdã, v. 8, n. 10, p. 578-587, out. 1986.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEN, E. P.; MENTZ, L. A (Org.). **Biodiversidade no Brasil**. 2. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Artmed, 2017, p. 1-10.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, L. C.; EMRICH, E. Germination *in vitro* and *ex vitro* of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, nov./dez. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TEPPNER, H.; KEPLINGER, K.; WETSCHNIG, W. Karyosystematik von *Uncaria tomentosa* und *U. guianensis* (Rubiaceae-Cinchoneae). **Phyton**, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 125-134, jan./dez.1984.

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

URDANIBIA, I.; TAYLOR, P. *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aubl.) JF Gmel. In: **Medicinal and Aromatic Plants of South America**. Springer, Dordrecht, p. 453-463, set. 2018.

VALENTE, L. M. M. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: um panorama sobre seus aspectos mais relevantes. **Revista Fitos**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 48-58, jun./set. 2006.

VALENTE, L. M. M.; BIZARRI, C. H.; LIECHOCKI, S.; BARBOZA, R. S.; PAIXÃO, D. D.; ALMEIDA, M. B. S.; SIANI, A. C. Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its potential as a chemical marker for the species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 20, n. 6, p. 1041-1045, jun. 2009.

VAN STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Springer, Dordrecht, p. 205–226, 2008.

VELLOSO, M. A. L.; ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo *in vitro*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 267-272, abr./jun. 2009.

VENUTOLO, S. A. Estabelecimento *in vitro* e cultura celular da *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Revista Tecnología En Marcha**, San José, v. 23, n. 5, p. 24, maio 2011.

VILCHES, L. E. O. **Género Uncaria** – Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. 3. ed. Lima: Editora, 1997.

YÉPEZ, A. M.; DE UGAZ, O. L.; ALVAREZ, C. M.; DE FEO, V.; AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. Quinovic acid glycosides from *Uncaria guianensis*. **Phytochemistry**, Amsterdã, n. 30, v. 5, p. 1635-1637, maio 1991.

ZAHEER, M.; GIRI, C. C. Multiple shoot induction and jasmonic versus salicylic acid driven elicitation for enhanced andrographolide production in *Andrographis paniculata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 122, n. 3, p. 553–563, set. 2015.

ZAYOVA, E.; STANCHEVA, M.; GENEVA, M. P. D. Antioxidant activity of *in vitro* propagated *Stevia rebaudiana* Bertoni plants of different origins. **Turkish Journal of Biology**, Ancara, v. 37, n. 1, p. 106-113, jan./fev. 2013.

ZEVALLOS POLLITO, P. A.; FLORES BENDEZÚ, Y. Caracterización morfológica de plántulas de "uña de gato" *Uncaria tomentosa* (willdernow ex roemer & schultes) dc Y *U. guianensis* (Aublet) Gmelin del Bosque Nacional Alexander Von Humboldt. **Ecología Aplicada**, Lima, v. 2, n. 1, p. 41-46, jan./jun. 2003.

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, p. 19-30, jan./jun. 2010.

ZHANG, Q.; ZHAO, J. J.; XU, J.; FENG, F.; QU, W. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdã, v. 173, p. 48-80, set. 2015.

APÉNDICE

APÊNDICE A - Pressupostos e resumo da análise de variância da germinabilidade (G), tempo médio (TM), Coeficiente de velocidade de germinação (CVG), Velocidade de emergência (VE), índice de sincronização de germinação ou incerteza ($flog_2fi$) de sementes de *Uncaria guianensis*, de três matrizes e cinco tipos de formulações de meios de cultivo, UFAC, Rio Branco, 2019

FV	GL	Quadrado Médio				
		G (%) ^(a)	TM	CVG	VE	$flog_2fi$ ^(b)
Matrizes	2	0,001**	1,68 ^{ns}	0,00 ^{ns}	2,43**	0,00 ^{ns}
Formulações	4	0,000 ^{ns}	14,05**	0,00**	1,11**	0,00 ^{ns}
M X F	8	0,0006*	0,95 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,00 ^{ns}
Erro	45	-	-	-	-	-
CV (%)		0,62	11,10	10,84	25,54	3,94
W	-	0,94	0,98	0,97	0,94	0,92
B	-	27,05	15,73	8,50	22,39	22,89

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0.05$); * significativo a 5% ($p < 0.05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

2. Variáveis transformadas (a) $\ln(x + 10)$; (b) $\log(x + 10)$

3. Pressupostos da análise de variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE B - Pressupostos e resumo da análise de variância de *Uncaria guianensis in vitro*, das variáveis altura da parte aérea (APA) e número de pares de folhas expandidas (NPFE) de três matrizes e cinco tipos de formulações de meios de cultivo, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado Médio	
		APA*	NPFE
Matrizes	2	1,59**	5,17 ^{ns}
Formulações	4	0,80**	12,59**
M X F	8	0,30**	2,59 ^{ns}
Erro	354	-	-
CV (%)		17,21	29,63
W	-	0,98	0,94
B	-	6,97	9,46

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p \geq 0.05$); * significativo a 5% ($p < 0.05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

2. Variável transformada \sqrt{x}

3. Pressupostos da análise de variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE C - Pressupostos e resumo da análise de variância de *Uncaria guianensis* aos 30 dias de aclimatização, das variáveis altura da parte aérea (APA) e número de pares de folhas expandidas (NPFE), de três matrizes e cinco tipos de formulações meios de cultivo, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado Médio	
		APA*	NPFE
Matrizes	2	0,010 ^{ns}	13,48**
Formulações	4	0,101**	5,49**
M X F	8	0,008 ^{ns}	1,57*
Erro	145	-	-
CV (%)		5,35	14,96
W	-	0,98	0,94
B	-	11,93	10,13

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

2. Variáveis transformadas $\sqrt[5]{x}$

3. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE D - Pressupostos e resumo da análise de variância para o número de brotações (NB) e tamanho da maior brotação (TMB), avaliados no primeiro subcultivo de *Uncaria guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado médio	
		NB	TB
Fontes de Luz	2	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}
Concentrações	4	0,01**	0,03**
F X C	8	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}
Erro	192	-	-
CV (%)	-	4,52	7,60
W	-	0,91	0,97
B	-	23,38	12,63

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

2. Variáveis transformadas: $\sqrt[6]{x}$

3. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE E - Pressupostos e resumo da análise de variância para os pigmentos fotossintetizantes (Chl a, Chl b, total e carotenóides), avaliados no primeiro subcultivo de *Uncaria guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado médio			
		Chl a ^(a)	Chl b ^(b)	Chl t ^(c)	Carotenóides
Fontes de luz	2	0,07 ^{ns}	0,06 ^{**}	0,18 ^{ns}	0,017 ^{ns}
Concentrações	4	0,51 ^{**}	0,08 ^{**}	1,39 ^{**}	0,05 ^{ns}
F X C	8	0,08 [*]	0,01 ^{ns}	0,21 ^{**}	0,01 ^{ns}
Erro	45	-	-	-	-
CV (%)		23,59	9,19	13,22	99,04
W	-	0,97	0,96	0,96	0,95
B	-	2,42	4,35	2,89	4,08

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

2. Variáveis transformadas: (a) $\sqrt[3]{x}$ (b) $\sqrt[2]{x+1}$ (c) $x+1$.

3. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE F - Pressupostos e resumos da análise de variância para o número de brotações (NB) e tamanho da maior brotação (TMB), avaliados no segundo subcultivo de *Uncaria guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado Médio	
		NB ^(a)	TB ^(b)
Fontes de luz	2	0,43 ^{**}	0,09 ^{**}
Concentrações	4	0,13 ^{**}	0,029 ^{**}
T x C	8	0,05 ^{ns}	0,01 ^{ns}
Erro	182	-	-
CV (%)	-	16,35	8,20
W	-	0,94	0,97
B	-	20,56	9,57

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

2. Variáveis transformadas: (a) $\sqrt[3]{x}$ (b) $\sqrt[2]{x}$

3. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE G - Pressupostos e resumo da análise de variância dos pigmentos fotossintetizantes (Chl a, Chl b, total e carotenóides), avaliados no segundo subcultivo de *Uncaria guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado médio			
		Chl a	Chl b	Chl t	Carotenóides
Fontes de luz	2	0,38 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,008 ^{ns}
Concentrações	4	1,18 ^{**}	0,18 ^{**}	2,29 ^{**}	0,015 ^{**}
T X C	8	0,17 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,004 ^{ns}
Erro	45	-	-	-	-
CV (%)	-	38,46	46,46	37,37	33,40
W	-	0,98	0,97	0,98	0,95
B	-	17,02	15,12	14,48	16,74

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

2. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE H - Pressupostos e resumo da análise de variância do restabelecimento de *Uncaria guianensis* cultivada em meio básico aos 60 dias de cultivo *in vitro*, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado Médio	
		APA	NF ^(a)
Fontes de luz	2	0,52 ^{ns}	0,05 ^{ns}
Concentrações	4	2,08 ^{ns}	0,09 ^{ns}
F X C	8	1,28 ^{ns}	0,08 ^{ns}
Erro	60	-	-
CV (%)	-	26,11	13,56
W	-	0,98	0,97
B	-	25,37	-

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

2. Variáveis transformadas: (a) Ln x

3. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE I - Pressupostos e resumo da análise de variância da aclimatização de *Uncaria guianensis* em casa de vegetação, das variáveis altura da parte aérea (APA), tamanho das raízes (TR), número de pares de folhas expandidas (NPFE), massa fresca da parte aérea (MSPA), massa fresca das raízes (MFR) e massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR) e massa seca total (MST), aos 37 dias de cultivo *ex vitro*, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado Médio								
		APA	TR	NPFE	MSPA	MFR	MFT	MSPA	MSR*	MST
Fontes de luz	2	2,1 ^{ns}	31,79 ^{ns}	6,41 ^{**}	1,22 ^{ns}	0,24 ^{ns}	2,54 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,05 ^{ns}
Concentrações	4	5,1 ^{ns}	6,61 ^{ns}	2,31 ^{ns}	1,40 ^{ns}	0,20 ^{ns}	2,59 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,03 ^{ns}
F X C	8	2,09 ^{ns}	7,28 ^{ns}	1,16 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,83 ^{ns}	0,03*	0,00 ^{ns}	0,03 ^{ns}
Erro	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV (%)	-	24,42	28,87	18,67	35,64	45,86	36,24	33,91	11,24	35,39
W	-	0,98	0,98	0,94	0,98	0,96	0,98	0,98	0,95	0,97
B	-	23,23	17,28	10,70	12,33	13,89	12,04	14,10	29,84	17,45

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

2. *variável transformada $\sqrt[5]{x}$

3. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE J - Pressupostos e resumo da análise de variância da altura da parte aérea (APA) de *Uncaria guianensis*, avaliados aos 60 dias de cultivo *in vitro* de plantas submetidas ao AS, Rio Branco, Acre. 2019

FV	GL	QM
		APA
Segmentos	1	0,07 ^{ns}
Concentrações	4	0,87 ^{**}
S x C	4	0,02 ^{ns}
Erro	99	-
CV (%)		21,92
W	-	0,96
B	-	21,32

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

2. Variáveis transformadas: $\sqrt[5]{x}$

3. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE K - Pressupostos e resumo da análise de variância dos pigmentos fotossintetizantes (Chl a, Chl b, total e carotenóides), avaliados aos 60 dias de cultivo *in vitro* de *Uncaria guianensis*, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado Médio			
		Chl t	Chl a	Chl b	Car
Segmentos	1	0,39 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,06 ^{ns}
Concentrações	4	5,75*	3,18*	0,42 ^{ns}	0,09 ^{ns}
R X C	4	1,70 ^{ns}	1,25 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,07 ^{ns}
Erro	30	-	-	-	-
CV (%)		64,29	63,29	75,82	65,87
W	-	0,95	0,95	0,98	0,94
B	-	13,81	14,18	12,53	-

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

2. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE L - Pressupostos e resumo da análise de variância do subcultivo dos explantes de *Uncaria guianensis* sob efeito do AS aos 60 dias no meio WPM, das variáveis altura da parte aérea (APA) e número de pares de folhas expandidas (NPFE), Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado Médio	
		APA	NPFE
Segmentos	1	0,003 ^{ns}	0,40 ^{ns}
Concentrações	4	0,08 ^{ns}	0,36 ^{ns}
R x C	4	0,73 ^{ns}	0,32 ^{ns}
CV (%)	-	26,49	16,28
W	-	0,968	0,9671
B	-	4,251	-

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

2. Pressupostos da análise da variância. (W: Shapiro-Wilk; B: Bartlett); ** significativo a 1% ($p < 0,01$);

APÊNDICE M - Pressupostos e resumo da análise de variância da aclimatização de *Uncaria guianensis* em casa de vegetação, das variáveis altura da parte aérea (APA), tamanho das raízes (TR), número de pares de folhas expandidas (NPFE), massa fresca da parte aérea (MSPA), massa fresca das raízes (MFR) e massa fresca total (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR) e massa seca total (MST), aos 37 dias de cultivo *ex vitro*, Rio Branco, Acre, 2019

FV	GL	Quadrado Médio								
		APA	TR	NPFE	MSPA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST
Segmentos	1	4,60*	0,0 ^{ns}	2,40 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,1 ^{ns}	1,0 ^{ns}	0,0 ^{ns}	0,0 ^{ns}	0,0 ^{ns}
Concentrações	4	1,55 ^{ns}	25,0*	1,32 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,15*	0,8 ^{ns}	0,0 ^{ns}	0,0 ^{ns}	0,0 ^{ns}
S X C	3	2,12 ^{ns}	5,27 ^{ns}	1,26 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,2**	1,20*	0,0**	0,0*	0,0*
CV (%)	-	19,39	26,42	36,26	30,33	31,45	27,88	27,35	29,99	25,77
W	-	0,97	0,97	0,93	0,95	0,98	0,96	0,98	0,96	0,98
B	-	5,6	15,64	19,22	8,88	10,26	14,21	14,21	15,03	13,76

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

ANEXO

QUADRO 3 - Composição inorgânica e orgânica do meio WPM (Lloyd, McCown, 1980) e MS (Murashige; Skoog, 1946) utilizadas no experimento 1, Rio Branco, Acre, 2019

Identificação dos compostos dos meios nutritivos	Concentrações dos Componentes (mg.L ⁻¹)				
	WPM	MS	MS (25%)	MS (50%)	MS (75%)
	Macronutrientes				
Nitrato de Amônio NH ₄ NO ₃	400,00	1.650,00	412,50	825,00	1.237,50
Nitrato de Cálcio tetrahidratado Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556,00	-	-	-	-
Nitrato de Potássio KNO ₃	-	1.900,00	475,00	950,00	1.425,00
Cloreto de Cálcio dihidratado CaCl ₂ .2H ₂ O	96,00	440,00	440,00	440,00	440,00
Sulfato de Magnésio heptahidratado MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00	370,00	370,00	370,00	370,00
Fosfato de Potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	170,00	170,00	170,00	170,00	170,00
Sulfato de Potássio anidro KH ₂ PO ₄	990,00	-	-	-	-
	Micronutrientes				
Ácido Bórico H ₃ BO ₃	6,20	6,20	6,20	6,20	6,20
Sulfato de Manganês monohidratado MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3
Sulfato de Zinco heptaidratado ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	8,60	8,60	8,60	8,60
Acido Bórico H ₃ BO ₃	6,20	6,20	6,20	6,20	6,20
Iodeto de Potássio KI	-	0,83	0,83	0,83	0,83
Molibdato de sódio didratado	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

NaMoO ₄ .2H ₂ O					
Sulfato de Cobre pentahidratado CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	0,025	0,025	0,025	0,025
Cloreto de Cobalto hexahidratado CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0,025	0,025	0,025	0,025
	FeEDTA				
EDTA dissódico dihidratado Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30	37,30	37,30	37,30	37,30
Sulfato ferroso heptahidratado FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	27,80	27,80	27,80	27,80
	Vitaminas e Aminoácidos				
Ácido nicotínico (B3)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Piridoxinina-HCl(B6)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Tiaminina.HCl (B1)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Glicina (Aminoácido)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Mio-inositol (açúcar álcool) C ₆ H ₁₂ O ₆	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Sacarose	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00