



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ABORDAGEM
FITOQUÍMICA EM SALIX
(*Salix humboldtiana* Willd)**

BRENO RÉGIS SANTOS

2001

BRENO RÉGIS SANTOS

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ABORDAGEM FITOQUÍMICA EM
SALIX (*Salix humboldtiana* Willd)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Renato Paiva, PhD.



LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Breno Régis

Propagação *In Vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humboldtiana*
Willd) / Breno Régis Santos. -- Lavras : UFLA, 2001.

89 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Salix humboldtiana*. 2. Salgueiro. 3. Micropropagação. 4. Cultura de
tecidos. 5. Óleo essencial. 6. Fenol. 7. Fitoquímica. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-634.973981

BRENO RÉGIS SANTOS

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ABORDAGEM FITOQUÍMICA EM
SALIX (*Salix humboldtiana* Willd)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 06 de março de 2001

Profª. Dra. Maria das Graças Cardoso

UFLA

Prof. Dr. Marcelo Polo

UNIFENAS



Prof. Renato Paiva, PhD.
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus ,
que é luz do meu caminho e o guia do meu viver.

OFEREÇO

Ao meu pai, Américo dos Santos e à minha mãe, Alzira Maria das Graças Santos, que tornaram tudo possível através do carinho e apoio sempre dispensados com entusiasmo;

À minha noiva, Liliane Isabel Silva, pelo apoio e compreensão dado em todos os passos da minha vida;

A todos os amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta jornada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, um agradecimento especial pelas várias vezes que me sustentou e direcionou minha vida,

Aos meus pais, Américo dos Santos e Alzira Maria das Graças Santos, pelo incentivo, apoio e carinho; e que sem os quais não haveria conseguido terminar mais essa caminhada. A todos familiares que viabilizaram o andamento deste curso, dando apoio estrutural e moral; e a toda família pelo subsídio dado para a realização desta jornada. À minha noiva Liliane Isabel Silva, que ao longo deste período sempre deu seu apoio com muito amor, além de sua compreensão, que foi essencial para a minha jornada.

Ao meu Orientador, Prof. Renato Paiva, PhD e à minha Co-orientadora Dra. Maria das Graças Cardoso, por acreditarem em meus ideais e incentivaram o meu trabalho, e ainda por serem pessoas pelas quais tenho grande carinho e amizade. À pessoa que foi a primeira a me incentivar no caminho da pesquisa científica, Prof. Dr. Marcelo Polo.

Com muito apreço, aos colegas da minha turma de Mestrado: Jorge Alberto de Gouvea, Edna Maria Alves, Luciano e Marlon; nos quais me sustentei para superar as adversidades do curso. Em especial ao Jorge Alberto de Gouvêa e Edna Maria Alves, sinto-me honrado por ter cursado e concluído o mestrado ao lado deles. Aos amigos Moisés Mourão Júnior e Lucinéa, Mauro, Izonei, Joel, Dorenso, e Lena pelo apoio dado. Aos alunos de iniciação científica; Emerson, Leonardo, Michele, Rodrigo, Fábio, Flávio, Anailda, Luciano, Priscila, e todos os outros que ajudaram. Aos amigos Fabiano, Andréa, Ana Claudia, Maira Carolina, Guilherme Gomes, Leonardo, Vânia, Sandro e àqueles a quem não mencionei.

Um grande apreço aos amigos Soami Deccetti e José Raniere Ferreira de Santana, que são pontos de apoio em qualquer situação.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro e tecnológico dispensados à minha pessoa e meu trabalho. E por fim, a todos os professores e amigos que direta e ou indiretamente colaboraram para a execução desta etapa tão importante da minha vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS -----	i
RESUMO -----	ii
ABSTRACT -----	iii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL -----	1
1 INTRODUÇÃO -----	1
2 Referencial Teórico -----	2
2.1 Características botânicas do salix (<i>Salix humboldtiana</i> Willd.) -----	2
2.2 Cultura de tecidos -----	4
2.3 Fitoquímica -----	6
3 Referências Bibliográficas -----	7
CAPÍTULO II - INDUÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS -----	8
1 RESUMO -----	8
2 ABSTRACT -----	9
3 INTRODUÇÃO -----	10
4 REFERENCIAL TEÓRICO -----	10
5 MATERIAL E MÉTODOS -----	12
5.1 Metodologia de laboratório -----	12
5.2 Análise dos dados -----	13
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	15
6.1 Efeito isolado de 2,4-D -----	15
6.2 Efeitos isolados de ANA e BAP -----	18
6.3 Efeito das combinações de ANA e BAP -----	20
7 CONCLUSÕES -----	23
8 Referências Bibliográficas -----	24
CAPÍTULO III – INDUÇÃO DE BROTAÇÕES DE SALIX A PARTIR DE CALOS FRIÁVEIS E SEGMENTOS NODAIS -----	25
1 RESUMO -----	25
2 ABSTRACT -----	24
3 INTRODUÇÃO -----	27
4 REFERENCIAL TEÓRICO -----	28
5 MATERIAL E MÉTODOS -----	30
5.1 Indução de brotações de salix a partir de calos friáveis -----	30
5.1.1 Metodologia de laboratório -----	30
5.1.2 Análise de dados -----	31
5.2 Indução de brotações a partir de segmentos nodais -----	31

5.2.1 Metodologia de laboratório	31
5.2.2 Análise dos dados	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 Indução de brotações de salix a partir de calos friáveis	33
6.2 Indução de brotações de salix a partir de segmentos nodais	37
7 CONCLUSÕES	43
8 Referências Bibliográficas	45

CAPÍTULO IV – ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE SALIX OBTIDAS *IN VITRO*

1 RESUMO	47
2 ABSTRACT	48
3 INTRODUÇÃO	49
4 Referencial Teórico	50
4.1 Enraizamento	50
4.2 Aclimatização	52
5. MATERIAL E MÉTODOS	55
5.1 Enraizamento de brotações	55
5.1.1 Metodologia de laboratório	55
5.1.2 Análise de dados	55
5.2 Aclimação de plântulas de salix obtidas <i>in vitro</i>	56
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1 Enraizamento de brotações de salix obtidas <i>in vitro</i>	58
6.2 Aclimatização de plântulas obtidas <i>in vitro</i>	62
7 CONCLUSÕES	63
8 Referências Bibliográficas	64

CAPÍTULO V – ABORDAGEM FITOQUÍMICA EM SALIX

1 RESUMO	66
2 ABSTRACT	67
3 INTRODUÇÃO	68
4 REFERENCIAL TEÓRICO	69
4.1 Extração	69
4.2 Fenóis	72
4.2.1 Taninos	74
4.3 Óleos essenciais	76
5 MATERIAIS E MÉTODOS	79
5.1 Obtenção dos extratos brutos	79
5.2 Prospecção de fenóis	81

5.3 Obtenção do óleo essencial -----	81
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	83
7 CONCLUSÕES -----	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	88

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Aspecto visual de uma planta adulta de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd.) UFLA, LAVRAS – MG, 2000. 3
- Figura 2.** Aspecto da inflorescência masculina e feminina do *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd.). Fonte: Lorenzi, 1992. 3
- Figura 3.** (A) Relação entre os valores médios e intervalo de confiança de 95% para o peso dos calos em função das doses de 2,4-D ajustado pelo modelo quadrático; (B) e relação entre o percentual de formação dos calos e doses de 2,4-D ajustado pelo modelo quadrático. UFLA, Lavras – MG, 2000. 17
- Figura 4.** Aspecto visual dos calos obtidos em meio contendo 2,4-D. (A) controle, (B) 2,0 mg/L, (C) 4,0 mg/L, (D) 6,0 mg/L, (E) 8,0 mg/L UFLA, Lavras – MG, 2000. 18
- Figura 5.** Rizogênese induzida por doses individuais de ANA e BAP. (A) Controle, (B) 2,0 mg/L de BAP, (C) 4,0 mg/L de BAP, (D) 4,0 mg/L de ANA. UFLA, Lavras – MG, 2000. 19
- Figura 6.** Relação entre as doses de (A) ANA e (B) BAP e o percentual de formação de calos. UFLA, Lavras – MG, 2001. 20
- Figura 7.** Aspecto visual dos calos obtidos em meio MS acrescido de combinações entre BAP e ANA. (A) Controle, (B) 2,0 mg/L BAP + 4,0 mg/L ANA, (C) 4,0 mg/L de BAP + 2,0 mg/L de ANA, (D) 2,0 mg/L BAP + 2,0 mg/L de ANA. UFLA, Lavras - MG, 2000. 21

- Figura 8.** Superfície de resposta para os efeitos de ANA e BAP sobre peso dos calos. UFLA, Lavras, 2000. 22
- Figura 9.** Brotações de salix obtidas a partir de calos friáveis mantidos na presença de (A) 1,0 mg/L e (B) 0,5 mg/L de BAP. UFLA, Lavras – MG, 2000. 34
- Figura 10.** Número de brotações em concentrações individuais de BAP. UFLA, Lavras – MG, 2001. 35
- Figura 11.** Brotações originadas de calos de Salix em meio de cultivo contendo BAP. UFLA, Lavras – MG, 2000. 36
- Figura 12.** Etapas do desenvolvimento das brotações de salix: (A) surgimento do broto no calo (forma globular); (B) início do desenvolvimento do broto, (C) brotos apresentando o 1º par de folhas e (D) broto completamente formado. UFLA, Lavras – MG, 2000. 36
- Figura 13.** Porcentagem de formação de brotos (parte rachureada) em função das concentrações de BAP E GA₃. UFLA, Lavras – MG, 2000. 37
- Figura 14.** Brotações de salix a partir de segmentos nodais, obtidas em meio de cultivo desprovido de GA₃ e BAP; UFLA, Lavras – MG, 2000 38
- Figura 15.** Valores médios de número de brotações em função das concentrações de BAP e GA₃. UFLA, Lavras – MG, 2000. 39
- Figura 16.** Brotações de salix obtidos de segmentos nodais. (A) Controle; (B) 1,0 mg/L de BAP; (C) 0,5 de BAP e (D) 2,0 mg/L GA₃. UFLA, Lavras – MG, 2000. 39

- Figura 17.** Aspecto visual de uma brotação enraizada de salix obtida a partir de segmento nodal inoculado na presença de ANA e carvão ativado. UFLA, Lavras – MG, 2000. 41
- Figura 18.** Modelo de superfície de resposta ajustada referente ao número de brotações obtidas de Salix a partir de segmentos nodais em função de diferentes concentrações de carvão ativado - CA (g/L) e ANA (mg/L). UFLA, Lavras – MG, 2000. 41
- Figura 19.** Modelo de superfície de resposta ajustada referente ao número de raízes obtidas de salix, a partir das brotações de segmentos nodais, em função de diferentes concentrações de carvão ativado - CA(g/L) e ANA (mg/L). UFLA, Lavras – MG, 2000. 42
- Figura 20.** Aspecto visual das raízes de salix formadas *in vitro* a partir de segmentos nodais. UFLA, Lavras – MG, 2000. 43
- Figura 21.** Aspecto visual de uma planta de salix obtida *in vitro* e transferida para caixas tipo gerbox. UFLA, Lavras – MG, 2000. 56
- Figura 22.** Caixa do tipo gerbox contendo uma plântula de salix envolvida por saco plástico. UFLA, Lavras - MG, 2000. 57
- Figura 23.** Aspecto visual de raízes de salix formadas *in vitro* na (A) ausência e (B) presença de carvão ativado. UFLA, Lavras – MG, 2000. 59

- Figura 24.** Enraizamento *in vitro* de brotações de salix (A) na ausência de carvão ativado e de AIB, (B) na presença de AIB, (C) na presença de apenas carvão ativado e (D) na presença de carvão ativado e AIB. UFLA, Lavras – MG, 2000. 60
- Figura 25.** Efeito da interação entre AIB (mg/L) e Carvão ativado (g/L) sobre o número de raízes formadas *in vitro* em brotações de salix. UFLA, Lavras – MG, 2000. 61
- Figura 26.** Aspecto de uma brotação de salix enraizada *in vitro*, em meio WPM suplementado com 4,0 g/L de Carvão ativado e 3,0 mg/L de AIB. UFLA, Lavras – MG. 2000. 62
- Figura 27.** Composto básico dos fenóis, hidroxibenzeno. UFLA – Lavras, 2000. 72
- Figura 28.** Molécula do fenol tetraidrocanabinol (THC) encontrado em *Cannabis sativa*. UFLA - Lavras, 2000. 73
- Figura 29.** Tipo de estruturas básicas das antocianinas. UFLA –Lavras, 2000. 73
- Figura 30.** Exemplo de uma substância fenólica (tanino), UFLA – Lavras, 2000. 74
- Figura 31.** Elagitanino, um exemplo de taninos hidrolisáveis. UFLA – Lavras, 2000. 75
- Figura 32.** Estrutura de um tanino condensado. UFLA – Lavras, 2000. 75
- Figura 33.** Esquema de obtenção dos extratos brutos de salix. UFLA, Lavras – MG, 2000. 80

- Figura 34.** Representação esquemática do equipamento adaptado para extração de óleo essencial pelo sistema de arraste a vapor – Laboratório de Química Orgânica – Departamento de Química – UFLA, 2000. 82
- Figura 35.** Espectro de infravermelho do óleo essencial de Salix. UFLA, Lavras – MG, 2000. 85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Modelos utilizados para a determinação da influência das concentrações isoladas de 2,4-D, ANA e BAP sobre o percentual de formação de calos e o peso deste. 14
- Tabela 2.** Quadro de análise de variância para o efeito das doses de 2,4-D sobre o peso dos calos. 15
- Tabela 3.** Valores percentuais de formação de calos e médios de peso ordenados segundo o teste de Duncan ($\alpha=0,05$) em função da concentrações de 2,4-D. 16
- Tabela 4.** Rendimento do extrato obtido utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol como extratores. 84

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D : ácido 2,4-dicloro – fenoxiacético
- AIA : ácido indolil – 3 - acético
- AIB : ácido indol butírico
- ANA : ácido naftaleno acético
- BAP (BA) : 6 – Benzilaminopurina (6 – Benzilamina)
- CA : Carvão Ativado
- GA₃ : Ácido giberélico
- IV : Infravermelho
- MS : Meio básico de Murashige e Skoog
- P/V : Peso por Volume
- THC : Tetraidrocannabinol
- V/V : Volume por Volume
- WPW : Meio básico Wood Plant Medium
- $\mu \text{ mol. S}^{-1}.\text{m}^{-2}$: Quantum

RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humboldtiana* Willd). Lavras, UFLA, 2001. 89p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal).

Várias espécies nativas apresentam baixo poder de germinação de sementes as quais, muitas vezes são dormentes ou possuem reservas reduzidas. Neste contexto, o uso da cultura de tecidos se torna uma ótima opção para a propagação do salix. O estudo fitoquímico de uma espécie vegetal, pode revelar substâncias de interesses diversos para o homem, além de auxiliar no estudo da espécie. Com o intuito de produzir mudas para fins ecológicos e comerciais, o presente trabalho trata da obtenção de mudas de salix através de um protocolo de propagação *in vitro*, e faz uma abordagem fitoquímica da espécie. Resultados desses estudos indicam que a formação de calos foi observada quando se utilizou o 2,4-D isolado ou na presença de combinações de ANA e BAP. O surgimento de brotações em calos friáveis só foi observado em meio de cultivo, contendo somente o regulador de crescimento BAP. O uso do GA₃ ou BAP favorece o surgimento de brotações múltiplas em segmentos nodais. É recomendado para a indução de raízes em salix, a utilização de 3,0 a 4,0 g/L de carvão ativado e doses de AIB, variando entre 2,5 a 3,0 mg/L. Na aclimatização houve uma perda de 100% de plântulas que saíram da condição *in vitro* sem passar pela fase de enraizamento; plântulas que possuíam raízes tiveram uma taxa de sobrevivência de 90%. Estes resultados viabilizaram a propagação de salix a partir do cultivo *in vitro*. Os rendimentos dos extratos brutos extraídos das folhas do salix foram: 3,26% em clorofórmio, 2,36% em acetato de etila, 0,94 e 0,85% em hexano e metanol, respectivamente. Ao se fazer a prospecção fenólica, identificou-se a presença de taninos condensados nos extratos brutos. O óleo obtido foi analisado por espectrofotometria de infravermelho; apresentando um rendimento de 0,1% e a análise deste apresentou grupos funcionais característicos de taninos condensados, confirmando o encontrado nos testes analíticos.

Comitê Orientador: Renato PAIVA, PhD – UFLA (Orientador), Dr^a Maria das Graças Cardoso – UFLA.

ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. *In vitro* propagation and phytochemical approach in salix (*Salix humboldtiana* Willd). Lavras, UFLA, 2001. 89p. (Dissertation – Masters in Agronomy/Plant Physiology)

Several native species present low seed germination capacity due to dormancy or reduced seed reserves. Thus, the use of tissue culture becomes an option for the propagation of salix. Phytochemical studies of plants species, can reveal substances of several interests for man, besides aiding in the study of the species. With the objective to produce plants for ecological and commercial purposes, the present work studied the *in vitro* propagation of salix as well performed an phytochemical approach of the species. The formation of callus was observed when only 2,4-D was used or in combination with NAA + BAP. Shoot appearance in friable callus was only observed in medium containing BAP. The use of GA₃ or BAP favors the appearance of multiple shoots from nodal segments. It is recommended for the induction of roots in salix the use of 3.0 to 4.0 g/L activated charcoal and AIB concentrations varying from 2.5 to 3.0 mg/L. During acclimatization there was a 100% loss of plantlets that left the *in vitro* condition without roots; plantlets that possessed roots had a rate of 90% survival. With these results, a protocol for the *in vitro* culture of salix is present. The yield crude extracts of leaves of salix were: 3.26% in chloroform, 2.36% in ethyl acetate, 0.94 and 0.85% in hexano and methanol, respectively. When performing the phenolic prospection, it was indentified the presence of condensed tannins in the crude extracts. The obtained oil analyzed by infra-red spectroscopy, showed a 0.1% yield whose analysis presented functional groups characteristics of condensed tannins, confirming which was found in the analytic tests.

Advisory Committee: Renato PAIVA, PhD – UFLA (Major Professor),
Dr^a Maria das Graças Cardoso – UFLA.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, existe um nível muito grande de devastação do cerrado e matas ciliares. As espécies existentes nestes ecossistemas, além do seu valor ecológico de proteção do solo, da fauna e da flora são também importantes na produção de fármacos, na alimentação alternativa e na exploração da madeira para diversos fins. O uso irracional das matas brasileiras pode desencadear uma degradação ambiental que acarretará a extinção de muitas espécies e um impacto ambiental forte, causando a destruição de ecossistemas importantes. Neste contexto se faz necessário o estudo de espécies nativas importantes para a recuperação dos ecossistemas degradados.

O salix (*Salix humboldtiana* Willd) é uma espécie encontrada em margens de rios e em locais úmidos, sendo explorada de forma não conservacionista. Além da extração de sua madeira, esta espécie está sendo ameaçada pela invasão ilegal das matas ciliares pela agropecuária, dragas de areia, e outras explorações lucrativas que degeneram o ecossistema no qual a espécie pertence.

Assim, faz-se necessário o estudo do salix com o intuito de preservar a espécie, utilizando os resultados para fins econômicos e ecológicos, recuperando áreas degradadas pela ação desenfreada dos homens, principalmente áreas de depleção na região do lago de Furnas, no sul de Minas Gerais, que apresentam um solo de alta umidade e também para fins medicinais.

Este trabalho objetivou estabelecer um protocolo de propagação do salix, através do cultivo *in vitro* e estudar aspectos fitoquímicos da espécie,

contribuindo para um melhor conhecimento desta, que é de grande importância para o ecossistema brasileiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características botânicas do salix (*Salix humboldtiana* Willd.)

O salix é uma espécie de grande utilidade para o homem, sua madeira pode ser empregada em obras internas, caixotaria, construções rurais e pasta celulósica. A árvore é extremamente ornamental, principalmente sua copa com ramos pendentes, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo em geral (Figura 1). Planta pioneira adaptadas à terrenos úmidos, indispensável para reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas ciliares degradadas. Tem por sinonímia botânica: *Salix chilensis* Molina, *Salix martiana* Leyb (Lorenzi, 1992). Esta espécie também é conhecida por salix, salseiro, salgueiro, salso-salseiro, oeriana e chorão. É uma árvore que possui uma altura entre 12 a 20m, com tronco de 40 a 60 cm de diâmetro. Os ramos são pendentes, possuindo folhas simples, glabras, de 8 a 12 cm de comprimento por 4 a 8 mm de largura (Figura 2). É uma planta decídua, heliófita, seletiva higrófito, pioneira, característica de matas ciliares de regiões de meia altitude. As inflorescências masculinas e femininas se apresentam em ramos distintos (Figura 2).

O salix é encontrado em matas ciliares, desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. É particularmente freqüente na área de ocorrência da floresta semidecídua de altitude e da mata pluvial atlântica dos três estados sulinos.

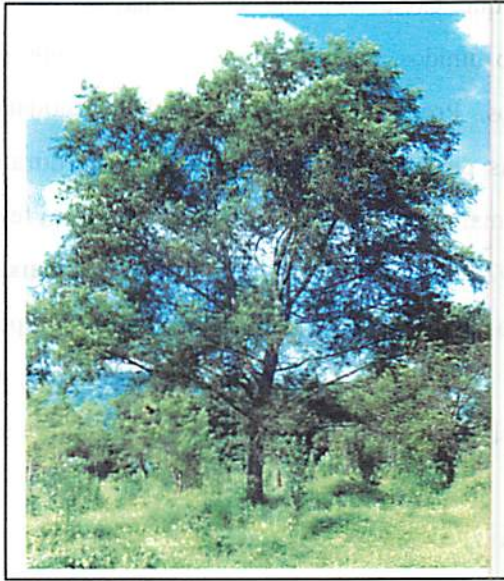


Figura 1. Aspecto visual de uma planta adulta de Salix (*Salix humboldtiana* Willd.) UFLA, LAVRAS – MG, 2000.



Figura 2. Aspecto da inflorescência masculina e feminina do Salix (*Salix humboldtiana* Willd.). Fonte: Lorenzi, 1992.

Ocorre quase que exclusivamente em formações secundárias, porém sempre em solos muito úmidos em beira de rios. Geralmente é encontrada em pequenos agrupamentos. Produz anualmente grande quantidade de sementes, facilmente disseminadas pelo vento e pela água. Floresce durante os meses de setembro a outubro. A maturação de seus frutos verifica-se em fevereiro até início de maio (Lorenzi, 1992). Sua madeira é leve, macia, de baixa resistência ao apodrecimento quando exposta, com alborno indistinto. Apesar da grande quantidade de semente e da sua fácil disseminação pelo vento, as sementes não possuem uma germinação eficiente, necessitando de auxílio para sua reprodução.

2.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é um processo, através do qual, pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente por períodos indeterminado em um meio nutritivo semi-definido ou definido. Esta definição original tem de ser, no momento, ampliado no caso de plantas, para incluir toda uma gama de explantes como plântulas e órgãos (tais como culturas de óvulos ou de embriões), e tão pequenos quanto células isoladas e protoplastos, (como cultura de células e de protoplastos, respectivamente). Tais avanços têm aumentado as perspectivas de operações possíveis de serem utilizadas, em diversos campos da biotecnologia de plantas (Torres e Caldas, 1990).

Um marco importante nesta área ocorreu em 1958 através de dois grupos independentes de pesquisadores, os quais conseguiram induzir embriões somáticos a partir do calo de cenoura, com subsequente desenvolvimento de plantas. Nos anos seguintes, observaram que um grande número de espécies de plantas era capaz de formar embriões somáticos *in vitro* (Ammirato 1983).

Os fenômenos morfogenéticos observados *in vitro* resultam da diferenciação, desdiferenciação ou rediferenciação do explante inicial e podem ser agrupados, conforme a sua natureza, de duas formas diferentes: morfogênese por via direta ou por via indireta (Gomes, 1999). As técnicas por via indireta podem ser empregadas, quando são desejadas variações genéticas nos descendentes, em virtude da possibilidade de obtenção de variantes em células provenientes do calo (Dickinson et al., citados por Cid, 1998). Em contrapartida a técnica direta, pode ser interessantes quando se deseja manter a identidade genética do genótipo propagado (Grattapaglia e Machado, 1998).

De acordo com George (1996), a utilização da cultura de tecidos para fins de propagação de plantas é comumente dividida nos seguintes estágios: estágio 0 (seleção e preparo da planta matriz), estágio 1 (estabelecimento de uma cultura asséptica), estágio 2 (produção de propágulos adequados), estágio 3 (preparação para o crescimento em meio natural) e estágio 4 (aclimação).

Bajaj (1986), comenta que explantes quando retirados de plantas jovens ou plântulas, apresentam melhores respostas de crescimento *in vitro* em relação a explantes obtidos de plantas adultas.

Segundo Read, Garton e Tormala (1989), a utilização de técnicas de micropropagação tem se mostrado viável para a propagação de espécies de salix. A cultura de tecidos, além de permitir a propagação de espécies com problemas de propagação sexuada, possibilita a obtenção de plantas isentas de viroses e de clones mais produtivos, preservação e intercâmbio de germoplasmas e estudos envolvendo biologia molecular.

2.3 Fitoquímica

O estudo químico das plantas pode ser desenvolvido, de modo geral, nas seguintes etapas principais e complementares; escolha da planta a ser estudada; identificação botânica da planta escolhida, prospecção preliminar de sua composição química, isolamento e purificação dos constituintes principais e determinação estrutural (Matos, 1997).

Para se proceder à caracterização de um determinado grupo de substâncias presentes em um vegetal, deve-se primeiro extrair compostos com um solvente adequado, para depois caracterizá-los no extrato. A caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido investigadas através de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (Simões et al., 1999).

A obtenção de extratos brutos de uma espécie é essencial para a realização dos estudos fitoquímicos, além de sugerir quais os tipos e substâncias que podem ser encontradas em cada fração. Para algumas substâncias, em certos vegetais, podem-se realizar reações de caracterização diretamente sobre os tecidos do material vegetal.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.G.V. Embriogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publisher Companh, 1983. v.1, p.123.
- BAJAJ, Y.P.S. Regeneration of plants from ultra-low frozen anthers of *Primula obconica*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.14, n.1, p.93-95, 1986.
- CID, L.P.B. Suspensão celular: In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1998. p.333-353.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. England: Exegetics, 1996. part 2, In Praticce
- GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de Moreira (Maclura tinctoria)**. Lavras - MG.: UFLA, 1999. p.92. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p.351.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p.344.
- READ, P.E.; GARTON, S.; TOMALA, T. Willows (*Salix* spp.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.5, p.370-338, 1989.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 1999. p.821.
- TORRES A.C.; CALDAS L.S. **Tecnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Local: EMBRAPA/CNPH, 1990.

CAPÍTULO II - INDUÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS

1 RESUMO

A cultura de calos está entre as mais importantes técnicas para se propagar espécies nativas que possuem problemas na reprodução sexuada. Com o objetivo de produzir mudas, para fins ecológicos e comerciais, este capítulo trata do desenvolvimento de metodologia para obtenção de calos friáveis. Folhas jovens foram utilizadas como explantes, sendo estas desinfestadas em câmara de fluxo laminar, utilizando-se álcool 70% (v/v) por 20 segundos e hipoclorito de sódio a 20% (v/v) durante 20 minutos. Após a desinfestação, os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 15 ml do meio de cultura MS, suplementado com 30 g/L de sacarose, 7,0 g/L de ágar e diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e BAP. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 120°C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e intensidade luminosa de 13 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ por um período de 35 dias. Explantes foliares de salix, que foram inoculados em meio MS desprovidos de reguladores de crescimento, não apresentaram a formação de calos friáveis. Foi observado uma produção expressiva de calos friáveis a partir de explantes foliares sob o efeito do 2,4-D isolado; ou na presença de combinações de ANA e BAP. O uso ANA ou BAP induziu a produção de calos seguida de rizogênese nos explantes.

2 ABSTRACT

Callus culture is one of the most important techniques used for the propagation of native species which present problems of sexual reproduction. With the objective to produce plantlets for ecological and commercial goals, a methodology of friable callus; induction was developed. Young leaves were used as explants, and disinfested in a laminar flow chamber using 70% alcohol (v/v) for 20 seconds and 20% sodium hypochlorite (v/v) for 20 minutes. After the disinfestation, the explants were washed with sterile water. The explants were inoculated in 15ml MS medium, supplemented with 30g/L sucrose, 7g/L ágar and different combinations of 2,4-D; NAA or BAP. The medium pH was adjusted to 5.8 and autoclaved to 120°C for 15 minutes. After the inoculation, the explants were maintained under cold white light, in a growth room with temperature of 25±2°C for a period of 35 days, when the morphogenetic callus induction was evaluated. Leaf explants of salix inoculated in MS medium without growth regulators did not present the formation of callus. The expressive production of friables callus from leaf explants was observed in the presence of isolated 2,4-D, or in the presence of combinations of NAA and BAP. The use of NAA or BAP induced the production of calluses followed by rotting.

3 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos de plantas iniciou-se em 1902, a partir das tentativas de Haberlandt de cultivar células isoladas de plantas, quando pouco mais tarde, suas teorias foram comprovadas, inclusive a da totipotência. Hoje, a cultura de tecidos continua contribuindo para o avanço, tanto da ciência, quanto das novas tecnologias. Mantell, Matthews e McKee (1994) comentam que o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos tem sido, indubitavelmente, uma das contribuições significativas para as possibilidades de manipulação de espécies de valores científicos.

Várias espécies nativas têm problemas com o baixo poder de germinação; muitas vezes são dormentes ou são sem reservas. Assim a cultura de tecidos se torna uma ótima opção para a propagação do salix, o qual possui uma semente muito pequena e que tem dificuldades na germinação.

Este capítulo trata da obtenção de calos friáveis através da cultura de tecidos, visando a posterior regeneração de plantas como uma alternativa para a propagação do salix.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Os calos são tecidos que podem apresentar diferenciação parcial. Estes são constituídos por uma massa de células irregulares, que se multiplicam desordenadamente em resposta a injúrias químicas ou físicas e que possuem a capacidade de se diferenciarem em tecidos e órgãos (Torres e Caldas, 1990).

De acordo com Gomes (1999), as espécies lenhosas são mais difíceis de serem propagadas *in vitro*, comparadas com espécies herbáceas, por apresentarem maior variabilidade genética, menor capacidade regenerativa dos

tecidos, menor taxa de multiplicação, maior concentração de fenóis, além de dificuldades de manutenção das plantas matrizes em casas de vegetação.

Para o sucesso da propagação *in vitro*, deve-se levar sempre em consideração a época do ano em que é feita a coleta de explantes e qual o tipo de explante que se está utilizando (Bonga, 1977).

Fortes (1992), comenta que utilizando substâncias endógenas de crescimento ou reguladores de crescimento, adicionados ao meio de cultura, o metabolismo celular é modificado de quiescente para um metabolismo ativo.

Para a produção *in vitro* de calos, ocorrem fases de indução, divisão e diferenciação celular. Na fase de indução, as células preparam-se para a divisão, o metabolismo é ativado e as células permanecem com tamanho constante. A duração desta fase depende do estado fisiológico das células (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977; citados por Gomes, 1999).

Gomes (1999), comenta que a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura visa suprir as possíveis deficiências dos teores de fitormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz. As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e geralmente, dependendo da concentração, causam alongação celular e expansão ou divisão celular. Em geral, com o uso de baixas concentrações de auxinas, predomina a formação de raízes adventícias, enquanto que altas concentrações induzem formação de calos. A interação entre auxinas e citocininas também é muito utilizada para a indução de calogênese. Hee-Ju *et al.* (1977) obtiveram calos de explantes foliares de *Lithospermum erythrorhizon*, utilizando a combinação entre a auxina ANA e a citocinina BAP.

A desdiferenciação e indução de regeneração de plantas a partir de calos são, muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo (Grattapaglia e Machado, 1990).

A morfogênese de calos nem sempre leva à formação de plântulas viáveis. Embora brotos e raízes possam ser emitidos, pode não ocorrer uma conexão vascular entre eles, o que é de extrema necessidade para a viabilização da plântula (Wetmore e Rier 1963). Arello (1991) não conseguiu viabilizar plântulas de *Kaibmeyera coriacea* provavelmente pela falta ou deficiência na conexão vascular entre as gemas e raízes ocasionada pela presença de calos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Metodologia de laboratório

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizadas como explantes, folhas jovens com aproximadamente 1,0 cm², retiradas de plantas matrizes com 4 meses de idade mantidas em viveiro com sombrite 50%, localizado no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Os explantes foram mantidos em água corrente por um período de 24 horas. A desinfestação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar utilizando-se álcool 70% (v/v) por 20 segundos e hipoclorito de sódio a 20% (v/v) durante 20 minutos. Após a desinfestação, os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada, por três vezes, para a eliminação do excesso de soluções desinfestantes.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml do meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose, 7,0 g/L de ágar e diferentes combinações de reguladores de crescimento.

Para o estudo dos efeitos isolados de 2,4-D utilizaram-se as concentrações de 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 mg/L.

Para o estudo do efeito isolado de ANA e BAP utilizaram-se, para cada regulador, as seguintes concentrações 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 mg/L.

O efeito conjunto de ANA e BAP foi estudado através das seguintes combinações T0 = 0 mg/L ANA + 0 mg/L BAP; T1 = 1,0 mg/L ANA + 1,0 mg/L BAP; T2 = 1,0 mg/L ANA + 2,0 mg/L BAP; T3 = 1,0 mg/L ANA + 4,0 mg/L BAP; T4 = 1,0 mg/L ANA + 6,0 mg/L BAP; T5 = 2,0 mg/L ANA + 1,0 mg/L BAP; T6 = 2,0 mg/L ANA + 2,0 mg/L BAP; T7 = 2,0 mg/L ANA + 4,0 mg/L BAP; T8 = 2,0 mg/L ANA + 6,0 mg/L BAP; T9 = 4,0 mg/L ANA + 1,0 mg/L BAP; T10 = 4,0 mg/L ANA + 2,0 mg/L BAP; T11 = 4,0 mg/L ANA + 4,0 mg/L BAP; T12 = 4 mg/L ANA + 6 mg/L BAP; T13 = 6 mg/L ANA + 1 mg/L BAP; T14 = 6,0 mg/L ANA + 2,0 mg/L BAP; T15 = 6,0 mg/L ANA + 4,0 mg/L BAP; T16 = 6,0 mg/L ANA + 6,0 mg/L BAP.

O pH meio de cultura foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 120°C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos, em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, intensidade luminosa de 13µmol.s⁻¹.m⁻² por um período de 35 dias, quando foi avaliada a indução de calogênese, em função do percentual de formação de calos e peso fresco.

5.2 Análise dos dados

O efeito das concentrações isoladas de 2,4-D sobre o peso dos calos nas amostras foi efetuado através de análise de variância, sendo os valores médios ordenados segundo o teste de Duncan. Em ambos os casos o nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

Ajustes linear (0.1), quadrático (0.2) e logístico (0.3) foram conduzidos para o percentual de formação de calos e do peso desses calos, sob a influência de doses isoladas de 2,4-D, ANA e BAP (Tabela 1).

Adotou-se o modelo que representasse uma menor quantidade de resíduo e um R^2 mais elevado. O modelo logístico foi conduzido somente no caso do percentual de formação dos calos.

Tabela 1. Modelos utilizados para a determinação da influência das concentrações isoladas de 2,4-D, ANA e BAP sobre o percentual de formação de calos e o peso deste.

Ajuste	Modelo	
Linear	$y = \beta_0 + \beta_1 x$	(0.1)
Quadrático	$y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2$	(0.2)
Logístico	$y = \frac{\exp(\beta_2 + (\beta_1 * x))}{1 + \exp(\beta_2 + (\beta_1 * x))}$	(0.3)

Os efeitos causados pela utilização das concentrações combinadas dos reguladores de crescimento ANA e BAP sobre o peso dos calos, foram caracterizados através da utilização de um modelo de superfície de resposta, definido por (0.4). Os valores máximos e mínimos da função foram obtidos através de diferenciação do modelo obtido.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 y + \beta_3 x^2 + \beta_4 y^2 + \beta_5 xy \quad (0.4)$$

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito isolado de 2,4-D

Foi observado um efeito significativo das concentrações de 2,4-D sobre a indução de calos friáveis a partir de segmentos foliares. Observa-se Tabela 2 o efeito do 2,4-D sobre o peso fresco dos calos de salix.

Tabela 2. Quadro de análise de variância para o efeito das doses de 2,4-D sobre o peso dos calos.

F.V.	g.l.	SQ	QM	F	P
Doses	6	3,384	0,564	28,206	***
Resíduo	37	0,740	0,020		
Total	43	4,124			

*** altamente significante ($p < 0,001$)

Os calos com maior peso fresco, 760 mg e 863 mg, podem ser obtidos utilizando-se as concentrações de 4,0 e 6,0 mg/L de 2,4-D, respectivamente. (Tabela 3). Um ajuste quadrático assinalou este comportamento (Figura3a).

Tabela 3. Valores percentuais de formação de calos e médios de peso ordenados segundo o teste de Duncan ($\alpha=0,05$) em função da concentrações de 2,4-D.

Doses (mg/L)	Calos (%)	Peso (mg)	
0,00	0,00	0,00	b
2,00	56,60	566,00	bc
4,00	76,00	760,00	a c
6,00	86,30	863,00	a
8,00	53,90	539,00	bc
10,00	53,90	539,00	bc
12,00	34,50	345,00	b d

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan a $p < 0,005$.

O percentual de formação de calos também apresentou um comportamento quadrático, sendo que a utilização de concentrações mais elevadas de 2,4-D tendem a reduzir o percentual de formação de calos (Figura 3 b). Explantes inoculados na ausência de reguladores de crescimento não apresentaram calogênese.

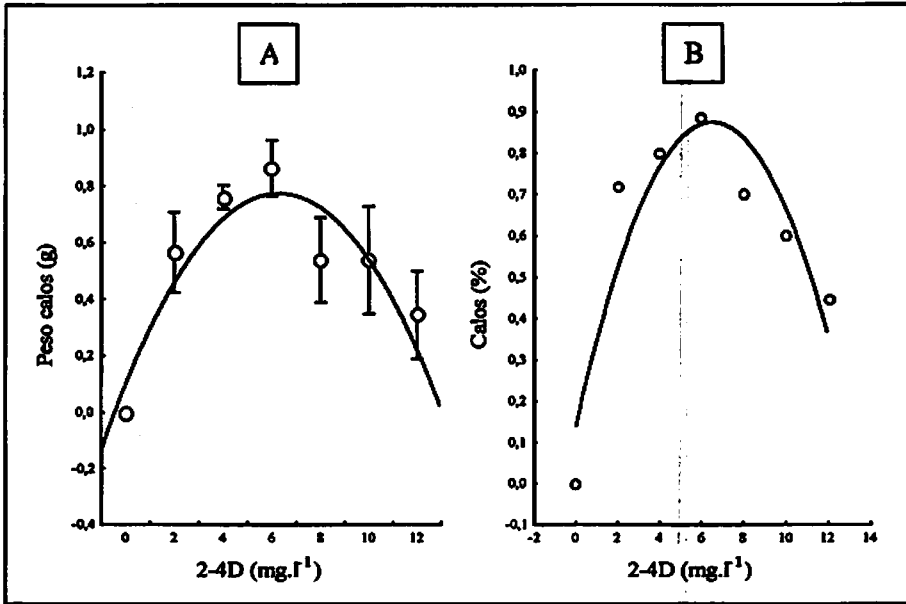


Figura 3. (A) Relação entre os valores médios e intervalo de confiança de 95% para o peso dos calos em função das doses de 2,4-D ajustado pelo modelo quadrático; e (B) relação entre o percentual de formação dos calos e doses de 2,4-D ajustado pelo modelo quadrático. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Observa-se na figura 3 que a utilização de concentrações superiores a 6,0 mg/L de 2,4-D reduzem o peso fresco dos calos de 863,0 mg para 345,00 mg, quando se utiliza 12 mg/L de 2,4-D. O mesmo pode ser observado quanto ao percentual de formação de calos que decresce de 86,3% (6 mg/L de 2,4-D) para 34,5% (12 mg/L de 2,4-D). A redução dos parâmetros observados com a utilização de concentrações elevadas pode estar relacionado a fitotoxidez causada pelo regulador de crescimento. O aspecto visual dos calos, obtidos em meio de cultivo contendo 2,4-D, é demonstrados na Figura 4.

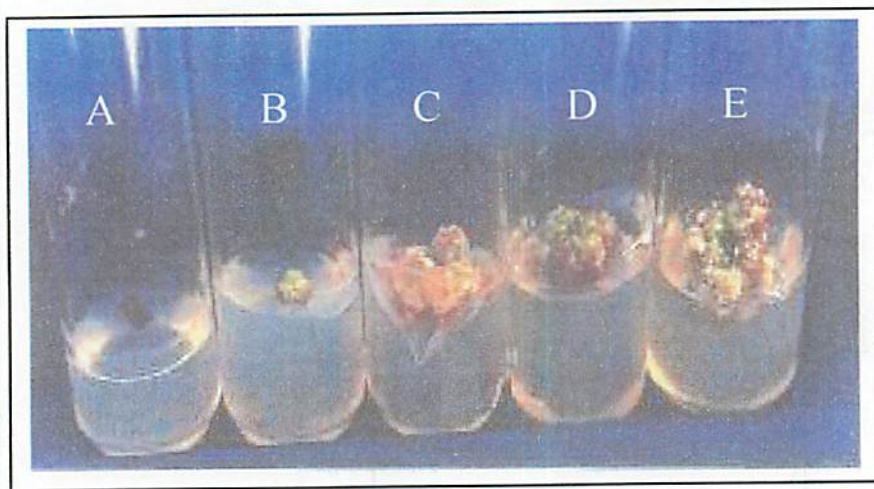


Figura 4. Aspecto visual dos calos obtidos em meio contendo 2,4-D. (A) Controle, (B) 2,0 mg/L, (C) 4,0 mg/L, (D) 6,0 mg/L, (E) 8,0 mg/L UFLA, Lavras – MG, 2000.

Esses resultados diferem dos observados por Gomes (1999), no qual houve a necessidade da combinação entre auxinas e citocininas para a indução expressiva de calos.

6.2 Efeitos isolados de ANA e BAP

O uso de concentrações individuais de ANA ou BAP, variando de 0 a 8 mg/L, foi capaz de promover rizogênese nos explantes foliares utilizados (Figura 5). Porém, antes de ocorrer o processo de rizogênese, houve a formação de calos, sendo estes descartados devido a presença das raízes.

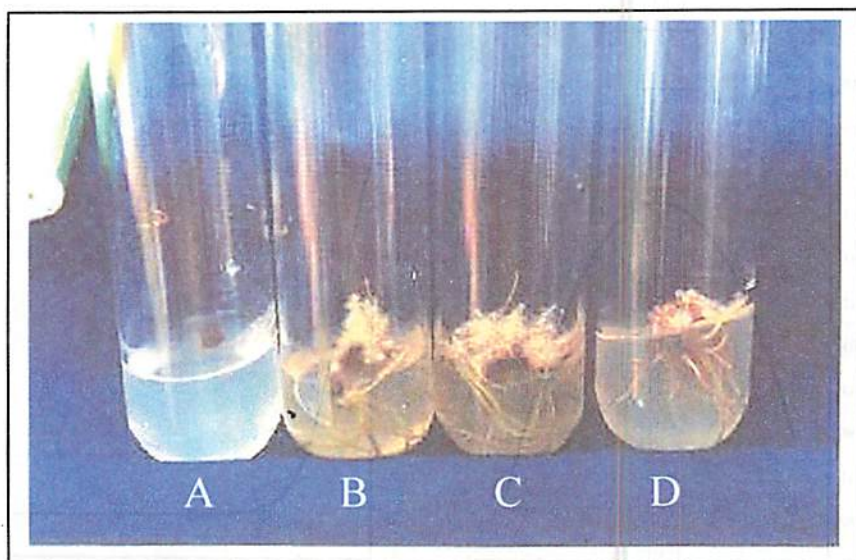


Figura 5. Rizogênese induzida por doses individuais de ANA e BAP. (A) Controle, (B) 2,0 mg/L de BAP, (C) 4,0 mg/L de BAP, (D) 4,0 mg/L de ANA . UFLA, Lavras – MG, 2000.

A presença de raízes em calos de salix não é desejada, uma vez que procura-se otimizar a produção de calos, visando a formação inicial de brotações. Com os resultados deste experimento recomenda-se a utilização de ANA nas concentrações de 3,5 a 4,5 mg/L; e concentrações de BAP inferior a 1,0 mg/L para a obtenção de raízes (Figura 6).

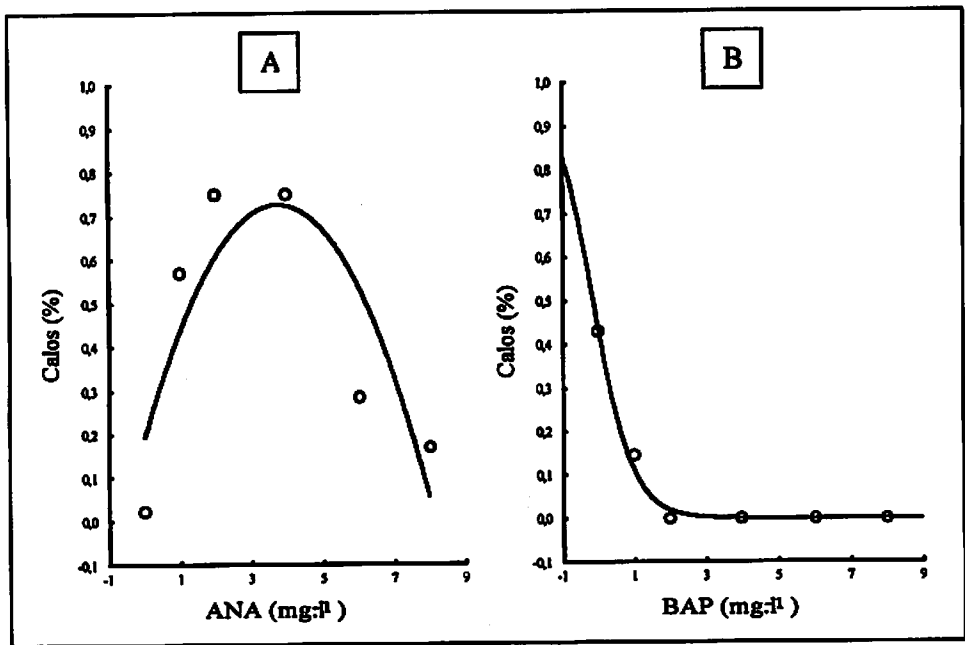


Figura 6. Relação entre as doses de (A) ANA e (B) BAP e o percentual de formação de calos. UFLA, Lavras – MG, 2000.

6.3 Efeito das combinações de ANA e BAP

Embora o uso isolado de ANA ou BAP seja capaz de induzir a formação de raiz em calos de segmentos foliares de salix, a combinação destes reguladores induz somente a formação de calos (Figura 7).

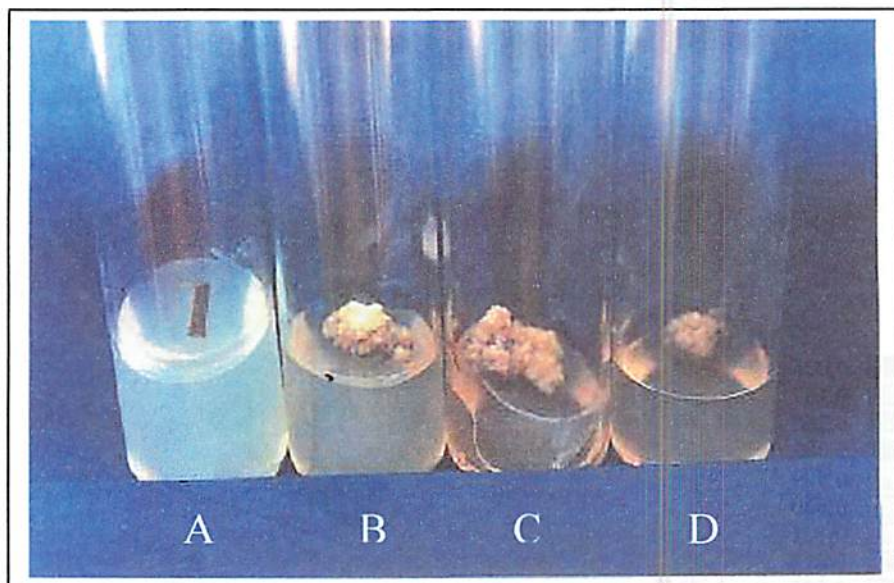


Figura 7. Aspecto visual dos calos obtidos em meio MS acrescido de combinações entre BAP e ANA. (A) Controle, (B) 2,0 mg/L BAP + 4,0 mg/L ANA, (C) 4,0 mg/L de BAP + 2,0 mg/L de ANA, (D) 2,0 mg/L BAP + 2,0 mg/L de ANA. UFLA, Lavras - MG, 2000.

De acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 8), sem a combinação dos reguladores de crescimento ANA e BAP não há desenvolvimento de calos. Entretanto, para que haja uma boa produção de massa calogênica é indicado que se utilize proporções inversas dos mesmos. Ou seja, quando a concentração de ANA for mínima, recomenda-se utilizar concentrações de BAP acima de 4,0 mg/L. Utilizando quantidades reduzidas de BAP, recomenda-se acrescentar doses de ANA acima de 6,0 mg/L.

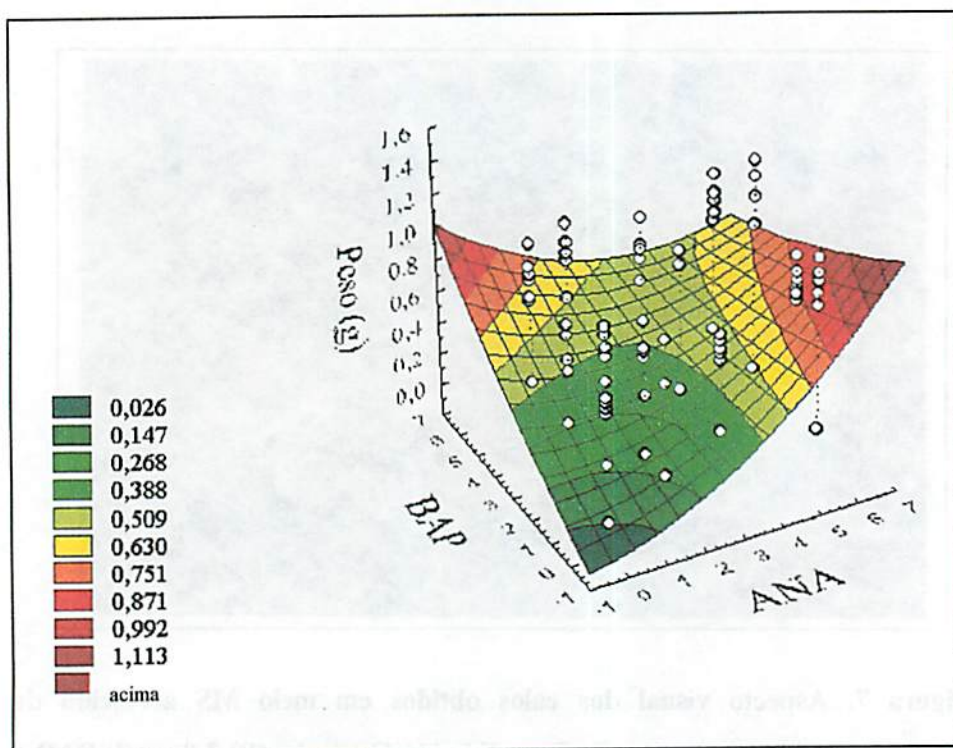


Figura 8. Superfície de resposta para os efeitos de ANA e BAP sobre peso dos calos. UFLA, Lavras, 2000.

Um dos principais passos para propagar uma espécie em cultura de tecidos é a indução da formação de calos friáveis. Para espécies que apresentam dificuldade de propagação via sexuada como o salix, a multiplicação indireta via calos pode ser uma alternativa para facilitar sua propagação. A obtenção de calos friáveis é importante para o estudo do seu cultivo *in vitro*, uma vez que é possível obter posteriormente embriões somáticos e/ou induzir respostas morfogênicas.

7 CONCLUSÕES

Explantos foliares de salix inoculados em meio MS, desprovido de reguladores de crescimento não apresentam a formação de calos friáveis.

A produção expressiva de calos friáveis, a partir de explantes foliares, foi observada quando se utilizou o 2,4-D isolado; ou na presença de combinações de ANA e BAP.

Recomenda-se o uso de 4,0 mg/L de 2,4-D para a indução de calos friáveis a partir de explantes foliares.

O uso de concentrações individuais de ANA ou BAP induziu a produção de calos seguida de rizogênese nos explantes.

É recomendado que ao se utilizar as combinações de ANA e BAP, manter as concentrações inversas, ou seja: utilizando-se uma dose alta de BAP, a dose de ANA deve ser baixa e vice-versa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLO, E.F. Aspectos gerais do comportamento *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* Martius (Guttiferae): produção e enraizamento de brotações. Lavras: ESAL, 1991. p.148. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)
- BONGA, J.M. Application of tissue culture in forestry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin, 1977. p.93-108.
- FORTES, G.R.L. Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1992. p.163. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).
- GOMES, G.A.C. Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*). Lavras - MG.: UFLA, 1999. p.92. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-169.
- HEE-JU, Y.; OH, S.K.; CHOI, D.; KWON, Y.M.; KIM, S. Plant regeneration from callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, n5, p.261-266, Feb. 1997.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p.344.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- TORRES A.C.; CALDAS L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Local: EMBRAPA/CNPH, 1990.
- WETMORE, R.H.; RIER, J.P. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. **American Journal of Botany**, Columbus, v.50, p.418-430, 1963.

CAPÍTULO III - INDUÇÃO DE BROTAÇÕES DE SALIX A PARTIR DE CALOS FRIÁVEIS E SEGMENTOS NODAIS

1 RESUMO

Este capítulo objetivou estabelecer um modo alternativo de propagação do salix através da obtenção de brotações *in vitro*, a partir de calos friáveis e segmentos nodais. Calos friáveis previamente obtidos a partir de explantes foliares e segmentos nodais foram inoculados em meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 7,0 g/L de ágar e diferentes combinações de: GA₃, BAP, ANA e carvão ativado. A produção máxima de brotações (25 brotos) formadas a partir de calos de salix, foi observada quando se utilizou 2,0 mg/L de BAP. O uso de BAP ou GA₃, favorece o surgimento de mais de um broto por explante e não induz o enraizamento. ANA em combinações com carvão ativado induz a formação de brotações e raízes. O uso de 4,84 g/L de carvão ativado em combinações com 3,2 mg/L de ANA induz a formação em média de 1,1 brotos por segmento nodal. Para a indução de raízes nos brotos originados de segmentos nodais, recomenda-se a utilização de 2,97 g/L de carvão ativado e 3,2 mg/L de ANA.

2 ABSTRACT

The objective of this work was to establish an alternative procedure for propagation of salix through the induction of *in vitro* shoot formation, from friables callus and nodal segments. Friables callus previously obtained from leaf and nodal explants were inoculated in MS medium supplemented with 30 g/L sucrose, 7.0 g/L ágar and different combinations of GA₃, BAP, NAA and activated charcoal. The maximum shoots production (25) formed from salix callus was observed when 2.0 mg/L BAP was used. The use of BAP or GA₃, favors the appearance of more than one shoot per explant and it does not induce rooting. NAA in combination with activated charcoal induced shoot and root formation. The use of 4.84 g/L activated charcoal in combination with 3.2 mg/L NAA induced an average formation of 1.1 shoot per nodal segment. For root induction on shoots formed from nodal segments it is recommended the use of 2.97 g/L activated charcoal and 3.2 mg/L NAA.

3 INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto. Além da capacidade para a multiplicação rápida de plantas, a micropropagação também oferece um meio de eliminação de muitas doenças de plantas cultivadas.

O uso irracional das matas brasileiras pode desencadear uma degradação ambiental que acarretará a extinção de muitas espécies e um impacto ambiental forte, tais como: assoreamento, desertificação e destruição de ecossistemas importantes. Neste contexto se faz necessário o estudo de espécies nativas importantes para a recuperação dos ecossistemas degradados.

Assim, faz-se necessário o estudo do salix com o intuito de preservar a espécie, utilizando os resultados para fins econômicos e ecológicos, recuperando áreas degradadas pela ação desenfreada dos homens; principalmente áreas de depleção na região do lago de Furnas situada no sul de Minas Gerais, que apresentam um solo de alta umidade.

Este capítulo objetivou estabelecer um modo alternativo de propagação do salix (*Salix humboldtiana* Willd) através da obtenção de brotações *in vitro*, a partir de calos friáveis e segmentos nodais, contribuindo para uma melhor propagação e difusão desta espécie.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

O pequeno tamanho dos micropropágulos e sua capacidade de proliferar em ausência de solo facilitam a manutenção adequada, manejo e rápida disseminação dos materiais propagados por meio de transporte aéreo. Em conexão com estes benefícios da micropropagação, encontra-se também a disponibilidade da cultura de tecidos para a conservação de germoplasmas (Roca, Bryan e Roca, 1979).

Explantos adequados de espécies de plantas vasculares, que incluem angiospermas, gimnospermas e samambaias podem ser cultivados *in vitro* e serem induzidos a formar brotos adventícios, gemas, embriões e plantas inteiras (Conger, 1981).

A micropropagação pode ser feita através de brotos apicais e axilares. Os brotos axilares são aqueles que emergem a partir de suas posições normais, nas axilas das folhas, enquanto que os brotos apicais são os que ocupam a extremidade apical (Mantell, Matthews e McKee, 1994)

Hussey (1983) comenta que a maioria das espécies vasculares tem um modo indeterminado de crescimento, sendo que as axilas das folhas contêm meristemas subsidiários, cada um dos quais é capaz de desenvolver um broto que é idêntico ao eixo principal.

Mantell, Matthews e McKee (1994) afirmam que brotos apicais cultivados em meio basal, sem regulador de crescimento, desenvolvem-se tipicamente em brotos semelhantes a plântulas, com forte dominância apical. Entretanto, quando os brotos do mesmo tipo de explante crescem em meio contendo citocinina, brotos axilares se desenvolvem prematuramente. Isto resulta em uma ramificação precoce, que provoca o desenvolvimento de brotos secundários, terciários, etc., em uma massa em proliferação.

De acordo com George (1996), a partir da zona de atividade meristemática em tecidos de calo e, também nos explantes primários, as divisões celulares e o padrão de diferenciação podem ocorrer de maneira que conduzam a um grau de organização morfo-anatômico peculiar, que no caso de caracterizar um órgão definido, constitui-se no processo denominado organogênese.

Preece (1991), citado por Gomes (1999), comenta que num explante ou tecido de calo pode ocorrer a formação *de novo* (neoformação) de gemas caulinares vegetativas que evoluem para eixos caulinares. Embora gemas adventícias sejam geralmente indesejáveis para a micropropagação, pois podem resultar em variantes somaclonais, em ecossistemas naturais essa variação é fundamental.

A neoformação de órgãos decorre de processos de desdiferenciação, divisão celular e organização de novos meristemas ou zonas de atividade meristemática (Kerbaui, 1986).

O desencadeamento de um processo morfogenético, na maioria dos casos, requer a adição de reguladores de crescimento aos meios de cultivo. As citocininas são derivadas da purina, e ocorrem naturalmente em plantas superiores, e em vários tipos de bactérias. São também conhecidas como o "hormônio vegetal de cicatrização". A maior função das citocininas é promover a divisão celular, porém outros efeitos fisiológicos são também atribuídos às citocininas como desenvolvimento de gemas laterais, estimulador de germinação de sementes e retardante do processo de senescência (Gomes, 1999).

George (1996) afirma que, apesar de geralmente se utilizar auxinas e citocininas para a indução de brotações, o uso da auxina 2,4-D, induz calogênese na maioria dos casos.

O uso de reguladores de crescimento em altas concentrações, em particular as citocininas, podem induzir brotações com crescimento reduzido, o

que pode ser corrigido através da redução do nível de citocininas utilizadas ou através da realização de um subcultivo na presença de GA₃ no meio de cultura (Zang e Stoltz, 1991).

Embriogênese adventícia ou embriogênese assexual é o desenvolvimento de embriões a partir de células que não são o produto de fusão gamética (Ammirato, 1983).

Com a descoberta das funções independentes da auxina e citocinina na indução de raízes e de brotos em culturas de calos e de um processo denominado organogênese, pôde se estabelecer que: uma taxa relativamente alta de auxina em relação de citocinina (AIA/cinetina) favorece a formação de raiz, o reverso favorece a formação de broto e que concentrações intermediárias favorecem a proliferação contínua de calos em fumo (Skoog e Miller, 1957).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Indução de brotações de salix a partir de calos friáveis

5.1.1 Metodologia de laboratório

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados explantes obtidos da fragmentação de calos friáveis obtidos em meio de cultivo contendo 2,4-D, com tamanho de aproximadamente 1 cm², formados a partir de explantes foliares.

Os calos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30,0 g/L de sacarose, 7,0 g/L de ágar e os seguintes reguladores: GA₃, BAP e ANA, nas concentrações 0,0;

0,5; 1,0; , 1,5; e 2,0 mg/L de cada fitorregulador e suas possíveis interações.

O do meio de cultura foi ajustado para pH 5,8 e autoclavado a 120°C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25 °C ± 2 e sob intensidade de 13μ mol.s⁻¹m⁻² de quanta por um período de 40 dias, quando foram realizadas as avaliações.

5.1.2 Análise de dados

O delineamento estatístico adotado na execução deste experimento foi o inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento, sendo que cada repetição era composta por um explante.

5.2 Indução de brotações a partir de segmentos nodais

5.2.1 Metodologia de laboratório

Segmentos nodais de 1,0 cm de comprimento, contendo uma gema axilar, foram utilizados como explantes. Estes foram retirados de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação, localizada no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Após serem coletados, os explantes foram imersos em água corrente por um período de 24 horas. A desinfestação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar através de imersão em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 20%, durante 15 minutos. Ao fim da desinfestação, os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada, por três vezes, para remoção do excesso das soluções desinfestantes.

Para observar o efeito isolado de GA₃ e BAP na indução de brotações de

salix, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 15 ml do meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 mg/L de sacarose, 7g/L de ágar e as seguintes concentrações de GA₃ ou BAP (0; 0,5 ;1,0 ; 2,0 mg/L). Foi inoculado um explante por tubo de ensaio.

Para observar o efeito da combinação entre ANA e carvão ativado na indução de brotações de salix, explantes foram inoculados em frascos contendo 30 ml do meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30,0 g/L de sacarose, 7,0 g/L de ágar; sendo adicionado as seguintes doses de ANA (0, 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/L) e as concentrações de carvão ativado 0, 2,0; 4,0 e 6,0 g/L.

Após ajustar o pH dos meios de cultivo para 5,8, estes foram autoclavados a 120 °C por 15 minutos.

Após inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, a 25°C ± 2 e intensidade luminosa de 13μ mol.s⁻¹.m⁻² por um período de 25 dias.

5.2.2 Análise dos dados

Para observar o efeito isolado do uso de GA₃ e BAP, foi utilizado um delineamento estatístico inteiramente casualizado, sendo composto por 12 repetições.

Os reguladores e suas concentrações foram avaliados de maneira conjugada através do teste de Kruskal-Wallis, correspondente não paramétrico da análise de variância. Os valores médios foram ordenados segundo o teste de Duncan, sem nenhuma perda devida à sua elasticidade quanto às violações das pressuposições da análise de variância paramétrica. A frequência de ocorrência de formação de brotos foi avaliada através de um teste de χ^2 de contigência.

Os efeitos causados pela utilização das concentrações combinadas de

ANA e carvão ativado sobre os segmentos nodais, foram caracterizados através da utilização de um modelo de superfície de resposta.

A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se na qualidade do ajustamento e se possível na ausência de significância dos desvios de regressão. Para a disposição gráfica do modelo linear de regressão, levou-se em conta que: $f(x) = \exp \{ K + 2_1X_1 + 2_2X_2 + 2_3X_2^2 + 2_4X_2^2 + 2_5X_2^2 \}$; em que $f(x)$ é o modelo de regressão, que é função de X_1 (concentração de ANA) e de X_2 (concentração de carvão ativado).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Indução de brotações de salix a partir de calos friáveis

Esta etapa do estudo *in vitro* do salix é de grande importância, pois pode propiciar uma futura produção em grande escala de plântulas as quais podem ser utilizadas para fins comerciais ou ecológicos.

O desenvolvimento de brotações a partir de calos friáveis foi observado quando se utilizou BAP no meio de cultivo nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 mg/L (Figura 9). Estes resultados são concordantes com Mantell, Matthews e McKee (1994), quando relataram que com o emprego de citocininas, tais como BAP, pode-se obter brotações .

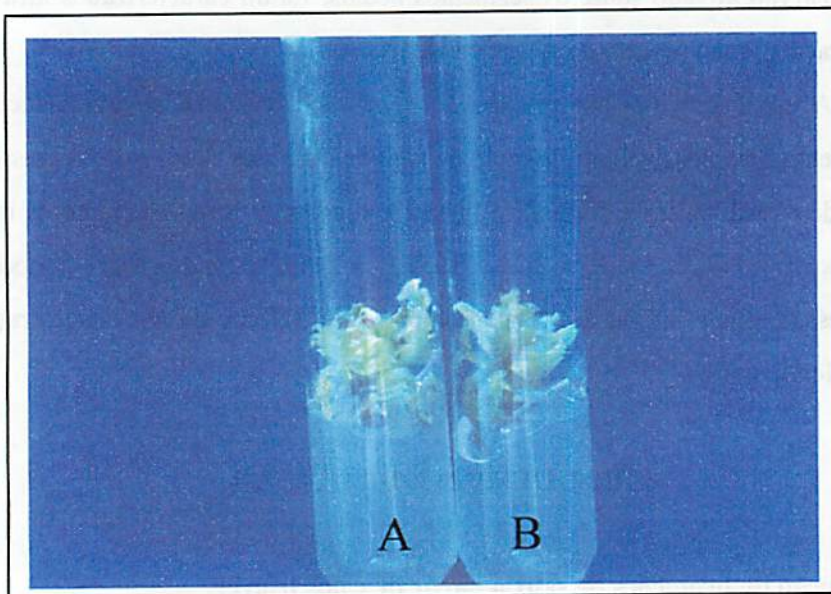


Figura 9. Brotações de salix obtidas a partir de calos friáveis mantidos na presença de (A) 1,0 mg/L e (B) 0,5 mg/L de BAP. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Com realação ao usos de BAP, a Figura 10 demonstra o número de brotações médias obtidas por explante, mostrando uma maior eficiência relativa no tratamento que utilizou 2 mg/L de BAP, formando-se 25 brotos por explante.

A medida que se aumentou a concentração de BAP obteve-se um aumento no número de brotos induzidos. Utilizando-se 2,0 mg/L, o número de brotações formadas (25 brotos) quadruplica em relação ao uso de 1,0 mg/L (Figura 10).

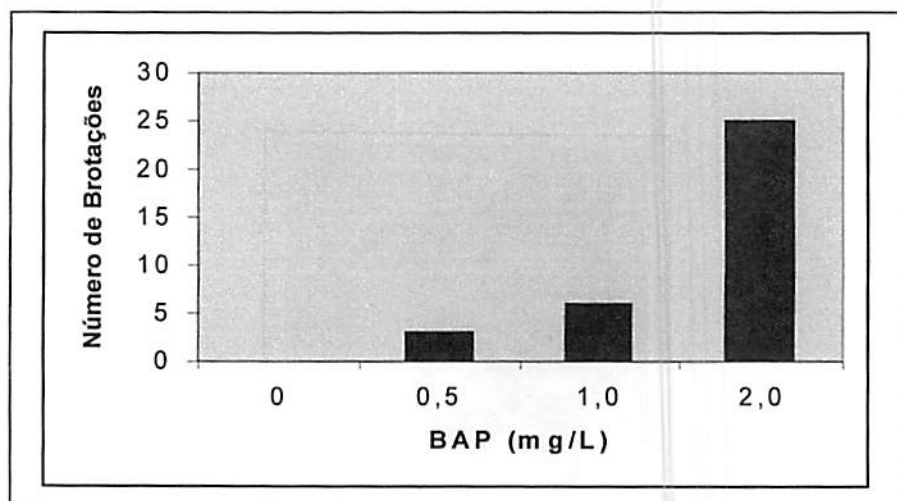


Figura 10. Número de brotações em concentrações individuais de BAP.
UFLA, Lavras – MG , 2001.

Nas Figuras 11 e 12, observa-se os aspectos visuais das brotações de salix obtidos a partir de calos friáveis cultivados na presença de BAP e suas etapas de desenvolvimento, respectivamente.

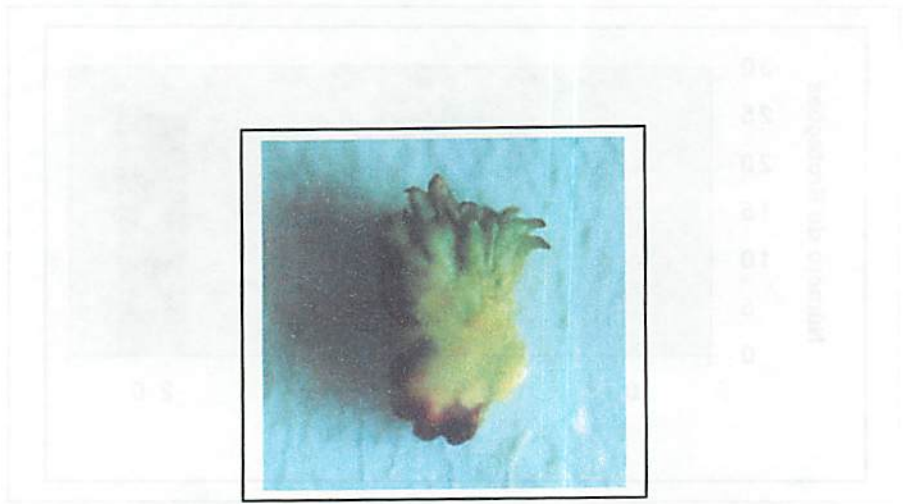


Figura 11. Brotações originadas de calos de *Salix* em meio de cultivo contendo BAP. UFLA, Lavras – MG, 2000.

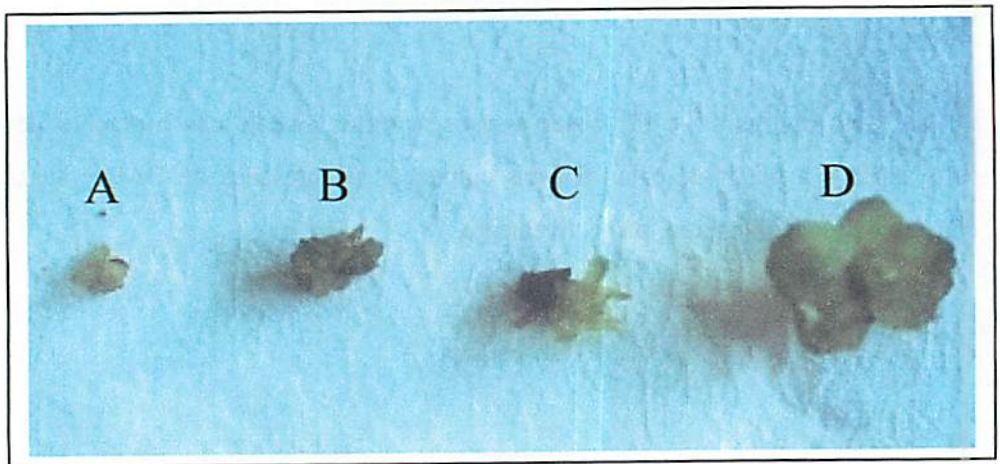


Figura 12. Etapas do desenvolvimento das brotações de *salix*: (A) surgimento do broto no calo (forma globular); (B) início do desenvolvimento do broto, (C) brotos apresentando o 1º par de folhas e (D) broto completamente formado. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Concordando com (Ammirato, 1983), as brotações obtidas através de calos friáveis de salix, constituem um método de propagação viável para ser utilizado na clonagem, necessitando-se de uma pequena área de laboratório e em menor espaço de tempo do que o requerido para a produção normal de sementes ou propagação vegetativa.

6.2 Indução de brotações de salix a partir de segmentos nodais

Foi observado o desenvolvimento das brotações em todos os tratamentos, contendo GA₃ ou BAP. Mesmo não havendo diferença estatística, nota-se uma diferença entre o controle e os demais tratamentos com o uso de GA₃, apresentando 75% de indução quando utilizado na concentração de 1,0 mg/L (Figura 13).

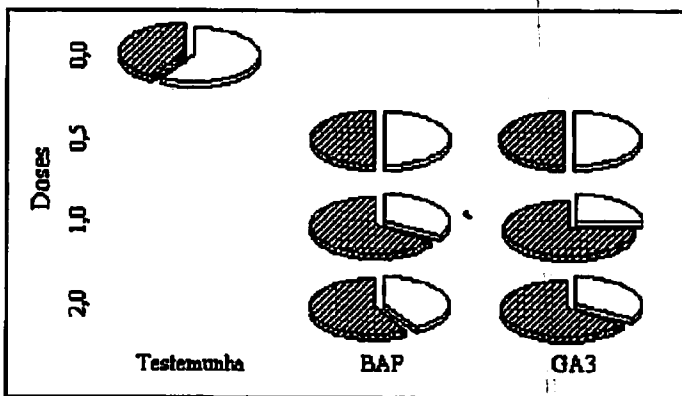


Figura 13. Porcentagem de formação de brotos (parte rachurada) em função das concentrações de BAP e GA₃. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Embora Gomes (1999) destaque que para desencadear um processo morfogênético, na maioria dos casos, requer-se a adição de reguladores de crescimento aos meios de cultivo; o uso destes não foi necessário para o salix, tendo em vista o desenvolvimento de brotações em meio desprovido dos fitorreguladores GA₃ e BAP (Figura 14).

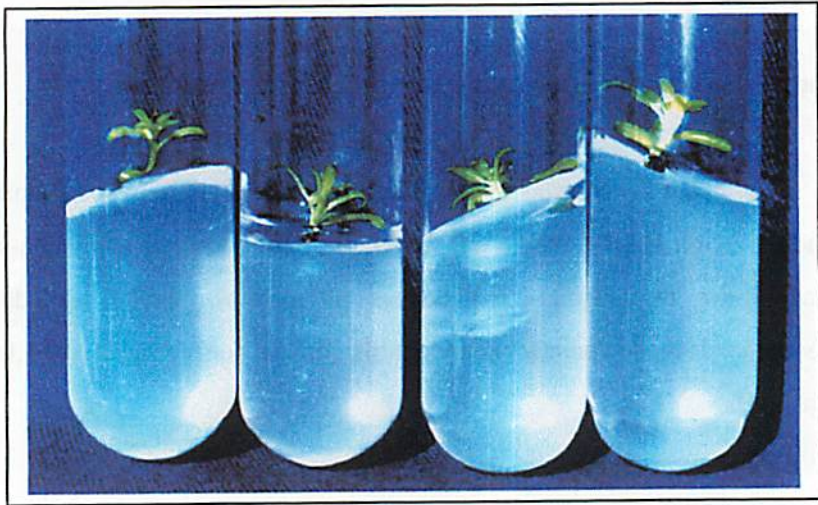


Figura 14. Brotações de salix a partir de segmentos nodais, obtidas em meio de cultivo desprovido de GA₃ e BAP; UFLA, Lavras – MG, 2000

Com relação ao número de brotos por explante (Figura 15 e Figura 16) houve significância dos tratamentos em relação ao controle. O uso de GA₃ ou BAP foi mais eficiente do que o controle. Comparando-se os dois reguladores, o uso de GA₃ foi superior, possibilitando a formação de 2 brotos por explante quando estes foram inoculados na presença de 2,0 mg/L .

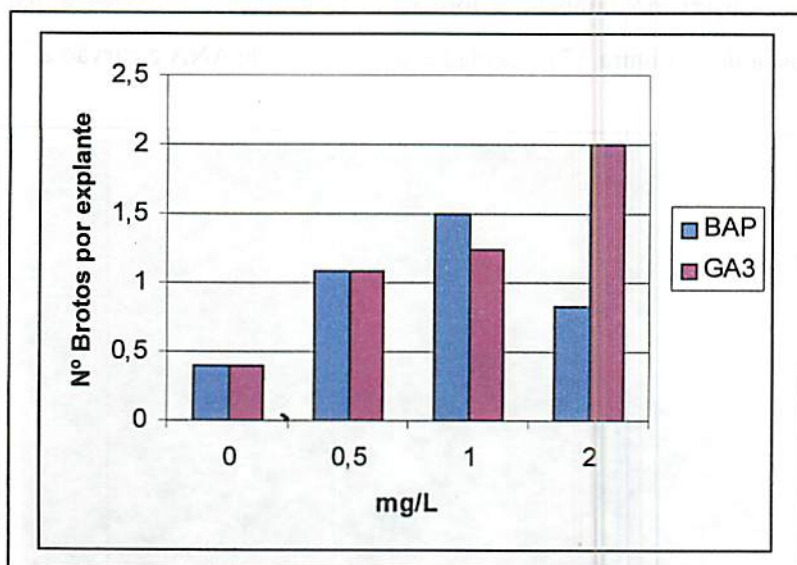


Figura 15. Valores médios de número de brotações em função das concentrações de BAP e GA₃. UFLA, Lavras – MG, 2000.

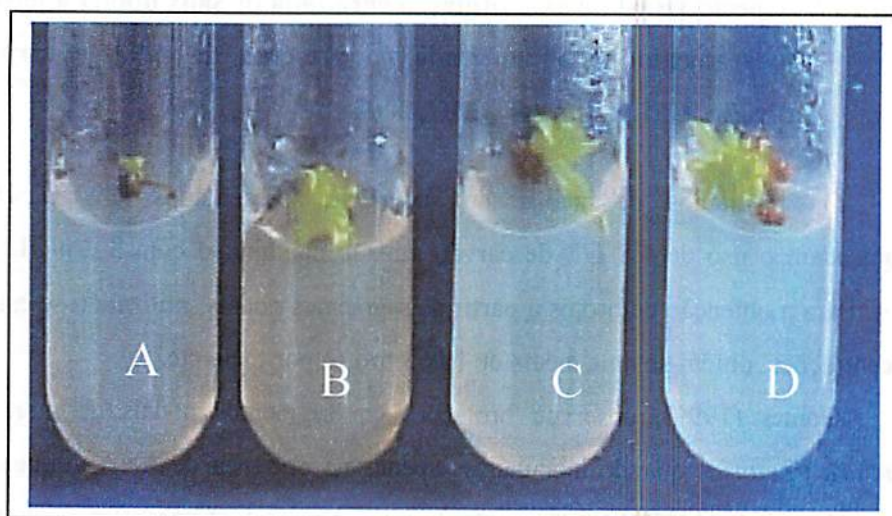


Figura 16. Brotações de salix obtidos de segmentos nodais. (A) Controle; (B) 1,0 mg/L de BAP; (C) 0,5 de BAP e (D) 2,0 mg/L GA₃. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Foi observado também a formação de brotações e raízes a partir de segmentos nodais (Figura 17) inoculados na presença de ANA e carvão ativado.

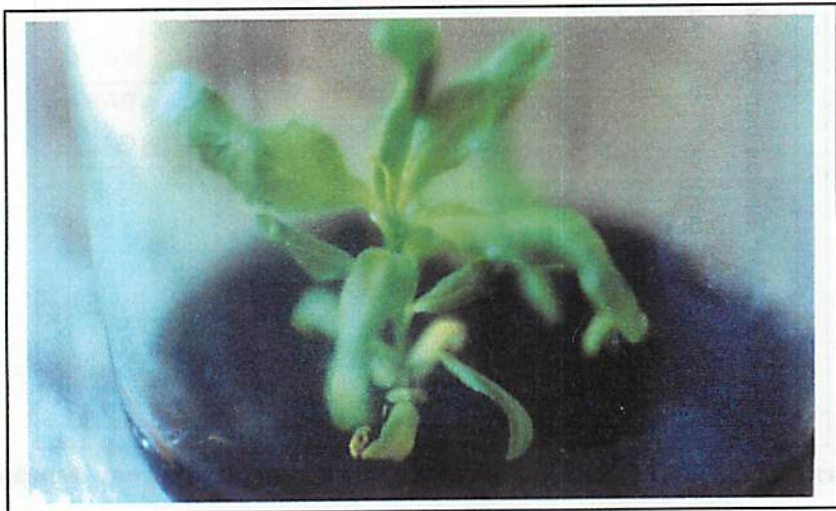


Figura 17. Aspecto visual de uma brotação enraizada de salix obtida a partir de segmento nodal inoculado na presença de ANA e carvão ativado. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Os resultados de análise de superfície apresentados (Figura 18), recomendam o uso de 4,8 g/L de carvão ativado combinado com 3,2 mg/L de ANA. Para a obtenção de brotos a partir de segmentos nodais, utilizando-se essas concentrações, obtêm-se uma média de 1,063 brotos por explante.

Gomes (1999), observou brotações em segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) quando inoculados apenas na presença de ANA, e que em doses acima de 0,5 mg/L há a formação de calos. Com relação ao salix, nenhuma brotação foi observada na ausência de ANA.

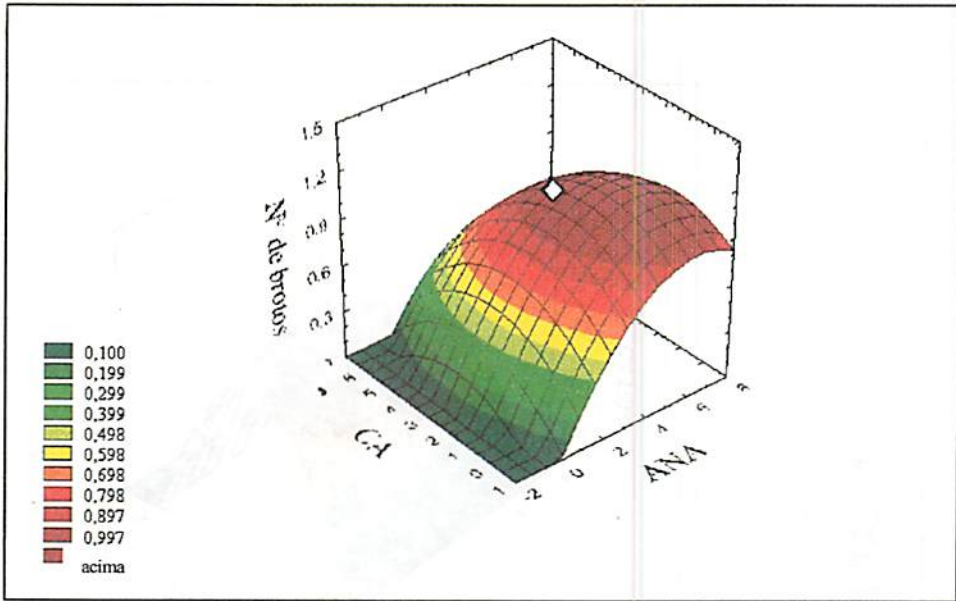


Figura 18. Modelo de superfície de resposta ajustada referente ao número de brotações obtidas de *Salix* a partir de segmentos nodais em função de diferentes concentrações de carvão ativado - CA (g/L) e ANA (mg/L). UFLA, Lavras – MG, 2000.

Observa-se pela análise de superfície de resposta (Figura 19), que com o uso de 2,97 g/L de carvão ativado e 3,2 mg/L de ANA, proporciona um melhor enraizamento nos brotos originados de segmentos nodais.

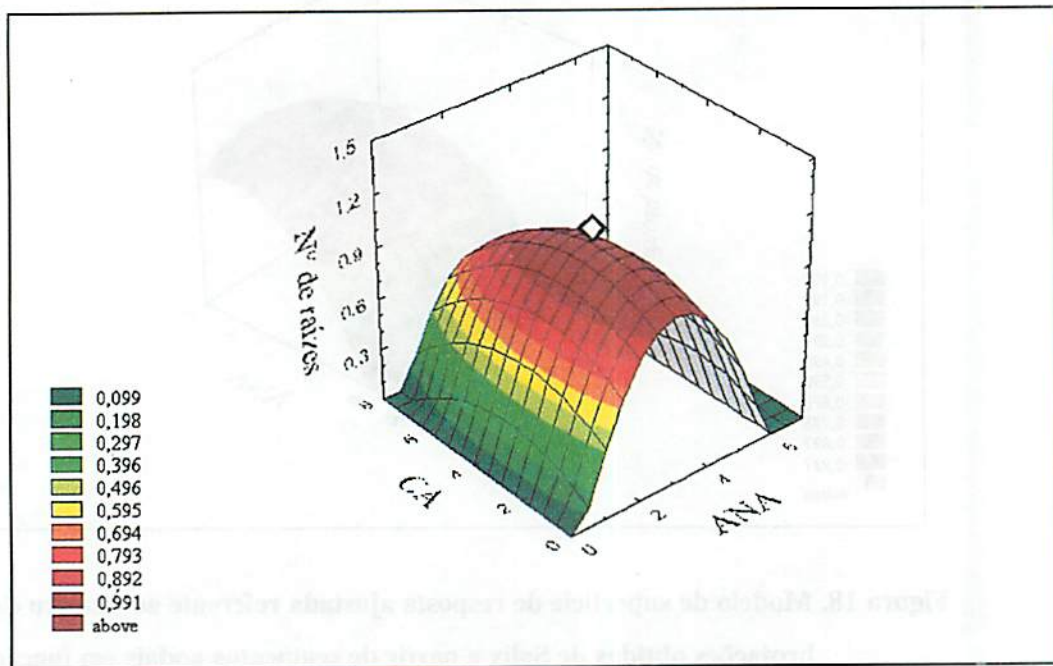


Figura 19. Modelo de superfície de resposta ajustada referente ao número de raízes obtidas de salix, a partir das brotações de segmentos nodais, em função de diferentes concentrações de carvão ativado – CA (g/L) e ANA (mg/L). UFLA, Lavras – MG, 2000.

O aspecto visual das raízes de salix formadas *in vitro* pode ser observado na Figura 20. A produção de raiz em uma determinada espécie é a etapa final da micropropagação, cujo sucesso garante a sobrevivência da plântula *in vivo*.



Figura 20. Aspecto visual das raízes de salix formadas *in vitro* a partir de segmentos nodais. UFLA, Lavras – MG, 2000.

7 CONCLUSÕES

É possível obter brotações adventícias a partir de calos friáveis de salix inoculados em meio de cultura suplementado com 2,4-D.

A produção máxima de brotações formadas a partir de calos de salix foi observada quando se utilizou 2,0 mg/L de BAP, obtendo-se 25 brotos.

A indução de brotações de salix a partir de segmentos nodais pode ser obtida na ausência de GA₃ e BAP.

O uso de BAP ou GA₃, favorece o surgimento de mais de um broto por explante e não induz o enraizamento.

ANA, em combinações com carvão ativado, induz a formação de brotações e raízes.

O uso de 4,84 g/L de carvão ativado em combinações com 3,2 mg/L de ANA induz a formação em média de 1,1 brotos por segmento nodal.

Para a indução de formação de raízes nos brotos originados de segmentos nodais de salix, recomenda-se a utilização de 2,97 g/L de carvão ativado e 3,2 mg/L de ANA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.G.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publisher Companh, 1983. v.1, p.123.
- CONGER, B.C. **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Florida: CRC Press, 1981.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Englend: Exegetics, 1996. part 2, In Praticce .
- GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. Lavras - MG.: UFLA, 1999. p.92. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- HUSSEY, G. ***In vitro* propagation of Narcissus**. **Annals of Botany**, London, v.49, n.2, p.707-719, May 1983.
- KERBAUY, G.B.; PETERS, J.A.; HELL, K.G. Cytokinin autotrophy and differentiation in tissue cultures of haploid *Nicotiam tacacum*. **Plant Science**, Shannon, v.45, n.2, p.125-132, 1986.
- KOUL, A.K.; KARIHALOO, J.L. ***In vivo* embryod from anthers of *Narcissus biflorus* Curt**. **Euphytica**, Wageningen, v.26, n.1, p.97-12, Feb. 1997
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p.344.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- ROCA, W.M.; BRYAN, J.E.; ROCA, M.R. Tissue culture for international transfer of potato genetic resources. **American Potato Journal**, Orono, v.55, p.691-701, 1979.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Synoposia of the Society for Experimental Biology, v.11, p.118-131, 1957.

TORRES A.C.; CALDAS L.S. Tecnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Local: EMBRAPA/CNPH, 1990.

ZANG, B.; STROLTZ, L.P. *In vitro* proliferation and *in vivo* establishment of *Euphorbia fulgens*. HortScience, Alexandria, v.21, p.859, Aug. 1991.

CAPÍTULO IV - ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE SALIX OBTIDAS *IN VITRO*

1 RESUMO

O *Salix* (*Salix humboldtiana* WILLD) é uma espécie pioneira adaptada a terrenos úmidos, o que a torna uma planta de interesse para programas de reflorestamentos mistos destinados à recomposição de matas ciliares degradadas, entretanto, apresenta baixa viabilidade de sementes. Este capítulo trata da indução do enraizamento em brotações obtidas através do processo de micropropagação e da aclimatização destas. Brotações obtidas através do processo de micropropagação, com aproximadamente 3,0 cm de comprimento, foram transferidas para meio WPM suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e acrescido das combinações entre AIB (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L) e carvão ativado (0; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 g/L). Foi possível induzir o enraizamento *in vitro* de brotações de *Salix* somente na presença de AIB e carvão ativado. Recomenda-se para a obtenção de rizogênese *in vitro* de *salix*, a utilização de 4,0 g/L de carvão ativado combinado com 3,0 mg/L de AIB. Plântulas de *salix* obtidas através da micropropagação, podem ser aclimatizadas, utilizando-se sombrite 50% por 18 dias, obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 90%.

2 ABSTRACT

Salix (*Salix humboldtiana* WILLD) is a pioneer species adapted to humid soil, and due to this characteristic it became a plant of interest for programs of mixed reforestations, it presents low viability of seeds. This chapter studied root induction in shoots obtained through micropropagation process and their acclimatization. Shoots obtained through the micropropagation process, with approximately 3.0 cm length, were inoculated in WPM medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% ágar and the following combinations of AIB (0; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 or 5.0 mg/L) and activated charcoal (0; 1.0; 2.0; 4.0 or 6.0 g/L). *In vitro* rooting of salix shoots was induced only in the presence of AIB and activated charcoal. It is recommended for the *in vitro* salix rooting, the use of 4.0 g/L activated charcoal in combination with 3.0 mg/L AIB. Salix plantlets obtained through micropropagation, can be acclimatized, using 50% sombrite for 18 days; presenting with procedure a 90% plantlet survival.

3 INTRODUÇÃO

Atualmente, existe um nível muito grande de devastação do cerrado e matas ciliares no Brasil. As espécies existentes nestes ecossistemas, além do seu valor ecológico de proteção do solo, da fauna e da flora; são também importantes na produção de fármacos, na alimentação alternativa; bem como na exploração da madeira para diversos fins.

O uso irracional das matas brasileiras pode desencadear uma degradação ambiental que acarretará a extinção de muitas espécies e um impacto ambiental forte, tal como assoreamento, desertificação, e destruição de ecossistemas importantes. Neste contexto, se faz necessário o estudo de espécies nativas importantes para a recuperação dos ecossistemas degradados.

O salix é uma espécie encontrada em margens de rios e em locais úmidos, a qual tem sido explorada de forma não conservacionista; além da extração de sua madeira, esta espécie está ameaçada pela invasão ilegal das matas ciliares pela agropecuária, dragas de areia, e todo o tipo de explorações lucrativas que degeneram o ecossistema no qual a espécie pertence.

Com o objetivo de produzir mudas de salix para fins ecológicos e comerciais, este trabalho objetivou estabelecer um protocolo para induzir o enraizamento *in vitro* e posterior aclimatização das plântulas de salix (*Salix humboldtiana* Willd).

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Enraizamento

A fase de enraizamento *in vitro* se caracteriza pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, o posterior transplântio da plântula para condições *ex vitro*.

O enraizamento de espécies herbáceas é geralmente fácil, porém, o mesmo não ocorre com as espécies lenhosas. Esse problema se agrava a medida que não se utiliza material jovem, uma vez que a capacidade de formar raízes adventícias, ao aproximar-se a fase adulta de sua vida, é reduzida (Torres, Caldas e Buso, 1998).

A etapa de enraizamento pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. No primeiro sistema, as raízes são regeneradas em condições assépticas e a planta é transplantada para substrato. No segundo sistema, as partes aéreas são manipuladas como microestacas e todo o processo de enraizamento se dá em substrato. A opção por um dos sistemas depende da qualidade das partes aéreas obtidas na multiplicação da espécie, do genótipo e da disponibilidade de infraestrutura adequada em casa de vegetação (Torres, Caldas e Buso, 1998).

A rizogênese *in vitro* é dividida em 4 fases: indução, iniciação, organização e alongamento. A fase de indução, inicia-se quando a capacidade para a formação de raízes é determinada. Na fase de iniciação, mudanças citológicas, como o aumento no tamanho de células, são observadas. Na fase da organização, inicia-se a formação histológica dos primórdios radiculares e na fase de alongação os primórdios radiculares já se encontram em crescimento para a formação do sistema radicular (Gomes, 1999).

Na maioria das vezes, os pesquisadores atribuem às auxinas a capacidade

de proporcionarem mudanças intracelulares necessárias para a indução do enraizamento (Gomes, 1999). O uso de auxinas no meio, normalmente é responsável pela indução do enraizamento. No entanto, em algumas espécies, a rizogênese pode ocorrer sem a necessidade de adição de auxinas (George, 1996).

Com o aumento da concentração de auxina no meio, George (1996) percebeu um aumento no número de raízes de várias espécies herbáceas, formadas por explante, no entanto, quando concentrações elevadas foram utilizadas, a formação de calos foi verificada.

Kantharaj (1988), citado por Gomes (1999), constata que um aumento nos níveis de auxinas nos primeiros estágios do processo de indução de enraizamento mostra-se suficiente para iniciar as primeiras divisões celulares que levam ao desenvolvimento dos primórdios radiculares.

Ao analisar plantas com dificuldades de enraizamento, Hess (1962) contatou a presença de um co-fator fenólico na indução do enraizamento, que atuava de forma sinérgica com as auxinas.

O envolvimento das peroxidases no controle do nível interno de auxinas e em processos fisiológicos como lignificação, também tem sido observado (Gomes, 1999).

O pH do meio de cultivo é um dos fatores que também pode influenciar o processo de enraizamento *in vitro*. Em geral, pH entre 4,5 e 5,5, mostra-se eficiente na indução de enraizamento.

O enraizamento de espécies lenhosas, quando comparado ao de espécies herbáceas, geralmente é mais difícil e se agrava à medida que não se utiliza material jovem, uma vez que a restauração da competência de enraizamento diminui ao aproximar-se da fase adulta. A qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação determina, em geral, o sucesso do enraizamento. Partes aéreas pequenas não enraízam bem e necessitam de uma

fase intermediária de alongamento (Deccetti, 2000).

Alguns compostos podem ser adicionados ao meio de cultivo para auxiliar a indução da rizogênese. Uma das substâncias mais utilizadas é o carvão ativado em concentrações que variam em torno de 0,1 a 2% (p/v).

O carvão ativado é utilizado para estimular a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem. Em termos químicos, o carvão ativado exerce um efeito de retenção de alguns componentes do meio de cultivo. Também exerce função de fixação de citocininas residuais liberadas pelos tecidos vegetais ou absorvem compostos tóxicos inibidores do enraizamento (Gomes, 1999). O carvão ativado pode fixar também auxinas e reter fenóis oxidantes, sendo de uma forma geral benéfico, promovendo o alongamento das raízes.

4.2 Aclimatização

Torres, Caldas e Buso (1998) comentam que a etapa do transplântio envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para a casa de vegetação, onde é submetida a uma fase de aclimação e endurecimento. Esta passagem é crítica e representa em alguns casos, um fator limitante no processo de micropropagação.

Deccetti (2000), afirma que os principais fatores envolvidos na aclimatização de mudas micropropagadas são: o genótipo, estresse hídrico, alteração do metabolismo heterotrófico para autotrófico, infecção por patógenos e o estresse pela luz. Mesmo plantas com aspecto normal sofrem estresse devido à súbita mudança de umidade relativa. Pré-tratamentos de redução de umidade relativa no frasco de cultura podem ser aplicados para aumentar a sobrevivência no transplântio. Brainerd e Fuchigmi (1981) aumentaram a sobrevivência das plântulas, abrindo as tampas dos frascos ainda na sala de incubação, durante 4 a

5 dias antes do transplante, submetendo-as a uma umidade relativa de 30 a 40%, o que proporciona uma aclimação mais rápida dos estômatos.

Quando se tem uma planta micropropagada, sua anatomia interna e ultraestrutura, geralmente é diferente daquela encontrada em plantas cultivadas em casa de vegetação (Wetzstein et al., 1981). Comparando-se as plantas obtidas *in vitro* com as desenvolvidas *in vivo*, as plantas micropropagadas apresentam-se pouco lignificadas, com células de paredes pouco espessadas, abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida quantidade de tecidos de sustentação. Sabe-se ainda que as raízes adventícias desenvolvidas em meio de cultura, contendo água, possuem sistema vascular pouco desenvolvido e no caso de plantas lenhosas e semi-lenhosas, o crescimento não é observado. Como consequência, somente uma pequena porcentagem dessas raízes sobrevive à aclimação.

Wardle, Quinian e Simpkins (1979) ressaltam que o acúmulo de grandes reservas de amido nas folhas de plantas propagadas *in vitro* é um fator necessário para a sobrevivência das plântulas durante as duas primeiras semanas *ex vitro*. Além de possuir aparelho fotossintético ineficiente, as folhas das plântulas produzidas *in vitro* também possuem menor quantidade de cera epicular quando comparadas com plântulas cultivadas em casa de vegetação. Tal fato é responsável pela transpiração excessiva que, aliada à redução no número de estômatos, ao mal funcionamento no mecanismo de abertura e fechamento estomático e à má estruturação do clorênquima, levam ao dessecamento e murchamento das folhas. Esses fatores são considerados como as causas mais comuns da baixa sobrevivência pós-plantio.

Assim, torna-se obrigatório que a plântula ao sair da condição *in vitro* deva passar por um processo de aclimação antes de serem levadas para o campo. Este processo pode ser dispendioso e levar um tempo considerável,

limitando-se assim, o uso de micropropagação em escala comercial (Gomes, 1999).

Segundo McCown (1988), o período de aclimatização varia de 1 a 4 semanas, e corrige as alterações ou anormalidades induzidas *in vitro*, o que inclui a transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico e o estabelecimento de relações hídricas normais, através da regulação da perda e da absorção de água.

Pode-se distinguir três métodos para se realizar uma aclimação. Os primeiros são métodos que procuram aproximar as condições *in vitro* das condições naturais. Existem também os que procuram aproximar as condições naturais daquelas *in vitro* e por fim métodos que favorecem o crescimento após a aclimação (Deccetti, 2000).

A eliminação da etapa de enraizamento *in vitro*, pode ser vantajoso do ponto de vista econômico, por proporcionar melhora na qualidade do sistema radicular formado (Torres, Caldas e Buso, 1998). A obtenção de enraizamento *ex vitro* é considerada fácil em espécies herbáceas, mas difícil em espécies lenhosas. Segundo McCown (1988), o enraizamento varia de acordo com a espécie, desde o fácil enraizamento e crescimento radicular, até a inibição completa.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Enraizamento de brotações

5.1.1 Metodologia de laboratório

Brotações obtidas através do processo de micropropagação, com aproximadamente 3,0 cm de comprimento, foram transferidas para meio WPM (Lloyd e McCown, 1980) suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e acrescido das combinações de AIB (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L) e carvão ativado (0; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 g/L).

O pH do meio de cultura foi ajustado, antes da autoclavagem, para 5,8. Após o ajuste do pH, o meio de cultura foi autoclavado por 15 minutos a 120°C.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultivo em câmara de fluxo laminar, e mantidos em sala de crescimento sob intensidade luminosa de $13 \mu \text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 dias, quando foi avaliado o número de raízes formadas.

5.1.2 Análise de dados

Para a análise dos dados adotou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento, sendo que cada frasco era composto por um explante.

Os efeitos causados pela utilização das doses de AIB e carvão ativado sobre o enraizamento das brotações foram caracterizados através da utilização de um modelo de superfície de resposta.

A escolha do melhor modelo de regressão, baseou-se na qualidade do

ajustamento e se possível na ausência de significância dos desvios de regressão. Para a disposição gráfica do modelo linear de regressão, levou-se em conta que: $f(x) = \exp \{ K + 2_1X_1 + 2_2X_2 + 2_3X_2^2 + 2_4X_2^2 + 2_5X_2^2 \}$; em que $f(x)$ é o modelo de regressão, que é função de X_1 (concentração de AIB) e de X_2 (concentração de carvão ativado).

5. 2 Acclimatização de plântulas de salix obtidas *in vitro*

Plântulas de salix obtidas através do cultivo *in vitro* foram aclimatizadas com o objetivo de obter plantas capazes de ser transferidas para o campo.

As plântulas de salix foram transferidas para caixas gerbox contendo vermiculita (Figura 21). Logo após a transferência para caixas gerbox, as plântulas foram envolvidas por sacos plásticos transparentes (Figura 22), com a finalidade de manter um microambiente com uma alta umidade relativa.



Figura 21. Aspecto visual de uma planta de salix obtida *in vitro* e transferida para caixas tipo gerbox. UFLA, Lavras – MG, 2000.



Figura 22. Caixa do tipo gerbox contendo uma plântula de salix envolvida por saco plástico. UFLA, Lavras - MG, 2000.

A cobertura plástica foi removida gradualmente até o 9º dia de aclimatização, para que as plântulas fossem se adaptando à redução de umidade.

As plântulas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para auxiliar no processo de aclimatização, a luminosidade foi controlada com o uso de um sombrite 50% ($25 \mu\text{mol. s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) por um período de 18 dias.

Após este período, as plântulas foram transplantadas para vaso plásticos de 4L, contendo terra, areia e esterco na proporção de 3: 2: 1, permanecendo nestas condições até que estivessem aptas à transferência para o campo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Enraizamento de brotações de salix obtidas in vitro

De acordo com os resultados obtidos, observou-se a formação de raízes em brotações inoculados na ausência de carvão ativado e a formação de calos entre a parte aérea e as raízes, sendo que estas raízes não são consideradas eficientes por não terem ligação direta com o câmbio da brotação.

Foi observado também, o escurecimento do meio de cultivo, indicando a presença de substâncias fenólicas possivelmente liberadas pelas brotações (Figura 23 A). o escurecimento do meio pela ação de fenóis prejudica o desenvolvimento normal das plântulas, recomendando-se utilizar carvão ativado para evitar este efeito (Figura 23 B). Moncousin (1991) comenta que, para a maioria das espécies lenhosas, há a necessidade de utilizar compostos antioxidantes durante o processo de enraizamento para minimizar os efeitos maléficos dos compostos fenólicos presentes em grande quantidade.

Nesses estudos observa-se a diferença causada pelos fenóis entre os meios, tanto quanto a diferença entre o desenvolvimento da parte aérea e raiz (Figura 23).

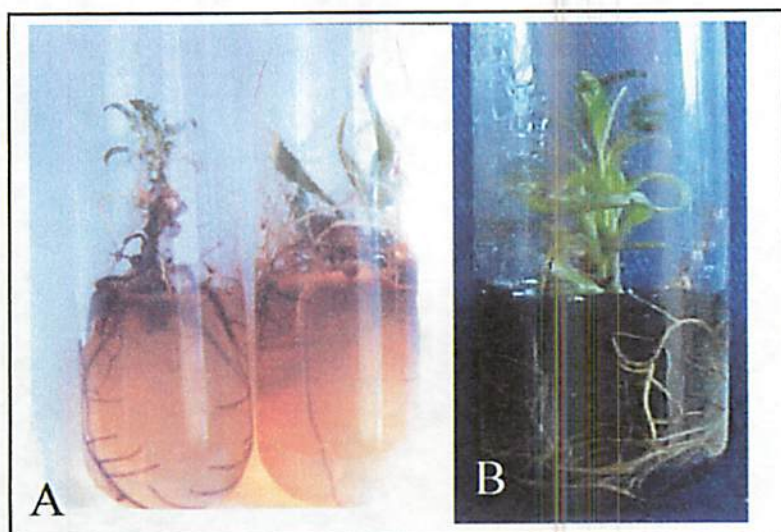


Figura 23. Aspecto visual de raízes de salix formadas *in vitro* a partir de brotações na (A) ausência e (B) presença de carvão ativado. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Não foi observado a formação de raízes (Figura 24 A) nas brotações inoculadas na ausência de AIB e carvão ativado. A utilização de carvão ativado na ausência de AIB foi suficiente para induzir a rizogênese (Figura 24 C), resultado concordante ao de Druart et al.(1982), os quais sugerem que o processo de enraizamento pode ser induzido apenas pela utilização do carvão ativado, que promove uma ausência de luz na região da raiz.

A interação entre o carvão ativado e AIB demonstrou ser benéfica para o enraizamento das brotações de salix obtidas *in vitro*. Um bom enraizamento foi obtido pela presença do AIB e ausência do efeito fitotóxico causado por possíveis substâncias fenólicas liberadas no meio, as quais foram adsorvidas pelo carvão ativado (Figura 24 D).

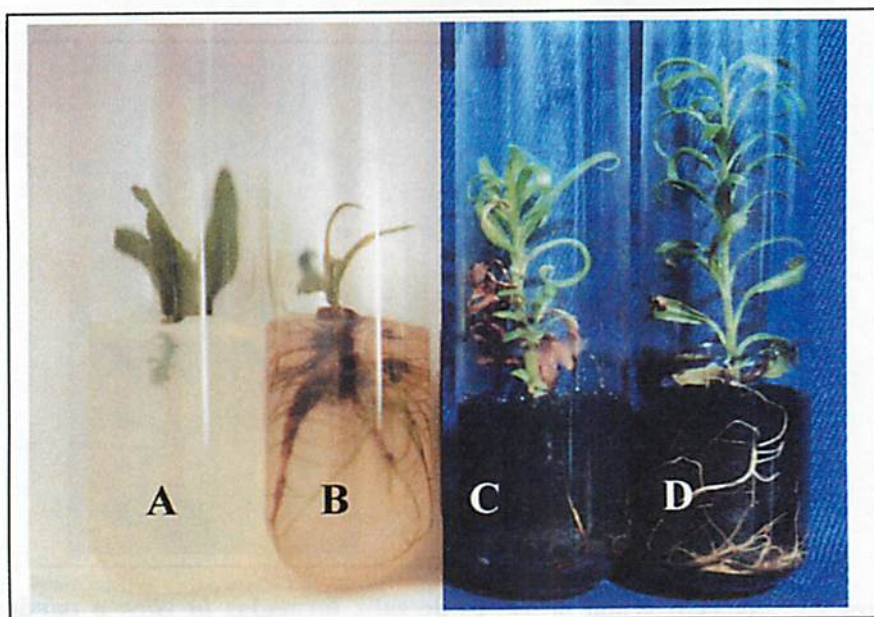


Figura 24. Enraizamento *in vitro* de brotações de salix (A) na ausência de carvão ativado e de AIB, (B) na presença de AIB, (C) na presença de carvão ativado e (D) na presença de carvão ativado e AIB. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Baseado no modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 25), o número máximo de raízes (25/brotação), pode ser obtido utilizando-se 4,0 g/L de carvão ativado associado a 2,7 mg/L de AIB.

O resultado obtido por este trabalho é condizente com Read, Garton e Tormala (1989), quando induziram raízes em brotações de *Salix alba*, obtidas em cultivo *in vitro*, utilizando meio WPM (Lloyd e McCown, 1980) suplementado com 3,0 mg/L de AIB.

O carvão ativado e AIB estimularam a indução de raízes em brotações de salix. Este efeito estimulatório também foi retratado por Dumas e Monteuis

(1995), em estudos com *Pinus pinaster*. Sanchez e Vititez (1996), também induziram o enraizamento em brotações de *Quercus robur* e *Quercus rubra* utilizando os efeitos positivos do carvão ativado em conjunto com a auxina AIB (Figura 25).

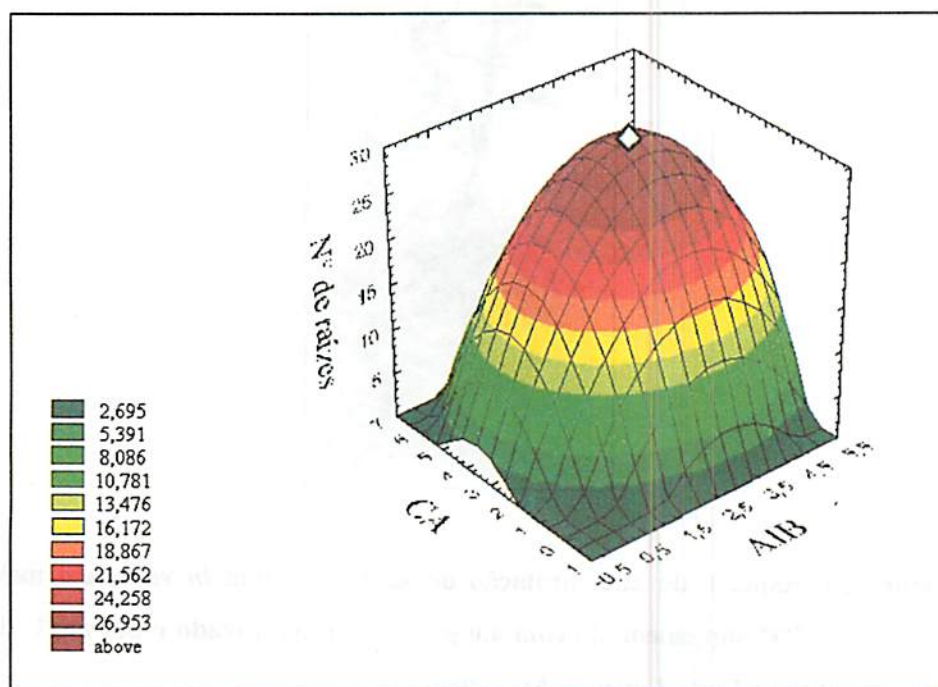


Figura 25. Efeito da interação entre AIB (mg/L) e carvão ativado (g/L) sobre o número de raízes formadas *in vitro* em brotações de salix. UFLA, Lavras – MG, 2000.

Concentrações de AIB acima de 3,0 mg/L e de carvão ativado acima de 4,0 mg/L são capazes de inibir a formação de raízes.

O aspecto de uma planta, cujas raízes foram formadas em meio acrescido de 4,0 g/L de Carvão ativado e 3,0 mg/L de AIB, é demonstrado na Figura 26.



Figura 26. Aspecto de uma brotação de salix enraizada *in vitro*, em meio WPM suplementado com 4,0 g/L de carvão ativado e 3,0 mg/L de AIB. UFLA, Lavras – MG. 2000.

6.2 Aclimatização de plântulas obtidas *in vitro*

Foi observado no 9º dia de aclimatização de plântulas de salix, 90% de sobrevivência. Embora este valor seja relativamente alto, Pereira Pinto (1998), citado por Gomes (1999), considera uma taxa de 4% de perda como limite admissível para o processo de aclimação.

Os resultados obtidos no entanto, estão de acordo com McCown (1988),

quando comenta que a aclimatização de plântulas, cuja rizogênese é induzida *ex vitro*, é fácil em espécies herbáceas e difícil para espécies lenhosas.

As plantas foram consideradas aclimatizadas aos 18 dias, quando se retirou o sombrite.

7 CONCLUSÕES

Só foi possível induzir o enraizamento *in vitro* de brotações de Salix na presença de AIB e carvão ativado.

Na ausência do carvão ativado, houve a formação de calos na base das brotações e escurecimento do meio de cultura.

Recomenda-se, para a obtenção de rizogênese *in vitro* de salix, a utilização de 4,0 g/L de carvão ativado associado a 3,0 mg/L de AIB.

Plântulas de salix, obtidas através da micropropagação, podem ser aclimatizadas, utilizando sombrite 50% por 18 dias.

Através deste processo de aclimatização, a taxa de sobrevivência obtida foi de 90%.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAINERD, K.; FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, July 1981.
- DECCETTI, S.F.C. Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L. Lavras – MG.: UFLA, 2000. 101p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- DRUART, P.; KEVERS, C.; BOXUX, P.; GASPAR, T. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. **Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.108, p.429- 436, 1982.
- DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, Amsterdam, v.40, n.2, p.157-162, 1995.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. England: Exegetics, 1996. part 2, In Praticce.
- GOMES, G.A.C. Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*). Lavras - MG.: UFLA, 1999. p.92. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- HESS, C.E. A physiological analysis of root initiation in easy and difficult-to root cuttings. In: INTERNATIONAL HORTICULTURE CONGRESS, 16., 1962, Brussels. **Proceedings...** Brussels, 1962. v.4, p. 375-381.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v.15, n.3, p.416, June 1980. Abst., 321.
- McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.E.; HAISSING, B.H.; SANKA, N. (eds) **Adventitious Formation in Cuttings**. Portland, OR: Discorides Press, 1988. p.247-260.
- MONCOUSIN, C. Peroxidases as a tracer for rootig improvement and expressing rejuvenation during *in vitro* multiplication of *Cynara cardunculus scolymus* L. **Plant Cell Physiology**, Osaka, v.39, n.2, p.147-148, 1991.

- READ, P.E.; GARTON, S.; TOMALA, T. Willows (*Salix* spp.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.5, p.370-338, 1989.
- SANCHEZ, M.C.; VILITEZ, A.M. Requerementes for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Quercus rubra* shoots derived from mature trees. **Tree Physiology**, Victoria, v.16, n.8, p.673-680, Aug. 1996.
- TORRES A.C.; CALDAS L.S. **Tecnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Local: EMBRAPA/CNPH, 1990.
- TORRES A.C.; CALDAS L.S.; BUSO J.A.; **Cultura de Tecidos e Transformação de Plantas**. EMBRAPA/CNPH , Vol. 1, p. 509 Brasília –DF, 1998.
- WARDLE, K.; QUINIAN, A.; SIMPKINS, I. Absciscic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleraceae* L. var. Botrytis regenerated through apical meristem culture. **Annals of Botany**, London, v.43, n.5, p.745-752, May 1979.
- WETZSTEN, H.Y.; SOMMER, H.E.; BROWN, C. L.; VINES, H.M. Anatomical changes in tissue cultured sweet gum leaves during hardening off period. **HortScience**, Alexandria, v.16, n.3, p.290, June 1981.

CAPÍTULO V - ABORDAGEM FITOQUÍMICA EM SALIX

1 RESUMO

O estudo fitoquímico de uma espécie vegetal pode revelar substâncias de interesses diversos para o homem. As substâncias encontradas podem ser usadas de diversas formas, passando pela farmacologia até a utilização como antibióticos. O objetivo deste trabalho foi estudar características fitoquímicas do *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd.). Inicialmente, obteve-se o extrato bruto da planta através da extração com os solventes em ordem crescente de molaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Após, realizou-se a prospecção de fenóis através do estudo analítico dos extratos brutos, utilizando-se o reagente cloreto férrico/piridina. A extração do óleo essencial foi realizada utilizando a técnica de arraste a vapor. Os rendimentos dos extratos brutos foram: 3,26% em clorofórmio, 2,36% em acetato de etila, 0,94 e 0,85% em hexano e metanol, respectivamente. O óleo obtido foi analisado por espectrofotometria de infravermelho, tendo este um rendimento de 0,1%. A análise deste constatou a presença de grupos funcionais característicos de taninos condensados, confirmando o encontrado nos testes analíticos.

2 ABSTRACT

Phytochemical studies of a plant species can reveal substances of interest and it can be used in several research areas. The objective of this work was to study the phytochemical characteristics of *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd.). Initially, crude extract was obtained through extractions with the organic solvents: hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The phenol prospection was performed through the analysis of crude extracts using the method of ferric chloride and pyridine. The extraction of essential oil was done using the steam drag's method. Crude extract efficiency was 3.26% in chloroform, 2.36% in ethyl acetate, 0.94 % in hexane and 0.85% in methanol. The obtained oil was analyzed by infrared spectroscopy showing a 0.1% yield. Its analysis also showed the presence of functional groups characteristics of condensed tannins confirming which was found in the analytic tests.

3 INTRODUÇÃO

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas.

O estudo fitoquímico de uma espécie vegetal pode revelar substâncias de interesses diversos para o homem, além de auxiliar no estudo desta. As substâncias que forem caracterizadas e identificadas podem ser usadas de diversas formas, passando pela farmacologia até a utilização como antibiótico. Este capítulo trata do estudo de aspectos fitoquímicos do *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd), baseando-se no óleo essencial e nos extratos brutos obtidos.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Extração

Inicia-se o estudo fitoquímico e a obtenção do extrato bruto de uma espécie, com o preparo de uma enxíata, para a identificação correta da espécie. Segundo Alves e Pavani (1991) a seleção do material a ser coletado deve ser feita com cuidado, evitando-se coletar partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta que não sejam de interesse para a investigação. Ao se coletar o material vegetal, deve-se observar o local, a data e a hora em que esta será efetuada, pois o meio ambiente, a hora do dia e a época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos metabólitos vegetais.

A utilização de material fresco pode ser indispensável para a detecção de alguns componentes específicos. O emprego deste tipo de material pode trazer benefícios, como evitar a presença de substâncias oriundas do metabolismo de fenecimento vegetal. Desta forma este tipo de material deve ser utilizado imediatamente ou conservado. Já o emprego de material vegetal seco, mantém uma maior estabilidade química, sendo exigido cuidados especiais, a fim de interromper os processos metabólicos que ocorrem mesmo após a coleta da planta. A secagem tem como finalidade a retirada de água e, com isso, impedir reações de hidrólise e de crescimento microbiano. A operação se caracteriza pela exposição à temperaturas relativamente baixas, normalmente inferiores a 60 °C, e ao longo tempo de contato, em geral, em torno de 7 dias. A secagem será tanto mais rápida quanto mais dividido o material vegetal a secar estiver, pois, deste modo, ele oferecerá uma maior superfície à evaporação (Bacchi, 1996).

Deve-se fazer a moagem com a finalidade de reduzir, mecanicamente, o material vegetal a pequenos fragmentos, preparando-o assim para a etapa da extração. Esta pode ser feita com o auxílio de tesouras, podões, (grosseiramente); ou através de outros métodos tais como trituradores, processadores de alimentos, gral, moinhos entre outros. Inicialmente, deve-se observar alguns fatores, tais como as características do material vegetal, o seu grau de divisão e o meio extrator (solvente). O grau de divisão do material irá influenciar diretamente a eficiência da extração. A estrutura histológica das partes de uma plantas são bastante heterogêneas. Existem órgãos, como as raízes e os caules, cujos tecidos estão extraordinariamente compactados (xilema), ao passo que em folhas e flores os tecidos se apresentam com textura mais delicada. Como o poder de penetração dos solventes depende, entre outros fatores, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair, é necessário considerar que, quanto mais rígido for o material, menor deve ser sua granulometria. O solvente a ser utilizado deve ser o mais seletivo possível, pois é graças à seletividade que se pode extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que deseja preferencialmente extrair determina o solvente que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração (Falkenberg, Santos e Simões, 1999).

Praticamente todos os constituintes de interesse para a análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%, de tal modo que estas costumam ser empregadas com freqüência. Na escolha de um solvente, além dos fatores relacionados à eficiência do processo extrativo, devem-se ainda ser considerados, a toxicidade e/ou riscos que seu manuseio representa, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade e o custo do solvente (Prista, Alves e Morgado, 1981).

Os fatores relacionados aos métodos de extração dizem respeito à

agitação, temperatura e ao tempo necessário para executá-los. Na escolha de um método extrativo. Devem ser avaliadas a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando-se a finalidade do extrato que se quer preparar (Prista, Alves e Morgado, 1981).

As extrações podem ser realizadas de três formas: a frio, a quente em sistemas abertos e a quente em sistemas fechados. O sistema aberto a quente pode ser realizado através da infusão, que consiste na permanência por determinado tempo do material vegetal em água fervente, em um recipiente tampado; turbulização, onde a extração ocorre concomitantemente com a redução do tamanho de partículas, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento; decocção, que consiste em submeter o material vegetal em contato, durante certo tempo, com um solvente (normalmente água) em ebulição. O sistema a quente fechado utiliza a extração sob refluxo, que submete o material vegetal à extração com um solvente em ebulição, em um aparelho dotado de um recipiente, onde será colocado o material e o solvente acoplado a um condensador, de forma que o solvente evaporado durante o processo seja recuperado e retorne ao conjunto; utiliza-se também extração em aparelho de Soxhlet, onde em cada ciclo da operação o material vegetal entra em contato com o solvente renovado, assim, o processamento possibilita uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente (Falkenberg, Santos e Simões, 1999).

Segundo Matos (1997), deve-se dar preferência à extração a frio por percolação (apesar do volume grande de solvente utilizado), diminui-se o risco de reações provocadas pela ação combinada do calor, luz e formação de outros metabólitos.

4.2 Fenóis

Barbosa (1998), define fenóis como compostos que possuem um ou mais grupos OH ligados a um anel aromático (benzeno). O composto mais simples que dá nome a esta classe é o hidroxibenzeno ou fenol (Figura 27).

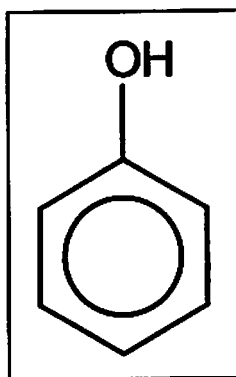


Figura 27. Composto básico dos fenóis, hidroxibenzeno. UFLA – Lavras, 2000.

Vários derivados do fenol apresentam atividades anti-sépticas e desinfetantes, sendo por isso, encontrados em diversos produtos comerciais, como sabões, desodorantes, desinfestantes, pastilhas, soluções de gargarejo e creme para dores musculares. São também usados como antioxidantes para retardar a rancificação em alimentos e cosméticos que contêm ácidos graxos insaturados e, na gasolina, para prevenir a polimerização. São amplamente encontrados na natureza. O tetraidrocanabinol (THC, Figura 28), encontrado em todas as partes da planta *Cannabis sativa*, causa euforia, aumenta o apetite e acelera a pulsação.

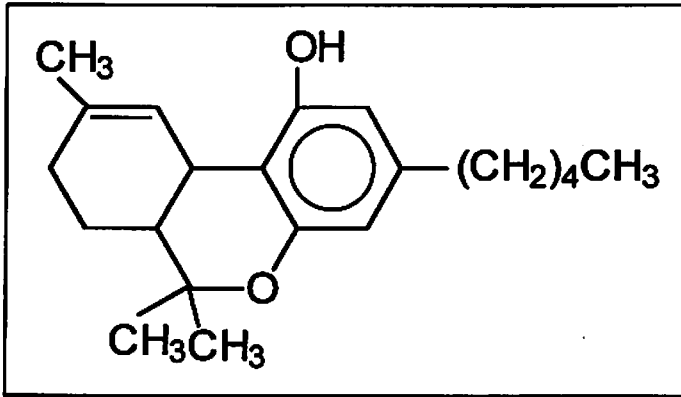


Figura 28. Molécula do fenol tetraidrocannabinol (THC) encontrado em *Cannabis sativa*. UFLA - Lavras, 2000.

As colorações rosa, vermelha, azul e violeta de várias flores, frutos e vegetais ocorrem graças à presença de compostos conhecidos como antocianinas (Figura 29). Estas são substâncias fenólicas pertencentes à classe dos flavonóides (Barbosa, 1998).

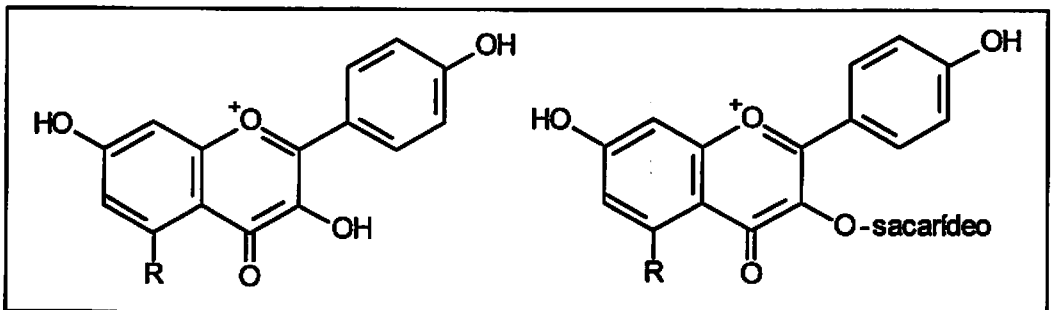


Figura 29 Tipo de estruturas básicas das antocianinas. UFLA –Lavras, 2000.

4.2.1 Taninos

Segundo Simões et al. (1999), os taninos (Figura 30) são substâncias fenólicas solúveis em água, com alta massa molecular, que apresentam a habilidade de formar complexos com alcalóides e proteínas.

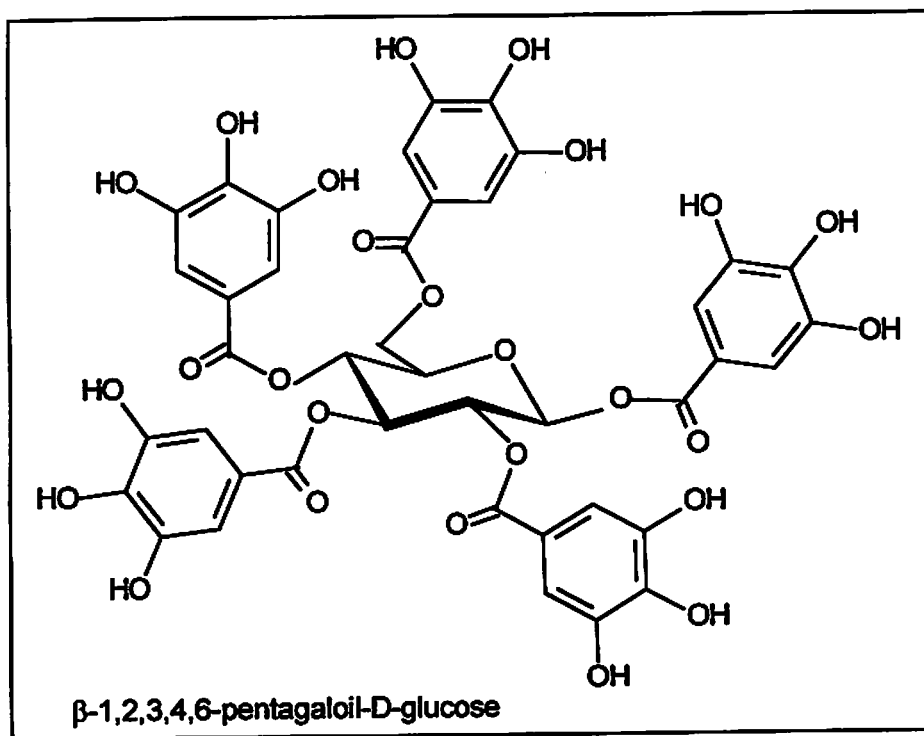


Figura 30 Exemplo de uma substância fenólica (tanino), UFLA – Lavras, 2000.

Tais compostos são importantes, pois são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e alguns vegetais. Estes são classificados, segundo sua estrutura química, em dois grupos: hidrolisáveis (Figura 31) e condensados (Figura 32).

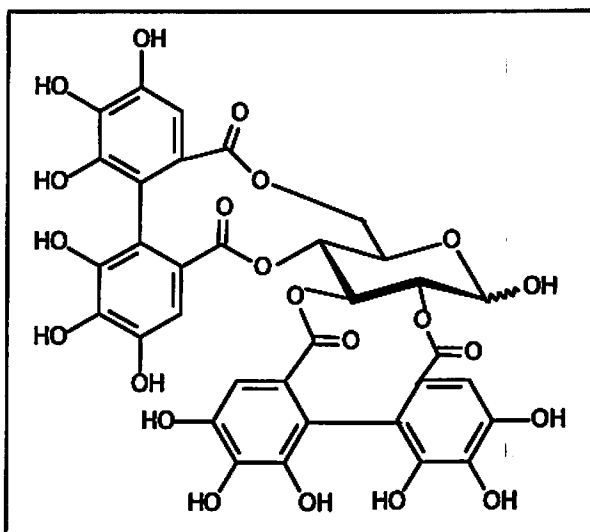


Figura 31. Elagitanino, um exemplo de taninos hidrolisáveis. UFLA – Lavras, 2000.

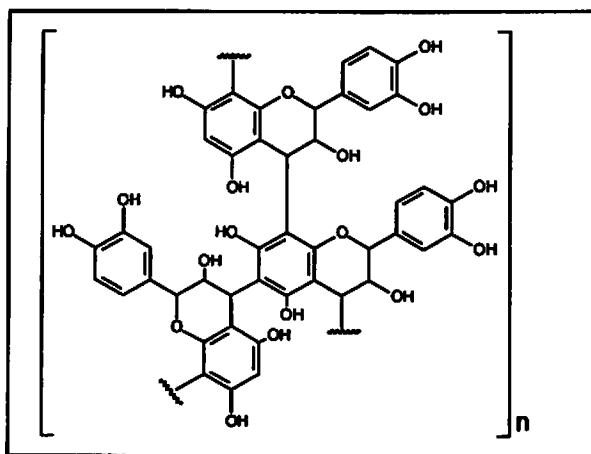


Figura 32. Estrutura de um tanino condensado. UFLA – Lavras, 2000.

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol, geralmente β – D – glucose, cujas hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico, enquanto que os condensados são descritos como oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades, flavan-3-ol e flavan-3,4diol. Essa classe é denominada como proantocianidina devido ao fato de produzirem pigmentos avermelhados da classe das natocianidinas, tais como cianidina e delphinidina, após degradação com ácido mineral diluído a quente. Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal, seguindo padrões significativamente diferentes. Enquanto as proantocianidinas ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, os taninos hidrolisáveis estão quase restritos às Choripetalae das dicotiledôneas herbáceas e não foram encontrados nas Sympetalae. Estes comentam que os taninos condensados, em geral, estão amplamente distribuídos em plantas lenhosas e que os hidrolisáveis ocorrem em dicotiledôneas.

Plantas ricas em taninos são empregadas, na medicina tradicional, no tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarréias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e processos inflamatórios em geral (Haslam, 1996).

4.3 Óleos essenciais

Substâncias que são responsáveis pelos aromas, sendo de origem natural ou sintética, são conhecidos como essência, óleo essencial ou etéreo. Além da utilização industrial na produção de perfumes e cosméticos, os óleos essenciais têm sido utilizados para vários fins, tais como o uso farmacológico e no combate a fungos e bactérias (Cardoso et al., 2000).

Simões et al. (1999), baseando-se na ISO (International Standard Organization) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas, através de destilação por arraste com vapor de água. Como características físico-químicas, eles são geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, mas sua principal característica é a volatilidade. Apresentam aroma agradável e intenso, são solúveis em solventes orgânicos apolares o como éter. Quando são recentemente extraídos, se apresentam incolores ou ligeiramente amarelados, não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. A maioria possui índice de refração e são opticamente ativas (propriedades que auxiliam a identificação destes). Apesar de serem insolúveis em água, conseguem conferir odor à mesma, constituindo os hidrolatos e tonando-se uma fonte importante de aromatizantes em perfumaria e especiarias. Apresentam também propriedades farmacológicas, como anti-sépticas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e outras, sendo largamente utilizadas na medicina popular.

Cardoso et al., (2000), comentam que as plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação destes compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo que esse equilíbrio é influenciado por fatores genéticos (que são fixos) e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo, água, além de outros, que são variáveis. Esses compostos possuem importantes funções nos vegetais, já que são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas. A estrutura química dos óleos essenciais é composta por elementos básicos como o carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo sua classificação química difícil visto serem formados por uma mistura de diversas moléculas orgânicas como: hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e outras. A grande

maioria, no entanto são constituídas de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, preponderando os últimos. Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno. Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos .

O papel dos óleos essenciais encontrados nas plantas está relacionado com a sua volatilidade, pois, por meio dessa característica, eles agem como sinais de comunicação química com o reino vegetal e como arma de defesa contra o reino animal. Assim, considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra perda de água e no aumento de temperatura.(Craveiro e Machado, 1986).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos extratos brutos

Para a realização dos experimentos, coletou-se o material vegetal (folhas) na mata ciliar do Rio Grande, nas proximidades da cidade de Lavras, na manhã do dia 24 de setembro de 1999, às 10:45 horas, sendo colocado rapidamente em uma estufa ventilada a 30 °C, obtendo-se a matéria seca após 7 dias. Após, o material vegetal foi triturado e pesado. Posteriormente, realizou-se a extração.

Como solventes para a obtenção dos extratos brutos da planta foram utilizados: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A amostra foi macerada a frio com hexano e protegida da luz por 8 dias. Após esse tempo, esta foi filtrada em funil de Büchner, obtendo-se a torta que foi à estufa ventilada por 24 horas para completar a evaporação do solvente. O filtrado foi submetido ao evaporador rotatório, modelo Büchi R-14, sob pressão reduzida. O extrato bruto obtido ainda permaneceu em estufa à temperatura de 40 ± 2 °C, para completar a evaporação do solvente. A torta, após 24 horas na estufa ventilada a 40 ± 2 °C, foi submetida à extração com o clorofórmio, através da mesma metodologia acima descrita. Esse processo foi repetido com os solventes acetato de etila, etanol e metanol (Figura 33).

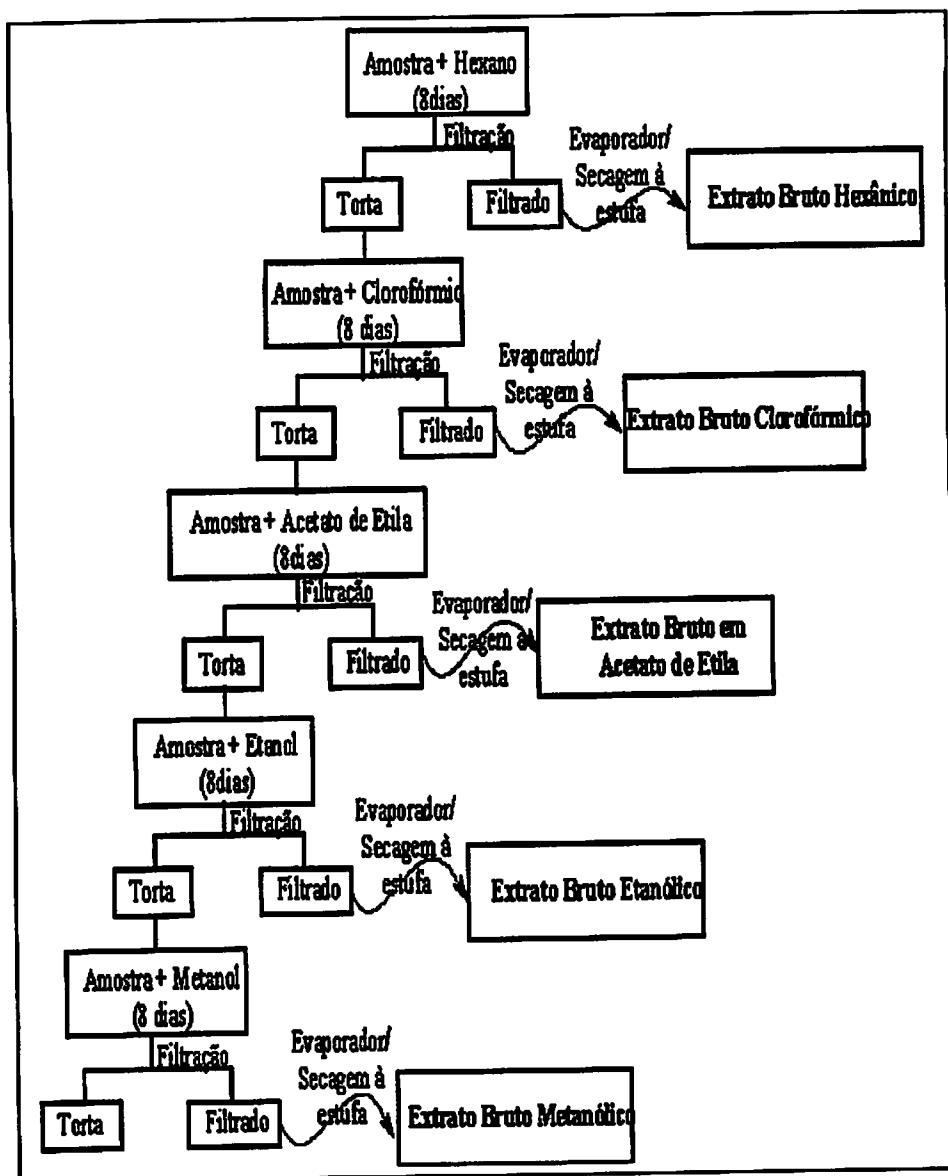


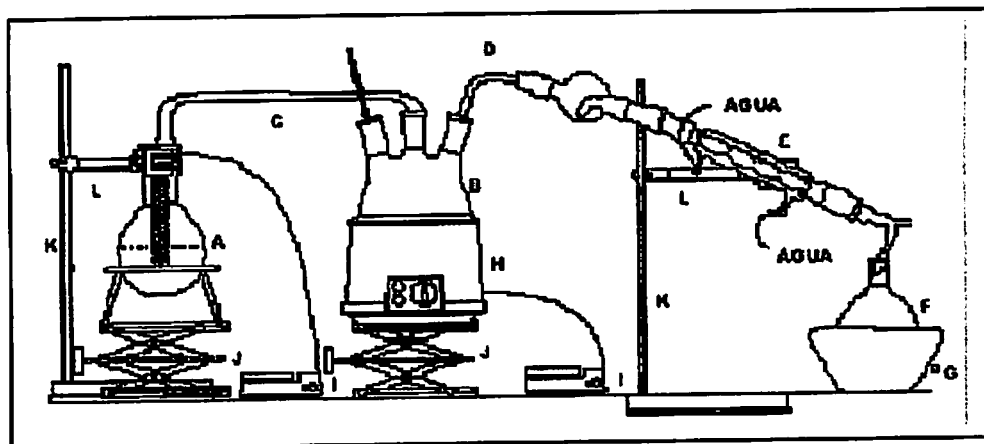
Figura 33. Esquema de obtenção dos extratos brutos de salix. UFLA, Lavras – MG, 2000.

5.2 Prospecção de fenóis

Após a obtenção dos extratos brutos de salix, realizaram-se os ensaios para prospecção dos fenóis em um tubo de ensaio limpo. Colocaram-se 30 mg do extrato bruto obtido em cada solvente e adicionaram-se 2 mL de clorofórmio anidro. Agitou-se e colocou-se 2 gotas da solução cloreto férrico a 1% em clorofórmio. Esperou-se 2 minutos, adicionando em seguida três gotas de piridina. Através das características colorimétricas, foi observado o resultado da prospecção. A solução de clorofórmio foi preparada, juntando-se 1g dos cristais negros de cloreto férrico anidro, a 100 ml de clorofórmio anidro em frasco de 150 ml. A mistura foi agitada durante 1 hora e deixada em repouso por 15 minutos. Decantou-se a solução amarelo-pálida em um frasco. Os resultados foram analisados de acordo com um padrão colorimétrico, partindo da testemunha. Segundo Shriner, (1983), os testes são positivos quando se observa a formação das cores azul, violeta, púrpura, verde ou vermelho-acastanhado, sendo que cada coloração indica um tipo de fenol presente na solução.

5.3 Obtenção do óleo essencial

Para a extração do óleo essencial foram coletadas folhas do salix nas proximidades do Rio Grande, no município de Lavras – MG e levadas para o Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Pesou-se 87,403g de folhas frescas, e através da técnica de arraste de vapor de água, extraiu-se o óleo essencial (Figura 34).



A - balão de boca larga com fonte de aquecimento para ferver água e gerar vapor;

B - balão de fundo redondo com três bocas. Neste foram colocadas as folhas verdes;

C - Conector, pelo qual o vapor gerado em a chega a b;

D - Juntas conectantes macho, fêmea;

E - Condensador;

F - Recipiente para receber o hidrolato;

G - Cuba com gelo;

H - Manta aquecedora;

I - Termostato;

J - Elevador;

K - Suporte para garras;

L - Garras.

Figura 34 Representação esquemática do equipamento adaptado para extração de óleo essencial pelo sistema de arraste a vapor – Laboratório de Química Orgânica – Departamento de Química – UFLA, 2000.

Este processo durou 1,5 horas, obtendo-se 1,5 litros de hidrolato. Este foi particionado com diclorometano (CH_2Cl_2), separando-se a fase aquosa da orgânica. As frações orgânicas foram reunidas, adicionou-se sulfato de magnésio anidro, para retirar qualquer excesso de água. Filtrou-se, levando o filtrado para evaporação no evaporador rotatório, obtendo-se o óleo puro.

O óleo obtido foi submetido a uma análise espectrométrica, utilizando-se para a leitura espectrométrica, um aparelho de infravermelho. Ao se obter a leitura no infravermelho, fez-se à interpretação deste pelas características das bandas encontradas nos diversos pontos de absorção.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a obtenção dos extratos brutos de *Salix humboldtiana* Willd., pode-se dar continuidade aos estudos fitoquímicos da espécie. Os dados da Tabela 4 mostram o rendimento obtido em cada solvente utilizado como extrator; sendo observado que o solvente que proporcionou maior rendimento foi o clorofórmio (3,26%), seguido pelo extrato obtido com acetato de etila (2,36%); o hexano e o metanol proporcionaram um rendimento menor (0,94 e 0.85% respectivamente).

Tabela 4 Rendimento do extrato obtido utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol como extratores.

Solvente	Extrato Peso (g)	Rendimento (%)
Hexano	5,488	0,94
Clorofórmio	17,735	3,26
Acetato de etila	11,026	2,36
Metanol	3,943	0,85
Total	38,192	7,41

Segundo Falkenberg, Santos e Simões (1999), se for observada a característica de polaridade de cada solvente, pode-se inferir o tipo de substâncias que tenham sido extraídas. Com a polaridade crescente dos solventes, tem-se fração de compostos de polaridades também crescente. Na extração com hexano, tem-se preferencialmente a obtenção de substâncias como lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas; quando se utiliza o clorofórmio, encontram-se preferencialmente bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, óleos voláteis. As substâncias mais facilmente encontradas em acetato de etila são os flavonóides e as cumarinas simples; e em metanol, encontram-se as cumarinas simples e taninos.

Em todos os extratos testados, constatou-se a presença de fenóis, havendo uma reação que resultou em uma solução de coloração verde escuro. Estes foram caracterizados como sendo taninos flobafênicos (taninos condensados ou catéquicos), pois segundo Matos (1997), as reações de fenóis com cloreto férrico e piridina que resultam em coloração verde são sinais da presença destes compostos.

Oteve-se, após a extração do óleo essencial de salix, um rendimento de 0.1%, através do espectro de infravermelho, representado pela Figura 35, pode-se observar a presença de um OH alcoólico presente na região 3300 – 3600 cm^{-1} . Entre 2962 a 2852 cm^{-1} , observam-se sinais fortes característicos de grupos metilas (-CH₃), metilênos (-CH₂) e metínicos (-CH) sobrepostos.

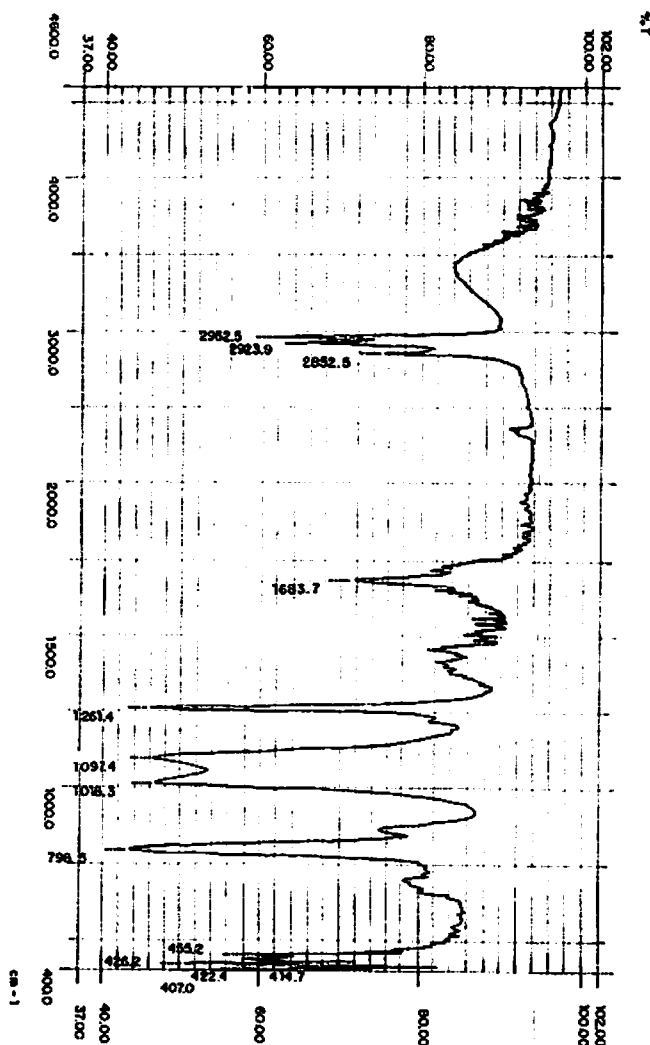


Figura 35 Espectro de infravermelho do óleo essencial de Salix. UFLA, Lavras – MG, 2000.

O sinal em 1683 cm^{-1} é característico de duplas ligações (C=C) e a presença de harmônicos (2000 a 1800 cm^{-1}) e um sinal forte a 798 cm^{-1} caracterizam anéis aromáticos presente nos taninos, os quais foram confirmados pelo resultado da prospecção de fenóis. As deformações axiais de C-O em álcoois e fenóis produzem uma banda forte que pode ser observada no intervalo 1261 a 1018 cm^{-1} . Segundo Siverstein, Bassler e Morrill (1994), este tipo de sinal aparece quando o álcool é terciário ou secundário $\alpha - \beta$ insaturado e ramificado, inferindo-se mais uma vez a presença de taninos substituídos.

O óleo volátil de salix, caracterizado através do Infra Vermelho, revela uma forte presença de fenóis, que segundo Barbosa (1998), apresentam atividades anti-sépticas e desinfetantes, sendo recomendado o seu estudo na fabricação de diversos produtos como sabões, desinfestantes, pastilhas, soluções de gargarejo e creme para dores musculares.

O *Salix* demonstrou possuir no óleo essencial extraído de suas folhas taninos substituídos que podem ser empregados na medicina tradicional como remédios para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (Haslam, 1996).

7 CONCLUSÕES

Foram obtidos para o *Salix humboldtiana* Willd, os extratos brutos para utilização nos estudos fitoquímicos posteriores. O solvente que proporcionou um maior rendimento de extrato foi o clorofórmio. Pôde-se inferir, através da polaridade dos solventes utilizados, quais os grupos de substâncias que preferencialmente foram extraídos em cada solvente utilizado. A prospecção

realizada com o cloreto férrico e a piridina para o salix constatou-se a presença de fenóis nos extratos obtidos das folhas, utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Observando-se a cor verde escuro como resultante das reações, os fenóis contidos nos extratos foram caracterizados como sendo taninos flobafênicos.

Através do sistema de arraste a vapor de água foi possível obter óleo essencial de salix. Pode-se constatar que o óleo essencial encontrado nas folhas de salix possui em sua constituição fenóis caracterizados como taninos substitutivos.

É recomendado que se utilize o óleo essencial de salix para estudos em farmacologia e no combate a fungos e bactérias fitopatogênicas, por conter em sua fórmula taninos condensados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, P.L. de C.A.; PAVANI, M.C.M.D. **Instruções básicas para a coleta e preparo de material botânico a ser herbarizado.** Jaboticabal: FUNEP, 1991.
- BACCHI, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L.C. (org.). **Plantas medicinais: arte e ciência.** São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996. p.169-197.
- BARBOSA, L.C.A. **Química orgânica: uma introdução para as ciências agrárias e biológicas.** Viçosa: UFV, 1998. p.354.
- CARDOSO, M.G.; GAVILANES, M.L.; MARQUES, M.C.S.; SHAN, A.Y.K.V.; SANTOS, B.R.; OLIVEIRA, A.C.B.; BERTOLUCCI, V.K.S.; PINTO, A.P.S. **Óleos essenciais.** Lavras: UFLA/PROEX, 2000. p.42. (Boletim de Extensão, 73)
- CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.L.L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje, São Paulo, v.4, n.23, p.54-63, mar./abr. 1986.**
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à Análise Fitoquímica, In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognéisa.** Florianópolis: UFSC, 1999. p.821.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products, Chicago, v.59, p.205-215, 1996.**
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental.** 2.ed. Fortaleza, 1997. 141p.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Técnicas farmacêuticas e farmácia galêna.** 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1981. v.1.
- SHRINER, R.L.; FUSON R.C.; CUTIN, D.Y.; MORRIL, T.C.; **Identificação sistemática dos compostos orgânicos.** 6.ed. Rio de Janeiro, 1983. p.520.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectrometria de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Granabara Dois, 1994. 38p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 1999. p.821.