



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS**

**GENÉTICOS VEGETAIS**



**NAYRA DA SILVA NEGREIROS CARDOSO**

**AVALIAÇÃO DA *Myracrodruon urundeuva* Fr. ALLEMÃO SOB  
DIFERENTES FORMAS DE CULTIVO: CRESCIMENTO, ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E COMPOSTOS FENÓLICOS.**

FEIRA DE SANTANA – BAHIA

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**NAYRA DA SILVA NEGREIROS CARDOSO**

**AVALIAÇÃO DA *Myracrodruon urundeuva* Fr. ALLEMÃO SOB  
DIFERENTES FORMAS DE CULTIVO: CRESCIMENTO, ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E COMPOSTOS FENÓLICOS.**

FEIRA DE SANTANA – BAHIA

2009

**NAYRA DA SILVA NEGREIROS CARDOSO**

**AVALIAÇÃO DA *Myracrodruon urundeuva* Fr. ALLEMÃO SOB  
DIFERENTES FORMAS DE CULTIVO: CRESCIMENTO, ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E COMPOSTOS FENÓLICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira  
Co-orientadora: Profa. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez

FEIRA DE SANTANA – BAHIA

2009

## Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

C265a Cardoso, Nayra da Silva Negreiros  
Avaliação da *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão sob diferentes formas de cultivo: crescimento, atividade antimicrobiana e compostos fenólicos / Nayra da Silva Negreiros Cardoso – Feira de Santana – Bahia, 2009.  
72 f. : il.

Orientador: Lenaldo Muniz de Oliveira  
Co-orientadora: Luzimar Gonzaga Fernandez

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

1. Aroeira-do-sertão. 2. Meio de cultura. 3. Osmocondicionamento. 4. Atividade Antimicrobiana. 5. Compostos fenólicos. I. Oliveira, Lenaldo Muniz de. II. Fernandez, Luzimar Gonzaga. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Departamento de Ciências Biológicas. V. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. VI. Título.

CDU: 582.765

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS por ter me dado ânimo, força e iluminado o meu caminho nos momentos mais difíceis, principalmente, nos quais pensei em desistir, colocando pessoas maravilhosas na minha vida que me ajudaram a seguir em frente.

A meus pais (Noilda e Florivaldo) e meu irmão Bruno pelo apoio, compreensão e ajuda nos momentos de dificuldade;

Aos meus amigos-irmãos (Família 100%) que mesmo distantes estão sempre ao meu lado, com uma palavra de força e incentivo;

As minhas queridas e especialíssimas amigas: Cíntia Mascarenhas, Ivana Virgens, Ingrid Alfano, Vânia Alecrim e Valdinéia Silva pelo cuidado, carinho, atenção e incentivo;

Ao meu “pai-científico” Paulo Tadeu Silva Costa pelo apoio incondicional e pelas palavras de incentivo. Aprendi e ainda aprendo muito com você: “Pai”;

A minha grande e eterna amiga-mãe: Eunice Barros, pessoa fundamental na conclusão deste trabalho, pelo carinho, dedicação, incentivo, conselho e principalmente pelos sermões;

A Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), em particular ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos (PPG-RGV) pela oportunidade da realização do curso de mestrado;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo auxílio financeiro;

Ao meu orientador Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira pela orientação, atenção e conhecimentos transmitidos;

A minha co-orientadora Prof. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez pelo apoio, carinho e ensinamentos passados ao longo de todos estes anos;

Ao professor Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque pela disponibilidade, parceria, apoio para finalização do trabalho e pelos ensinamentos passados;

Ao professor Dr. Renato Delmondez de Castro, coordenador do projeto BIOTEPN – RENORBIO, pelo apoio e auxílio financeiro na execução do trabalho;

Aos professores do Mestrado (PPG-RGV/UEFS), em especial a professora Claudinéia Pelacani pela atenção e conhecimentos transmitidos durante o curso;

A EMBRAPA SEMI-ÁRIDO representada pela Dra. Bárbara França Dantas, pelo fornecimento das sementes;

A Universidade Católica do Salvador (UCSAL) pelo auxílio no início do trabalho, em especial, aos técnicos e estagiários do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA) representado pelo Prof. Dr. Juan Carlos Rossi Alva;

Ao Instituto de Ciências da Saúde, em particular, aos Laboratórios de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos; Neuroquímica; e Ecologia de Microorganismos pelo apoio nas análises;

A todos os funcionários do Horto Florestal (UEHF/UEFS) e estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCTV) e de Germinação (LAGER) pela ajuda durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos colegas do LBBB (Alexandre, Cinara, Clarissa, Cristiane, Erica, Leilane, Liz e Paulo) e do LABEM pelo apoio e parceria,

As queridas gêmeas Alcinéia e Aldinéia, a Sidnei e aos mais novos e queridos amigos: Leila, Luis, Josilene e Patrícia pela atenção, carinho, paciência e apoio nos momentos de sufoco no laboratório e ajuda nas análises microbiológicas;

E por fim a MIM MESMA pela garra, perseverança e dedicação para a conquista de mais um projeto de vida;

Caso tenha esquecido alguém... Agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

**Obrigada a todos por fazerem parte de mais essa vitória!**

*...O excelente mestre não é o que mais sabe, mas o  
que mais tem consciência do quanto não sabe...  
...Não é o que declara os seus acertos, mas o que  
reconhece suas próprias falhas...*

*(Augusto Cury)*



## RESUMO

Técnicas de cultivo *in vitro* e *ex vitro* têm sido consideradas ferramentas promissoras frente ao crescente interesse pelas plantas que podem ser utilizadas como medicinais. Objetivando avaliar o crescimento, a atividade antimicrobiana e a concentração de compostos fenólicos da *Myracrodruon urundeuva* sob diferentes formas de cultivo, foram testados dois meios de cultura para estabelecimento *in vitro* e diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) para indução de calos, além de submeter às sementes ao osmocondicionamento com PEG 6000 (polietilenoglicol) a -1,0 MPa sob aeração constante e por diferentes períodos e condições pré-germinativas, sendo em seguida semeadas em casa de vegetação. Nestas amostras foi determinada a atividade antimicrobiana das folhas e a concentração dos compostos fenólicos. Os resultados demonstraram que o meio WPM (Wood Plant Medium) foi o melhor meio para estabelecimento e crescimento inicial das plântulas *in vitro*; que a concentração de  $1,25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  do 2,4-D promoveu maior formação de calos com utilização do segmento foliar; que o osmocondicionamento não foi eficiente para melhorar a germinabilidade das sementes, porém acelerou e uniformizou a emergência das plantas em casa de vegetação; e que as folhas das plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas, não havendo atividade para as cândidas, o que pode estar relacionado à concentração de compostos fenólicos que foi maior nas plantas cultivadas *ex vitro* e provenientes do osmocondicionamento. Portanto, pôde-se inferir que o ambiente e a forma de cultivo das sementes influenciaram na produção dos compostos fenólicos e na atividade antimicrobiana das folhas da *M. urundeuva*.

**Palavras-chave:** Aroeira-do-sertão; Meio de cultura; Osmocondicionamento; Atividade antimicrobiana e Compostos fenólicos.

## ABSTRACT

(EVALUATION OF *Myracrodruon urundeuva* Fr ALLEMÃO UNDER DIFFERENT FORMS OF CULTURE: GROWTH, ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS)

Techniques *in vitro* and *ex vitro* of culture have been considered promising approaches front of the increasing interest in the plants that can be used as medicine. Aiming to evaluate the growth, the antibacterial activity and the concentration of phenolic compounds from *Myracrodruon urundeuva* under different forms of cultivation, were tested two culture medium for *in vitro* establishment and different concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) to callus induction, also of submit the seed to priming with -1,0 MPa of PEG 6000 (polyethyleneglycol) under constant aeration and for different periods and conditions pre-germination, and then sown in a greenhouse. These samples was determined the antimicrobial activity of the leaves and the concentration of phenolic compounds. The results showed that the WPM (Wood Plant Medium) was the best medium for the establishment and initial growth of seedlings *in vitro*, the concentration of 1,25mg.L<sup>-1</sup> of 2,4-D promoted more callus formation using leaf segment; that the priming was not effective in improving seed germination, but accelerated and standardized on the plants in a greenhouse, and that the leaves of plants grown *ex vitro* presented antimicrobial activity against the bacteria tested, without activity for the candid, which may be related to the concentration of phenolic compounds was higher in plants grown *ex vitro* and from the priming. Therefore, it was inferred that the environment and how to grow seeds influenced the production of phenolic compounds and the antimicrobial activity of leaves of *M. urundeuva*.

**Keywords:** Aroeira-do-sertão; Culture medium, Priming; Antimicrobial activity and Phenolic compounds.

## SUMÁRIO

### AGRADECIMENTOS

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
2.1 A espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i>	15
2.2 Uso medicinal da Aroeira-do-sertão	17
2.3 Cultura de tecidos vegetais	19
2.4 Condicionamento osmótico	22
2.5 Compostos bioativos e atividade antimicrobiana	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	28
3.1 Local de realização dos experimentos	28
3.2 Material vegetal	28
3.3 Obtenção das plantas <i>in vitro</i>	28
3.4 Calogênese	29
3.5 Condicionamento osmótico	30
3.6 Cultivo em casa de vegetação	30
3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana	32
3.7.1 Testes preliminares	32
3.7.2 Ensaio microbiológico	33
3.7.2.1 Cromatografia de camada delgada	33
3.7.2.2 Difusão em poços	34
3.7.2.3 Bioautografia	35
3.8 Determinação dos compostos fenólicos	35
3.9 Análise estatística	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	36
4.1 Obtenção das plântulas <i>in vitro</i>	36
4.2 Calogênese	38
4.3 Condicionamento osmótico	41
4.4 Cultivo em casa de vegetação	43
4.5 Atividade antimicrobiana	45
4.6 Determinação de compostos fenólicos	50
<b>5 CONCLUSÃO</b>	51
<b>REFERÊNCIAS</b>	52
<b>ANEXOS</b>	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Exemplar da espécie <i>M. urundeuva</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Ramo floral da <i>M. urundeuva</i> .....	16
<b>Figura 3.</b> Estrutura química das (1) urundeuquina A, (2) urundeuquina B e (3) urundeuquina C isoladas da entrecasca da <i>M. urundeuva</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do constituinte volátil $\beta$ -cariofileno.....	18
<b>Figura 5.</b> Curva de calibração padrão das concentrações de ácido gálico.....	36
<b>Figura 6.</b> Plântulas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> estabelecidas <i>in vitro</i> nos dois tipos de meio avaliados: MS (A) e WPM (B).....	37
<b>Figura 7.</b> Percentagem de formação de calos e oxidação dos explantes foliares de <i>Myracrodruon urundeuva</i> nas diferentes concentrações de 2,4-D após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	40
<b>Figura 8.</b> Percentagem de germinação, em laboratório, das sementes de <i>Myracrodruon urundeuva</i> nos diferentes períodos de osmocondicionamento.....	41
<b>Figura 9.</b> Coeficiente de uniformidade de germinativa das sementes de <i>Myracrodruon urundeuva</i> após os diferentes períodos de osmocondicionamento.....	42
<b>Figura 10.</b> Halos de inibição formados, em contraste com o corante TTC, da amostra de folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> provenientes de sementes osmocondicionadas: (A) ausência de inibição do extrato hexânico, (B) inibição do solvente etanol, (C) baixa inibição do extrato acetônico e (D) inibição do extrato preparado com acetato de etila.....	47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Formação de plântulas, comprimento do eixo caulinar e número de folhas por planta de *Myracrodruon urundeuva*, após 45 dias de cultivo *in vitro*....37
- Tabela 2.** Percentual de calos formados a partir dos segmentos cotiledonares e foliares de *Myracrodruon urundeuva* após 45 dias de cultivo *in vitro* com o meio WPM suplementado com duas concentrações de 2,4-D.....38
- Tabela 3.** Valores médios das variáveis germinativas: tempo médio (Tm) e índice de velocidade germinativa (IVG) das sementes de *Myracrodruon urundeuva* após o osmocondicionamento.....42
- Tabela 4.** Comprimento, peso fresco e seco da parte aérea e área foliar das plantas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes de sementes não osmocondicionadas (não osmo) e osmocondicionadas (osmo) com 21 e 42 dias de cultivo em casa de vegetação.....43
- Tabela 5.** Comprimento, peso fresco e seco das raízes das plantas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes de sementes não osmocondicionadas e osmocondicionadas com 42 dias de cultivo em casa de vegetação.....44
- Tabela 6.** Teores de clorofilas “a” e “b”, e carotenóides totais nas folhas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes das plantas não osmocondicionadas e osmocondicionadas após 42 dias de cultivo em casa de vegetação.....44
- Tabela 7.** Valores médios do comprimento do halo de inibição do extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, nas três concentrações testadas, frente às cepas de *K. pneumoniae*, *M. luteus*, *S. cholerae-suis*, *S. aureus*, SAIACLIN e *P. aeruginosa*.....45
- Tabela 8.** Valores, em mm, do fator de retenção das amostras de folhas de *Myracrodruon urundeuva* extraídas com acetona, acetato de etila, etanol e hexano, eluídas através do sistema acetato de etila/hexano 3:1 (v/v) e visualizadas sob luz UV (366 nm).....46
- Tabela 9.** Análise qualitativa da formação dos halos de inibição das amostras de folhas de *Myracrodruon urundeuva* extraídas com acetona e acetato de etila, frente ao *Staphylococcus aureus*, através do método de difusão em poços.....48
- Tabela 10.** Valores, em mm, do fator de retenção das amostras de folhas de *Myracrodruon urundeuva* extraídas com acetato de etila, eluídas através do sistema acetato de etila/hexano 3:1 (v/v) e visualizadas sob luz UV a 366 nm.....49
- Tabela 11.** Concentração de compostos fenólicos, após 42 dias de cultivo, nas folhas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes de sementes não osmocondicionadas e osmocondicionadas cultivadas em casa de vegetação, cultivadas *in vitro* e nos calos.....50

## LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ATCC – American Type Culture Collection

*C. albicans* – *Candida albicans*

*C. krusei* – *Candida krusei*

CCD – cromatografia em camada delgada

CPATSA – Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido

EAG – Equivalente ácido gálico

G60 F254-366 – gel de sílica G com indicador de fluorescência para  $\lambda$  254-336

IUCN – International Union for Conservation of Nature

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

*M. luteus* – *Micrococcus luteus*

*M. urundeuva* – *Myracrodruon urundeuva*

MS – Murashige & Skoog

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

PEG 6000 – Polietilenoglicol 6000

Rf – fator de retenção

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

*S. cholerea-suis* – *Salmonella cholerea-suis*

SAIACLIN – *Staphylococcus aureus* Isolado de Amostra Clínica

TSA – Tryptic Soy Ágar

TTC – cloreto 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio

UFC – unidades formadoras de colônias

UV – ultravioleta

UV-Vis – ultravioleta visível

WPM – Wood Plant Medium

## 1 INTRODUÇÃO

O Semi-árido brasileiro corresponde a quase totalidade da região Nordeste, com formações vegetais pertencentes à Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, englobando um elevado número de espécies lenhosas e herbáceas, muitas delas endêmicas. Sua degradação é o resultado de mais de quatrocentos anos de uso da terra de forma inadequada e descontrolada, o que pode estar relacionado à falta de conhecimentos e informações sobre o funcionamento da biota local e dos recursos hídricos, aliado a modelos de desenvolvimento totalmente inadequados a região (DRUMOND et al., 2000; GIULIETTI & QUEIROZ, 2006).

O estudo e a conservação da biodiversidade do Semi-árido, mais especificamente do bioma Caatinga, se constitui em um dos maiores desafios do conhecimento científico brasileiro, por diversos motivos, dentre os quais o fato deste se restringir apenas ao território nacional, o que o torna uma região exclusivamente brasileira, e por ser o bioma menos estudado e protegido, com apenas 2% do seu território preservado. Além desses, se acrescenta o fato de suas espécies apresentarem características fisiológicas que refletem adaptações complexas e peculiares às condições ambientais únicas a que estão submetidas (LEAL et al., 2003; TROVÃO et al., 2007).

O bioma Caatinga é o principal ecossistema da região semi-árida, chegando a ocupar cerca de 50% da região Nordeste e parte do estado de Minas Gerais, apresentando relativa riqueza biológica e endemismo, com uma flora ainda pouco conhecida. Neste, a ocorrência de secas estacionais e periódicas estabelece regimes intermitentes que deixa a vegetação sem folhas, no entanto, as folhas voltam a brotar e tornam-se verdes nos curtos períodos de chuva, típico de vegetação com características xerofíticas (ANDRADE et al., 2005; GIULIETTI & QUEIROZ, 2006; IBAMA, 2007).

Dentre as espécies típicas da Caatinga, destacam-se as da família Anacardiaceae, distribuídas em três gêneros: *Lithraea*, *Schinus* e *Myracrodruon*. A espécie *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão, popularmente conhecida como aroeira-do-sertão, aroeira-do-cerrado, aroeira-verdadeira, aroeira-preta ou urundeúva é uma árvore cujo porte varia de acordo com a região onde é encontrada, de ocorrência natural na Caatinga, Cerrado e Florestas fluviais (ANDRADE et al., 2000; SILVA et al., 2002).

A *M. urundeuva* possui grande valor econômico devido à excelente qualidade de sua madeira, utilizada nas propriedades rurais e arborização de ruas e praças, e pela presença, em sua casca, de grandes quantidades de taninos, largamente utilizados nas indústrias de curtimento de couros. Esta espécie também é muito utilizada como medicinal, devido à presença na sua entrecasca de substâncias químicas com propriedades antiinflamatórias, adstringentes, antialérgicas e cicatrizantes (OLIVEIRA et al., 2002; TEÓFILO et al., 2004; DORNELLES et al., 2005).

De maneira geral, a aroeira-do-sertão vem sendo muito explorada, seu extrativismo é feito de forma desordenada e descontrolada em que, na prática, retiram-se da planta extensas áreas de tecido caulinar, independente da idade e do tamanho do vegetal, bem como da época do ano (MONTEIRO et al., 2005; PACHECO et al., 2006).

Em decorrência da exploração predatória, que ocorre em todo o território brasileiro, e de sua ampla utilização, a *M. urundeuva* foi inserida na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável, correndo sério risco de erosão genética, sendo também incluída na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção da IUCN (IBAMA, 2006; MORAES, 2006; PACHECO et al., 2006).

Deste modo, é necessário que a prática de exploração adotada seja repensada, pois estudos científicos vêm demonstrando que tal exploração extrativista tem gerado perda de material genético e comprometido a preservação de suas populações dentro de seus “habitats”. Nesse contexto, a Biotecnologia Vegetal tem sido considerada um importante instrumento, que permite gerar tecnologias tanto para a preservação/conservação quanto para obtenção de formas alternativas e sustentáveis de exploração.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais, por exemplo, têm possibilitado progressos significativos para produção em larga escala visando o repovoamento de áreas naturais e implantação de sistemas agro-florestais, pois permitem a rápida multiplicação de plantas, podendo servir como estratégias para preservação de espécies nativas. Além disso, o cultivo *in vitro* cria novas perspectivas de exploração sustentável dos recursos vegetais, através de abordagens biotecnológicas para produção de produtos naturais, via cultivo de calos ou suspensões celulares (OLIVEIRA, 2000).



De maneira semelhante, a manipulação das condições de cultivo *ex vitro* poderá criar novas perspectivas de exploração dos recursos naturais, visto que os constituintes secundários das plantas são produzidos em baixas concentrações e sua produção é influenciada por diferentes fatores, como hereditariedade, estágio de desenvolvimento, condições edafo-climáticas e presença de fatores de estresse biótico e abiótico que podem, direta ou indiretamente, estimular a expressão de genes do metabolismo secundário das plantas.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento, a atividade antimicrobiana e a concentração de compostos fenólicos da *Myracrodruon urundeuva* sob diferentes condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A espécie *Myracrodruon urundeuva*

O potencial de uso da flora da Caatinga é bastante diversificado, podendo ser medicinal, forrageiro e madeireiro, apresentando grande impacto social e econômico. A espécie *M. urundeuva* (sinônimos: *Astronium juglandifolium* Griseb. e *Astronium urundeuva* Engl.) é encontrada em todo território brasileiro, ocorrendo desde o Ceará até o Paraná e Mato Grosso do Sul, sendo mais freqüente no Nordeste (DRUMOND et al., 2000; QUEIROZ et al., 2002b; SILVA et al., 2002).

Trata-se de uma planta decídua, heliófila e seletiva xerófila que ocorre em agrupamentos densos, tanto em formações abertas e secas, como em formações fechadas e úmidas, podendo atingir 20m de altura na Caatinga, Cerrado e em zonas de transição cerrado-floresta estacional, e 35m nas florestas pluviais. Seu tronco pode chegar a ter mais de 1m de diâmetro, encimado por larga copa e ramos flácidos (Figura 1), com madeira pardo-avermelhada de elevada resistência mecânica e considerável durabilidade, sendo praticamente imputrescível por possuir em sua casca aproximadamente 15% de tanino – composto químico com efeitos fungicidas e inseticidas, que a protege da ação de herbívoros e fungos patogênicos (LORENZI, 1992; QUEIROZ et al., 2002a; PACHECO et al., 2006).



**Figura 1.** Exemplar da espécie *M. urundeuva* (<http://www.vivaterra.org.br/aroeira>).

A aroeira-do-sertão possui folhas alternas, imparipenadas, com cinco a sete pares de folíolos, ovalado-obtusos, pubescentes em ambas as faces. Suas flores são em panículas, purpúreas com pêlos brancos e suas sementes, de comportamento ortodoxo, estão contidas dentro de frutos drupáceos, pequeninos, globoso-ovais com exocarpo fortemente lignificado e envoltório membranáceo liso (Figura 2). A germinação é epígena e fanerocotilar ocorrendo em aproximadamente dois dias (QUEIROZ et al., 2002a; SILVA et al., 2002; ESAM, 2007; GUERRA, 2008).



**Figura 2.** Ramo floral da *M. urundeuva* (<http://www.biologo.com.br/plantas>).

## 2.2 Uso medicinal de Aroeira-do-sertão

O Brasil é detentor do maior potencial e riqueza em biodiversidade, representando um vasto patrimônio genético para o futuro desenvolvimento de novos medicamentos de origem vegetal. Para a Organização Mundial de Saúde uma planta é considerada medicinal caso possua, em um ou em vários de seus órgãos, substâncias utilizadas com finalidade terapêutica, ou que possam ser ponto de partida para síntese de produtos químicos farmacêuticos (BIESKI, 2005).

As substâncias ativas presentes nas plantas medicinais são produtos do seu metabolismo e podem ser divididas em dois grupos: primário e secundário. Na grande maioria dos casos a substância ativa é gerada pelo metabolismo secundário e compreende uma vasta gama de compostos, a exemplo dos fenólicos, alcalóides e óleos essenciais (DOURADO, 2006).

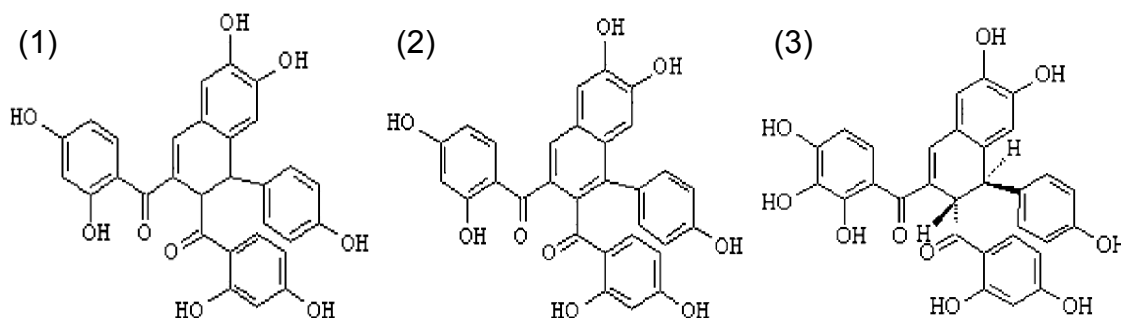
A *M. urundeuva* é uma planta que vem sendo muito explorada em função das suas propriedades químicas, biológicas e medicinais, e é bastante utilizada na medicina tradicional nordestina sob a forma de semicúprio (“banho-de-assento”), com o extrato aquoso da entrecasca, para o tratamento de doenças dermatológicas e ginecológicas. Esta mesma preparação é indicada como tratamento caseiro de afecções cutâneas e problemas urinários (MATOS, 2000).

A referida espécie possui efeito antiinflamatório, antiulcerogênico e cicatrizante natural (MENEZES & RAO, 1986; VIANA et al., 1995), sendo recomendada para o tratamento de gastrites, vaginites e hemorróidas (MORS et al., 2000; LORENZI & MATOS, 2002). Além da entrecasca, as raízes também são utilizadas para o tratamento do reumatismo e as folhas indicadas para o tratamento de úlceras (NUNES et al., 2008).

Gonzalez Torres (1986), ressaltando o emprego medicinal, cita o uso das folhas como febrífugo e antireumático; Moreira et al. (1994) e Coimbra (1994) fazem referência às propriedades tônicas e adstringentes, indicando o cozimento das cascas para o tratamento de feridas, inflamações e até como antidiarréica.

Coimbra (1994) também se refere a várias formas de preparo, como infusões, extratos, tinturas e xaropes, empregados para o tratamento de doenças das vias urinárias e respiratórias. Além das atividades biológicas aproveitadas pela medicina tradicional, a aroeira-do-sertão apresenta outras propriedades importantes avaliadas em laboratório.

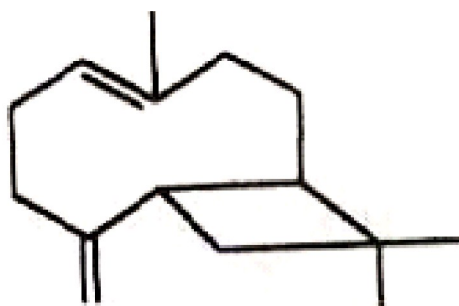
Estudos realizados a partir da sua entrecasca resultaram na separação de sete frações químicas, sendo duas com substâncias bioativas de atividade farmacológica: uma chalcônica – as chalconas diméricas: urundevina A, B e C (Figura 3) e outra tânica – os taninos condensados: tipo catéquico e pirogálico (BANDEIRA, 2002; LORENZI & MATOS, 2002; SOUZA et al., 2007).



**Figura 3.** Estrutura química das (1) urundevina A, (2) urundevina B e (3) urundevina C isoladas da entrecasca da *M. urundeuva* (NOBRE-JÚNIOR, 2009).

Além dos taninos, foi identificada a presença de flavonóides biologicamente ativos classificados como pigmentos polifenólicos diversificados que exercem diversas funções no vegetal, reconhecidos como eficientes protetores contra radiação ultravioleta e encontrados nos tecidos foliares (ZUANAZZI, 1999; OLIVEIRA et al., 2006). Foram isolados ainda compostos mais apolares como o cicloeucalenol e cicloeucalenona, a partir do extrato hexânico da entrecasca, que apresentam atividade antioxidante (DANTAS, 2003).

Em razão do seu aroma típico, as folhas foram analisadas quanto à presença de óleos essenciais, sendo identificados dezesseis constituintes voláteis, como por exemplo, o  $\beta$ -cariofileno (Figura 4), principal constituinte extraído do óleo essencial das folhas (VIANA et al., 1995; SÁ, 2008).



**Figura 4.** Estrutura química do constituinte volátil  $\beta$ -cariofileno (SÁ, 2008).

Outros compostos químicos foram isolados de outras espécies também conhecidas popularmente como aroeira e pertencentes ao gênero *Schinus*, a exemplo da *Schinus lentifolius* da qual se extraiu o ácido gálico – um composto orgânico freqüentemente utilizado como padrão para determinação da concentração de compostos fenólicos (VIANA et al., 1995).

Embora a aroeira-do-sertão seja utilizada pela comunidade como um medicamento eficaz e inofensivo, baseado nos conhecimentos empíricos repassados de geração a geração, a determinação da real potencialidade fitofarmacológica e eventual toxidez deve ser realizada, visando o desenvolvimento de formas mais sustentáveis para sua exploração (FRANK-DE-CARVALHO & GRACIANO-RIBEIRO, 2005).

### **2.3 Cultura de tecidos vegetais**

Entre os diversos procedimentos da Biotecnologia Vegetal, o ramo da Biologia Molecular e o da Cultura de Tecidos Vegetais foram os que obtiveram maiores êxitos, sendo muito utilizados para conservação de espécies nativas através do cultivo *in vitro* que, aliado aos princípios genéticos, possibilitam progressos significativos no melhoramento genético e na produção de mudas, visando o repovoamento de áreas naturais, além da seleção de plantas com maior produção de compostos naturais (OLIVEIRA, 2000).

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas de cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos, em condições de assepsia e em meio de cultura artificial com composição química definida - contendo compostos como água, sais minerais, vitaminas, fontes de carbono e reguladores de crescimento (TORRES, 2000). Apresenta aplicações, como a micropropagação de plantas via cultura de meristemas ou embriogênese somática; a conservação de germoplasma *in vitro*; e a produção de metabólitos secundários *in vitro* via cultura de órgãos, calos ou suspensões celulares (OLIVEIRA, 2000).

Durante muitos anos a cultura de tecidos e de células vegetais foi vista apenas como um exercício acadêmico, entretanto, atualmente tem sido extensivamente utilizada para produção de mudas em larga escala, facilitando a rápida multiplicação de genótipos superiores, reduzindo o custo de manutenção das coleções, além de facilitar estudos a respeito da fisiologia do vegetal,

possibilitando um melhor entendimento das vias metabólicas e das necessidades nutricionais das plantas (GAO et al., 2000; SANTANA et al., 2006).

Em termos de potencial de utilização na agricultura, a micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos, tendo sido apontada como uma alternativa viável, por possibilitar a obtenção de altas taxas de multiplicação a partir de um único indivíduo. Entretanto, o sucesso dessa técnica, para qualquer espécie, depende da composição química do meio de cultivo e da identificação do explante mais adequado, geralmente oriundo de tecidos jovens que possuam maior atividade metabólica (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; CAPALDI, 2002; PERES, 2002).

De modo geral, a micropropagação também é influenciada pelos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, sendo fundamentais na indução de uma determinada rota morfogenética no explante, em decorrência das diferentes respostas dos tecidos frente às combinações hormonais, o que interfere no estabelecimento e crescimento das plantas *in vitro* (TIWARI et al., 2001; CAPALDI, 2002; VENKATAIAH et al., 2003; KHAWAR et al., 2004).

Esta técnica tem sido amplamente utilizada para multiplicação *in vitro* de espécies frutíferas, madeiras, medicinais e ornamentais e, em se tratando de plantas medicinais, vem criando novas perspectivas de exploração sustentável dos recursos genéticos, visto que as vias bioquímicas que funcionam na planta-matriz geralmente são conservadas durante o cultivo *in vitro* (GAO et al., 2000; FELIX et al., 2002; SABÁ et al., 2002; ALBUQUERQUE et al., 2005; SANTANA et al., 2006).

Basicamente três caminhos são utilizados para exploração dos compostos bioativos via cultivo *in vitro*: a cultura de calos, a cultura de células em suspensão e a cultura de órgãos diferenciados. Na cultura de calos utiliza-se tecido não organizado, formado por células que se multiplicam desordenadamente, já na cultura de órgãos diferenciados, utilizam-se embriões, brotos ou raízes, constituindo-se de um sistema biológico bastante eficiente para produção de metabólitos, tendo em vista que esses são sintetizados naturalmente nos diversos órgãos (FRANÇA, 2001; AMARAL & SILVA, 2003).

Os calos constituem-se de um aglomerado de células desorganizadas originadas a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro*, em resposta a injúrias físicas ou químicas. Sua formação, normalmente, ocorre no escuro, pois a luz

pode favorecer a produção de compostos fenólicos os quais podem comprometer a divisão celular. No entanto, há relatos de algumas espécies em que a formação dos calos é indiferente à luminosidade (FARIA, 1996; CAMARGO et al., 1999; VASCONCELOS-FILHO, 2008).

Os diversos tipos de calo se diferenciam pela textura, coloração e consistência, podendo ser compactos (calos duros que geralmente crescem vagarosamente) ou friáveis (calos que se desintegram facilmente quando manipulados e geralmente apresentam maior taxa de multiplicação). Entre os fatores que interferem na consistência dos calos destacam-se o meio de cultivo, o tipo de explante, o número de subcultivos e a adição de fitorreguladores e alguns aditivos orgânicos, como o extrato de malte e de levedura (BARRUETO CID, 1992; FLORES et al., 2003).

Os reguladores de crescimento, a exemplo das auxinas, quando adicionados ao meio de cultura estimulam a produção dos calos, mesmo estando em baixas concentrações (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Dentre as auxinas, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) tem sido bastante utilizado para indução de calos em espécies frutíferas como *Musa sp.* (BRAGA et al., 2001), *Malus spp.* (FORTES, 1992) e *Coffea arabica* (MACIEL, 2001; PALÚ, 2002; ARAÚJO, 2004), e também para as medicinais como a *Myracrodruon urundeuva* (ANDRADE et al., 2000) e *Byrsonima intermedia* (NOGUEIRA et al., 2008).

O cultivo dos calos tem demonstrado ser uma alternativa promissora para o estudo e a produção dos metabólitos secundários *in vitro* (KOLLÁVORÁ et al., 2004; ARIKAT et al., 2004; YU et al., 2005), visto que calos com diferentes níveis de diferenciação podem diferir na capacidade de sintetizar os compostos bioativos (KUSAKARI et al., 2000; LUCZKIEWICZ et al., 2002; FLORES, 2006). Entretanto, a produção *in vitro* destes compostos, em escala industrial, ainda é bastante limitada, por diversos fatores, dentre eles, a baixa produtividade das culturas, a instabilidade da produção e a falta de conhecimento sobre o metabolismo que os origina (FLORES, 2006).

Contudo, já existem vários exemplos de substâncias de alto valor produzidas com sucesso a partir desta técnica, como a chiconina extraída do *Lithospermum erythrorhizon*, a berberina do *Coptis apônica*, o ácido rosmarínico extraído a partir de células de *Coleus blumeii*, e a vincristina e a vinblastina extraídas do *Catharanthus roseus* (FLORES, 2006; MELO & ALVARENGA, 2009).

Adicionalmente, além dos compostos naturalmente presentes nas plantas, o tecido mantido *in vitro* também pode gerar um espectro de compostos diferentes daqueles característicos da planta-matriz, os quais são encontrados apenas nas plantas cultivadas *in vitro*, como consequência das alterações na parte funcional dos genes, que ocorrem em decorrência dos estímulos químicos e físicos a que as culturas ficam expostas (FRANÇA, 2001; MALLAVARAPU, 2001).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a exposição das plantas a situações de estresse, tanto *in vitro* como *ex vitro*, induzem a expressão de genes que, muitas vezes, é preservada além dos estádios de semente e plântula, perdurando durante seu crescimento e desenvolvimento (SILVA, 2008).

#### **2.4 Condicionamento osmótico**

Entre as técnicas de indução de estresse nas sementes, o condicionamento osmótico (osmocondicionamento) vem se tornando uma das técnicas mais promissoras, a qual consiste no pré-tratamento osmótico das sementes a uma dada temperatura e por um período de tempo definido e variável para cada espécie. Embora envolva modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas complexas – que ainda não foram completamente elucidadas – é uma técnica conceitualmente simples e bastante utilizada (COSTA & VILLELA, 2006).

As metodologias empregadas podem diferir entre si e as variações consistem nas formas de fornecimento de água (embebição em substrato, imersão em água pura, soluções salinas ou osmóticas), no tempo e na forma de secagem após o condicionamento, na duração do tratamento e no estágio de germinação atingido (GUIMARÃES, 2000; SANTOS et al., 2008).

No osmocondicionamento ou “priming”, as sementes são pré-embebidas em uma solução osmótica com potenciais hídricos adequadamente ajustados, em um dado período e temperatura, de modo a permitir a ocorrência das etapas metabólicas iniciais do processo germinativo. Dessa forma, pode-se regular a quantidade de água absorvida pela semente, promovendo as fases I e II da germinação, mas sem permitir o estágio final (fase III) que culmina com a protrusão da radícula (POSSE et al., 2002; PEREIRA et al., 2008).

Após o osmocondicionamento, as sementes podem ser secas até atingirem os níveis iniciais de umidade apresentados antes do pré-tratamento, ou serem



imediatamente semeadas, o que favoreci seu desempenho em campo sob condições adversas, mesmo estas sendo provenientes de lotes com baixa qualidade fisiológica (BIRUEL et al., 2007).

Entre os principais fatores que determinam o sucesso do osmocondicionamento têm-se o potencial e a natureza do agente osmótico utilizado. Uma das soluções mais usadas é o polietilenoglicol (PEG) - agente osmótico quimicamente inerte, atóxico as sementes por não atravessar o sistema de membranas e não ser metabolizado devido ao grande tamanho de suas moléculas e alto peso molecular (BITTENCOURT et al., 2004; DELGADO, 2006).

De acordo com Hilhorst e Leprince (1998), várias pesquisas comprovam que o osmocondicionamento promove um aumento na velocidade de germinação das sementes e na emergência das plântulas, permitindo uma germinação mais rápida e uniforme, além de aumentar a tolerância das sementes em germinar sob condições adversas, através da preparação da maquinaria metabólica dos processos germinativos.

Estudos revelaram que as sementes de *Allium cepa* (cebola) e *Glycine max.* (soja) após serem osmocondicionadas apresentaram melhor desempenho no índice de velocidade de emergência das plântulas no campo quando comparadas às sementes que não foram osmocondicionadas (DEL GIÚDICE, 1996; LOPES et al., 1996).

Os resultados positivos reafirmam o grande potencial desta técnica em promover uma melhora no processo germinativo e no vigor das sementes. Contudo, apesar dos trabalhos já realizados e, em consequência da grande diversidade da flora brasileira, ainda há poucas informações a respeito desta técnica, em especial para as sementes de espécies nativas (BIRUEL et al., 2007).

Além dos efeitos sobre o estande inicial das plântulas, resultantes da germinação mais uniforme, a produtividade da cultura também pode ser afetada. Nas sementes pré-tratadas osmoticamente, muitas etapas metabólicas referentes ao processo germinativo acontecem, o que pode gerar incrementos no rendimento agrônômico, na tolerância a novas situações de estresse e na síntese de metabólitos secundários pelas sementes ou pelas plantas (BRACCINI et al., 1997; WANLI et al., 2001; KILLIAN & LEIVA, 2005; FILHO & KIKUTI, 2008).

Segundo Silva (2008), as plantas investem em estratégias bioquímicas, desencadeadas pelo estresse inicial provocado nas sementes por meio do

osmocondicionamento, através do aumento na produção de metabólitos secundários, a exemplo dos compostos fenólicos, e aumento na capacidade antioxidante, tornando-as mais aptas a responder as novas condições. Assim, em se tratando de espécies medicinais o osmocondicionamento poderá promover um incremento na produção dos compostos bioativos de interesse, em uma abordagem ainda pouco explorada.

## **2.5 Compostos bioativos e atividade antimicrobiana**

A seleção de uma planta para pesquisas baseadas nas alegações de um dado efeito terapêutico em humanos pode-se constituir em um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos, visto que seu uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto a sua utilidade terapêutica (MÜLLER, 2006).

Deste modo, avança o interesse da indústria farmacêutica pelas plantas que possuam efeito antimicrobiano, já que muitas substâncias químicas extraídas podem ser utilizadas por causar a morte (bactericida ou fungicida) ou inibir o crescimento microbiano (bacteriostático ou fungistático), sendo considerada uma alternativa promissora para a utilização dos recursos fitoterápicos com ação antibiótica (LIMA, 2001; REESE et al., 2002; MÜLLER, 2006).

Nesse sentido, um grande número de plantas tem sido investigado para detecção do seu real potencial farmacológico, o que se constitui em algo de fundamental importância em decorrência do crescente aumento de resistência dos microorganismos aos antimicrobianos em uso. Todavia, os estudos científicos nesta área ainda são pouco difundidos, visto que a composição química das plantas ainda é um tanto quanto complexa e envolve uma quantidade infindável de compostos orgânicos (SILVEIRA et al., 2009).

Estudos para a avaliação e triagem da atividade antimicrobiana nas espécies vegetais, em especial nas medicinais, têm demonstrado que várias classes de metabólitos secundários são consideradas antibióticos em potencial, não somente pela atividade individual de um determinado composto bioativo, mas pela possibilidade de, associados a outros produtos, produzirem tal efeito (LIMA, 2001; COUTINHO et al., 2004).

Os principais grupos de compostos extraídos das plantas com atividade antimicrobiana incluem os terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos,

substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides), taninos e cumarinas (PINTO, 2008).

Nessa gama de compostos, os polifenóis têm obtido grande destaque, pois pertencem a uma classe de biocompostos que incluem uma diversidade de estruturas, simples e complexas, amplamente distribuídas no reino vegetal, que devido a sua grande diversidade química, apresentam uma variedade de funções, contribuindo para o sabor, odor e coloração de diversas plantas, sendo importantes economicamente (FULLER, 2008).

Vários métodos podem ser empregados para determinar a atividade *in vitro* dos agentes antimicrobianos, e como não são todos baseados no mesmo princípio, os resultados obtidos são influenciados, não só pelo método escolhido, mas também pelos microorganismos utilizados para realização do teste (bactérias ou fungos) e pelo grau de solubilidade de cada extrato. Estes métodos podem ser classificados em três tipos: difusão (em disco ou poços), microdiluição e bioautografia (SILVEIRA et al., 2009).

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, que se fundamentam na difusão da substância a ser avaliada (extrato), a qual é colocada em contato com o meio de cultura sólido inoculado com o microorganismo teste. A partir da difusão do extrato ocorre o aparecimento de um halo, onde não há crescimento celular, denominado de halo de inibição. A maneira como se processa esse contato define os diferentes tipos de difusão, dentre eles, a difusão em disco (com discos de papel) e em poços, através de “furos” feitos no meio de cultura (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991).

Quando se trata de extratos vegetais e da triagem *in vitro* dos seus compostos bioativos, a técnica de difusão, fundamentada na formação do halo de inibição, é a mais adequada por ser uma alternativa de baixo custo e de rápida resposta. No entanto, quando há necessidade de um maior conhecimento sobre a estrutura da molécula, a triagem dos compostos deve ser realizada através de métodos cromatográficos (ELLOF, 1998; SANTOS, 2008).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, através da migração diferenciada sobre uma camada adsorvente (sílica gel, por exemplo) retido sobre uma superfície plana (alumínio, entre outros), no qual o processo de separação está fundamentado no fenômeno de adsorção. A remoção gradual dos compostos se

dá por ação de uma fase móvel com migração individual dos solutos entre as duas fases (estacionária e móvel), resultando na separação de diferentes componentes. A CCD é uma das técnicas cromatográficas mais simples e mais econômica quando se objetiva a separação rápida e identificação visual dos possíveis compostos bioativos (KILIKIAN, 2005).

A CCD permite apenas separar diferentes classes de moléculas, devendo ser acoplada a um método para detecção da atividade antimicrobiana, como a bioautografia, que é considerada uma técnica simples, prática, reprodutível e de rápida triagem dos extratos (SANTOS, 2008). Historicamente, sua utilização para detecção de compostos antibióticos foi descrita por Goodall e Levi (1946).

A bioautografia é uma técnica aplicada para detecção de compostos com atividade biológica em misturas de composição desconhecida. Após a separação dos compostos por cromatografia, uma fina camada de meio de cultura contendo o microorganismo teste é aplicada e o surgimento de zonas de inibição do crescimento indica a presença de substâncias com potencial antimicrobiano (BURKHEAD et al., 1995; BICALHO, 2003; BRANDÃO, 2004).

As zonas de inibição do crescimento dos microorganismos correspondem aos halos formados no cromatograma, os quais são visualizados através de um agente revelador, a exemplo do cloreto 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC), com o qual a bactéria metabolicamente ativa reage, por ação enzimática, formando um complexo colorido de coloração vermelho intenso, em que a presença de zonas limpas (“brancas”) em contraste com o plano colorido do ensaio demonstra a ação inibitória dos compostos com atividade antimicrobiana (MÜLLER, 2006).

Nesta técnica, os compostos inibidores são identificados pelas medidas do fator de retenção ( $R_f$ ), o que permite a localização dos constituintes bioativos, podendo evidenciar a existência de substâncias ou frações com ação antibiótica (HOSTETTMANN & MARSTON, 1994; SILVA et al., 2001; SANTOS, 2008).

Hoelzel (2001) considera a bioautografia um ensaio eficiente para determinação da atividade antimicrobiana, ressaltando sua alta sensibilidade, já que pequenas concentrações das substâncias bioativas podem formar halo de inibição visível. Ao trabalhar com *Waltheria douradinha*, Hoelzel verificou uma considerável diferença entre a técnica da bioautografia e a de difusão, visto que as frações apresentaram resultados positivos somente nos ensaios

bioautográficos, não apresentando inibição através do método de difusão, o que pode estar relacionado à concentração da substância ativa analisada.

Entretanto, Vanden Berghe e Vlietinck (1991) relataram que o método bioautográfico demonstrou não ser muito promissor para testar extratos de plantas, que freqüentemente contêm agentes antimicrobianos muito menos potentes que os antibióticos em uso. Segundo esses pesquisadores, esse método detecta substâncias com elevado potencial antimicrobiano, sendo um método de baixa sensibilidade.

As dificuldades em se determinar os possíveis compostos antimicrobianos e suas respectivas frações inibitórias revelam a possibilidade de existir pouca difusão do composto pelo ágar ou de haver algum tipo de sinergismo entre as frações bioativas, não sendo, desta forma, detectados pelos ensaios bioautográficos (SILVA et al., 2001; SOUZA, 2007).

Embora o número de testes antimicrobianos realizados com plantas medicinais seja elevado, a grande maioria das pesquisas desenvolvidas limita-se a descrever resultados preliminares e, eventualmente, confirmar alguns efeitos preconizados para algumas espécies utilizadas na medicina popular. Raramente consegue-se isolar e caracterizar quimicamente o princípio ativo responsável pelo efeito devido à necessidade de equipamentos sofisticados e métodos biológicos rápidos e confiáveis (CALIXTO, 2001).

Neste contexto, a utilização de métodos com alta sensibilidade que proporcionem o uso ético dos produtos naturais, evitando, desta forma, desperdícios dos recursos naturais, faz com que a bioautografia seja utilizada como uma ferramenta promissora e extremamente importante para que esse objetivo seja alcançado. Suas vantagens estão, dentre outras, na pequena quantidade de amostra utilizada e na possibilidade de se testar um grande número de extratos contra um ou vários microorganismos (VALGAS, 2002).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de realização dos experimentos**

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) e de Germinação (LAGER) localizados na Unidade Experimental do Horto Florestal (UEHF) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) em parceria com o Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA) da Universidade Católica do Salvador (UCSAL), e os Laboratórios de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB), e de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

#### **3.2 Material vegetal**

Para o estabelecimento das culturas *in vitro* e *ex vitro* foram utilizadas sementes de *M. urundeuva* provenientes de plantas matrizes existentes em uma área do Campo Experimental da Caatinga, na Embrapa SEMI-ÁRIDO (CPATSA) localizada no município de Jutai, em Petrolina no estado de Pernambuco, Brasil.

#### **3.3 Obtenção das plantas *in vitro***

Os frutos foram separados das sementes através da remoção do exocarpo com fricções contínuas sob água corrente e auxílio de uma peneira. Após a remoção de todo o exocarpo, as sementes passaram por um processo de desinfestação superficial, em câmara de fluxo laminar, sendo imersas em álcool a 70% por 30 segundos com subsequente imersão em hipoclorito de sódio a 1% durante 5 minutos.

Após este processo, as sementes foram lavadas com água destilada estéril por três vezes consecutivas, sendo em seguida inoculadas em tubos de ensaio contendo 10,0 mL dos diferentes meios de cultura a serem avaliados: WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981) e MS completo (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições de 15 tubos por parcela, sendo as culturas mantidas em sala de

crescimento com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16hs e irradiação fotossintética ativa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Neste ensaio foi avaliada a percentagem de germinação das sementes no 3° e 7° dia após a inoculação e o número de plântulas formadas no 10° e 15° dia de cultivo. Decorridos os 45 dias de cultivo, avaliou-se o número de folhas e o alongamento do eixo cotiledonar (parte aérea), com a finalidade de se identificar o melhor meio de cultura a ser utilizado, tomando-se como base a germinação e o crescimento inicial das plântulas.

Após esta definição, um novo ensaio foi montado, visando à obtenção de plântulas para avaliação da atividade antimicrobiana e a quantificação dos compostos fenólicos. Neste, aos 42 dias de cultivo, as plântulas foram secas em estufa de circulação de ar a  $40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  por sete dias, sendo em seguida maceradas em gral e pistilo de porcelana, e armazenadas em dessecador.

### **3.4 Calogênese**

As plântulas previamente estabelecidas *in vitro* também serviram como fonte de explantes para a indução dos calos. Inicialmente foram utilizados segmentos cotiledonares e foliares, os quais foram inoculados em meio WPM suplementado com 2,4-D na concentração de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . Contudo, em virtude da elevada taxa de oxidação dos explantes, um novo experimento foi conduzido com concentrações mais baixas do regulador ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Cada ensaio constou de dez repetições com 15 tubos por parcela e o delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, avaliando-se após 45 dias de cultivo a percentagem de calos formados e oxidados. Estas culturas permaneceram no escuro até o final do experimento, sendo mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Os calos obtidos, na concentração do 2,4-D que obteve maior percentagem, foram liofilizados por 24hs sendo em seguida armazenados no freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior avaliação da atividade antimicrobiana e quantificação dos compostos fenólicos.

### 3.5 Condicionamento osmótico

Com o intuito de avaliar o efeito do condicionamento osmótico na *M. urundeuva*, foi realizado o osmocondicionamento das sementes através da utilização de PEG 6000 a -1,0 MPa (potencial de “priming” baseado no trabalho de estresse hídrico desenvolvido por Virgens et al., 2008) sob sistema de aeração contínua forçada com bomba de aquário, durante os períodos de 2, 3 e 4 dias de condicionamento.

Após cada período, as sementes foram retiradas do sistema e lavadas com água destilada para remoção do excesso de PEG e, logo em seguida, divididas em dois lotes: no primeiro, as sementes foram imediatamente colocadas para germinar em placas de petri com duas folhas de papel germitest sendo acondicionadas em câmara de germinação a 25°C com fotoperíodo de 12hs, para posterior avaliação dos parâmetros germinativos; no segundo, as sementes ficaram a temperatura ambiente por 4hs, para que secassem e atingissem o peso inicial, sendo em seguida montado o ensaio de germinação nas mesmas condições do primeiro. Estes experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes por placa.

Durante um período de sete dias, foram realizadas avaliações diárias para contagem do número de sementes que haviam emitido radícula. Ao final, foram estimados os seguintes parâmetros germinativos: percentagem de germinação (%G), tempo médio (TM), índice de velocidade germinativa (IVG), velocidade de emergência (VE) e coeficiente de uniformidade (CUG).

### 3.6 Cultivo em casa de vegetação

Definido o período de condicionamento osmótico, um novo grupo de sementes foi osmocondicionado e, em seguida, semeados em tubetes plásticos preenchidos com terra vegetal adubada com superfosfato simples (18% de  $P_2O_5$ ), na proporção de 1 litro por  $m^3$  de substrato. Esses tubetes foram mantidos em casa de vegetação com 60% de sombreamento, e dispostos em delineamento experimental em blocos casualizados com oito repetições de 26 tubetes por parcela, totalizando 208 tubetes por tratamento: sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas (controle).



Em cada tubete foram semeadas três sementes, sendo irrigados diariamente até o 15º dia e, após esse período, irrigados em dias alternados até completar 42 dias de cultivo. No 21º dia de cultivo foi realizado o desbaste das plantas, mantendo-se apenas uma por tubete.

No sétimo dia de cultivo foi avaliada a porcentagem de emergência das plântulas; com 15 dias medido o comprimento da parte aérea e o número de lançamentos e aos 21 dias avaliado o comprimento da parte aérea, o peso fresco e seco da parte aérea e a área foliar. Para o cálculo da área, as folhas foram escaneadas e salvas como imagem para posterior medição da aérea total, em cm<sup>2</sup>, através do programa QUANT v.1.0.1, licenciado para Daniela Biaggioni Lopes da Embrapa – CPATSA.

Ao final do experimento, com 42 dias, foi realizada a análise destrutiva, na qual se avaliou o comprimento da parte aérea, o comprimento da raiz, o peso fresco e seco da parte aérea e da raiz, além da área foliar. Todas essas variáveis foram analisadas em três amostras de plantas por repetição de cada tratamento.

Buscando-se relacionar o crescimento inicial das plantas com os parâmetros bioquímicos, determinou-se o teor das clorofilas (“a” e “b”) e dos carotenóides totais nas folhas ao final do experimento.

Para quantificação das clorofilas e dos carotenóides foi utilizado o método descrito por Zaicoviski et al. (2008) adaptado de Lichtenthaler (1987).

No preparo dos extratos, foram pesadas 0,40 g de folhas frescas, as quais foram maceradas, com o auxílio de bastões de vidro, dentro de tubos falcon, contendo 5,0 mL de acetona 80%, sendo em seguida, centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos. Destes extratos foi coletado o sobrenadante, o qual foi medido e avolumado para 10,0 mL.

Estas amostras foram diluídas (1:2), para posterior leitura no espectrofotômetro Uv-Vis (Analyser 850M) das absorbâncias a 663 nm para clorofila “a”; 647 nm para clorofila “b”; e 480 nm para os carotenóides totais, utilizando como branco a acetona 80%.

As concentrações dessas moléculas foram determinadas com base nas relações descritas por WHITHAM et al. (1971):

$$\text{Chla} = [(12,25 \times \text{Abs } 663) - (2,79 \times \text{Abs } 647)] \times [V/(1000 \times \text{MF})]$$

$$\text{Chlb} = [(21,50 \times \text{Abs } 647) - (5,10 \times \text{Abs } 663)] \times [V/(1000 \times \text{MF})]$$

$$\text{Car} = [((1000 \times \text{Abs } 480) - (1,82 \times \text{Chla}) - (85,02 \times \text{Chlb}))/198] \times [V/(1000 \times \text{MF})]$$

Onde: Chla, Chlb e Car são, respectivamente, os teores de clorofila “a”, “b” e carotenóides totais; Abs 663, Abs 647 e Abs 480, as absorvâncias no comprimento de 663 nm, 645 nm e 480 nm; V corresponde ao volume utilizado (mL) e MF a massa fresca (g).

Após 42 dias de cultivo em casa de vegetação, as plantas restantes foram colhidas e secas em estufa de circulação de ar a 40°C ± 5°C por sete dias, sendo em seguida maceradas em moinho de facas e posteriormente em gral e pistilo de porcelana, para logo em seguida, serem armazenadas em dessecador até o momento das análises da atividade antimicrobiana e da concentração dos compostos fenólicos.

### 3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

#### 3.7.1 Testes preliminares

Buscando-se uma triagem preliminar da atividade antimicrobiana, foram utilizadas plantas jovens mantidas em casa de vegetação, testando-se extratos das suas partes botânicas frente a algumas bactérias e fungos. Para a raiz preparou-se um extrato hidroalcoólico e, para o caule e folha, extratos aquosos.

Foram utilizadas sete cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Salmonella cholerea-suis* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* Isolado de Amostra Clínica (SAIACLIN) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Além das *Candida albicans* ATCC14053, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6558.

Estes microorganismos foram doados pelo LAPEMM (Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica da Universidade Federal da Bahia) originários da bacterioteca do INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, com exceção da *K. pneumoniae*, do SAIACLIN e das cândidas que foram doadas por um laboratório particular de Salvador, Bahia.

Os ensaios com os extratos de raiz, caule e folha foram realizados através do método da difusão em discos, em placas de petri contendo Ágar Müller-Hinton (MHA) para as cepas bacterianas e Ágar Sabouraud (AS) para as cândidas. Estas placas foram inoculadas com as suspensões celulares padronizadas através da turbidez equivalente a escala 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Sobre o meio de cultura foram colocados discos de papel filtro impregnados com os extratos em diferentes concentrações (1,0 mg/disco; 2,0 mg/disco e 3,0 mg/disco).

Para o controle negativo utilizou-se 10,0  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido), que também foi utilizado para ressuspensão dos extratos e como controle positivo foi utilizado discos de sensibilidade de antibióticos comerciais apropriado para cada microorganismo, conforme metodologia descrita por OPLUSTIL et al. (2000).

Posteriormente a inoculação, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24hs, e os dados avaliados através da mensuração do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos. Este experimento foi realizado em triplicata e os resultados representados pela média aritmética dos halos formados (LIMA et al., 2000; NCCLS, 2003).

### 3.7.2 Ensaio microbiológico

Mediante os resultados foi selecionado o *S. aureus* ATTC 6538, para condução dos novos bioensaios. Sua escolha também foi decorrente do fato desse ser uma das espécies mais patogênicas e virulentas para os humanos, sendo a mais comum em casos de infecções bacterianas.

Neste experimento foram utilizadas folhas provenientes do cultivo *in vitro* e das plantas mantidas em casa de vegetação, oriundas de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas, além dos calos. Para avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se a técnica de difusão em poços e a bioautografia acoplada à cromatografia de camada delgada.

#### 3.7.2.1 Cromatografia de camada delgada

Para o fracionamento e avaliação das diferentes amostras foram preparados quatro extratos com solventes de polaridades distintas (acetona, acetato de etila, etanol e hexano).

No preparo dos extratos foram utilizadas 0,10 g das amostras de folhas fresca e seca das plantas provenientes de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e 0,05 g das amostras de folhas seca das plantas cultivadas *in vitro* e dos calos frescos e secos (nessas duas últimas amostras não foi utilizado o solvente acetona, em decorrência da quantidade de amostra).

Após a pesagem foram adicionadas 8,0 mL dos solventes em tubos falcon que permaneceram em repouso por aproximadamente 16hs, para em seguida serem concentrados através da evaporação de parte do solvente à temperatura ambiente por 24hs. Após esse período, os extratos foram padronizados para um volume final de 3,0 mL.

O fracionamento dos extratos foi realizado com a utilização de cromatofolhas de alumínio, preparativa (CCD 1,5 x 8,0 cm sílica G60 F254-366, 0,25 mm de espessura – marca: Merck), as quais foram cortadas em pequenas cromatofolhas de 7,0 cm de comprimento por 5,0 cm de largura, e autoclavadas a temperatura de 121°C e pressão de 1 atm por 30 minutos, sendo em seguida secas em estufa a 50°C por 48hs.

Para a eluição dos extratos, nas cromatofolhas, utilizou-se o solvente de corrida acetato de etila/hexano na proporção de 3:7 (v/v), sendo as bandas formadas visualizadas sob luz UV no comprimento de 366 nm. À distância de migração das bandas foi determinada pelo cálculo do R<sub>f</sub>, dividindo-se a distância do centro das bandas pela distância total da eluição do solvente de corrida.

### 3.7.2.2 Difusão em poços

A atividade antimicrobiana dos quatro extratos fracionados por CCD foi avaliada através da técnica de difusão em poços. Para isso utilizou-se placas de petri contendo meio TSA (Tryptic Soy Ágar) com utilização da alça de Drigalski para inoculação de 0,01 mL da suspensão celular do *S. aureus* padronizada através da turbidez equivalente a escala 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

Decorridos 15 minutos, após a inoculação da suspensão, foram feitos poços no meio com o auxílio de perfuradores específicos para posterior pipetagem de 5,0 µL e 10,0 µL de cada extrato. Cada placa continha além dos extratos, os solventes utilizados na sua preparação, o qual foi utilizado como controle negativo.

Este ensaio foi realizado em duplicatas e as placas incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48hs, sendo os resultados avaliados através da visualização da formação de halos de inibição, através das análises qualitativas do tamanho dos halos, após 24hs e 48hs de incubação.

### 3.7.2.3 Bioautografia

Sob câmara de fluxo laminar foram preparadas placas de petri contendo ágar-água a 2%, as cromatofolhas com os extratos eluídos e o meio TSA acrescido de 0,01% do corante TTC. Nestas, foi inoculado 0,01 mL da suspensão celular de *S. aureus* preparada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), sendo em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24hs. A avaliação da atividade foi realizada através da visualização da formação de halos de inibição em torno das bandas formadas no cromatograma.

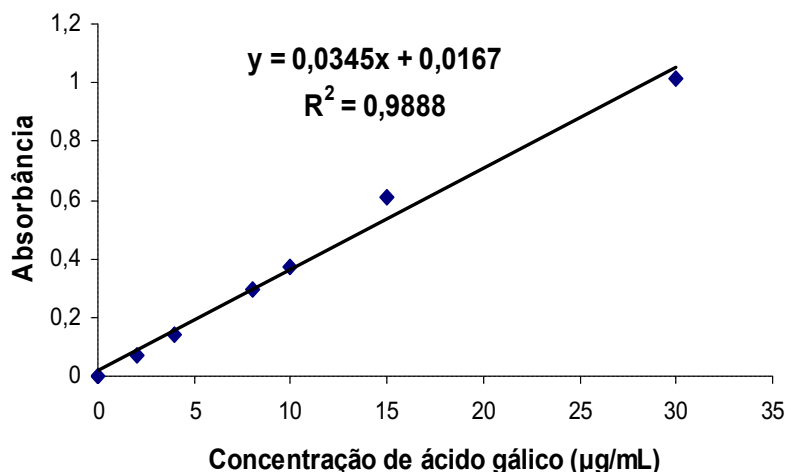
## 3.8 Determinação dos compostos fenólicos

A concentração dos compostos fenólicos foi determinada nas amostras de folhas secas das plântulas germinadas *in vitro* e cultivadas em casa de vegetação provenientes de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas, além das amostras dos calos liofilizados.

Tomando-se como base a metodologia proposta por Folin-Ciocalteu (1927) modificado por Arnaldos et al. (2001), pesou-se 0,10 g de cada amostra, em triplicatas, nas quais foram realizadas cinco extrações sucessivas com 2,0 mL de metanol 80%, até o ponto de fervura com o auxílio da placa aquecedora a aproximadamente 105°C. Após cada extração, o sobrenadante foi coletado em tubo falcon até o término das cinco extrações para em seguida ser avolumado para 10,0 mL.

A análise reativa foi conduzida em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de carbonato de sódio ( $75 \text{ g.L}^{-1}$ ), 0,25 mL da amostra e 1,25 mL do reagente de Folin (1:10 v/v), utilizando-se como branco a água destilada. Essa mistura reacional permaneceu em banho-maria a 50°C por 5 minutos, sendo em seguida resfriada a temperatura ambiente, para posterior leitura no espectrofotômetro UV-VIS (Analyser 850M) a 760 nm. Os valores de absorbância foram utilizados para

determinação das concentrações, a partir da curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 2, 4, 8, 10, 15 e 30,0 µg/mL, sendo o gráfico da curva plotado no Excel para obtenção da equação linear da reta (Figura 5).



**Figura 5.** Curva de calibração padrão das concentrações de ácido gálico.

### 3.9 Análise estatística

Foram realizadas análises de variância, Teste t e Teste Tukey (dentro e entre os grupos, com nível de significância de 5%), através da utilização do programa estatístico SISVAR v. 4.3, desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). Vale ressaltar que os resultados de percentagem foram transformados em arco – seno de  $(x + 1)^{1/2}$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção das plântulas *in vitro*

Após três dias de cultivo, 69% das sementes inoculadas no meio WPM já haviam emitido radícula, enquanto que no meio MS apenas 19%. Entretanto, após sete dias de cultivo essa percentagem se igualou e os dois meios apresentaram 91% de germinação.

Decorridos 15 dias, o número de plântulas formadas foi maior no meio WPM, com 95% das plântulas apresentando alongamento do eixo caulinar, contra

88% no meio MS. Em relação à parte aérea e ao número de folhas, após 45 dias de cultivo, as plântulas germinadas nos dois meios diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1).

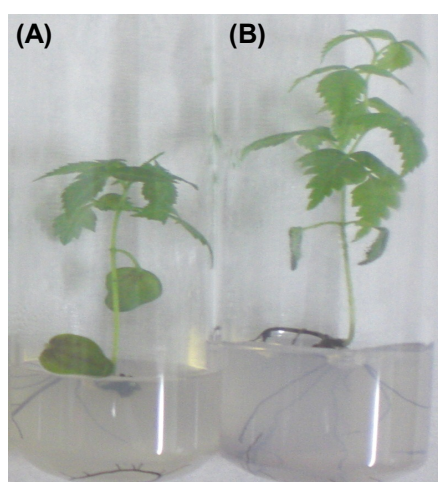
**Tabela 1.** Formação de plântulas, comprimento do eixo caulinar e número de folhas por planta de *Myracrodruon urundeuva*, após 45 dias de cultivo *in vitro*.

Meio de cultura	Formação de plântulas (%)	Comprimento do eixo caulinar (cm)	Número de folhas por planta
MS	88	1,81	3,71
WPM	95*	4,64*	4,55*
CV (%)	30,18	22,8	19,97

\*Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lu (2005) no cultivo *in vitro* de *Vitis thunbergii* e por Huimei et al. (2005) na regeneração de *Camptotheca acuminata*, no entanto, Pereira (2004) obteve melhores resultados para a *Uncaria guianensis* com a utilização do meio MS, já Nery et al. (2008) não verificou diferenças significativas entre os meios MS e WPM para a germinação *in vitro* dos embriões de *Tabebuia serratifolia*.

Através dos resultados pode-se verificar que o meio WPM apresentou melhor desempenho para o estabelecimento *in vitro* e crescimento inicial das plântulas de *M. urundeuva*, proporcionando maior alongamento da parte aérea e maior número de folhas (Figura 6).



**Figura 6.** Plântulas de *Myracrodruon urundeuva* estabelecidas *in vitro* nos dois tipos de meio avaliados: MS (A) e WPM (B).

Alguns estudos confirmam que a eficiência do meio de cultura varia conforme a espécie, sendo um fator determinante para o estabelecimento e desenvolvimento dos explantes *in vitro*. Apesar dos inúmeros trabalhos avaliando os diferentes tipos de meio, o cultivo *in vitro* das espécies lenhosas ainda requer estudos mais específicos, buscando-se desenvolver metodologias que atendam às exigências nutricionais e hormonais dos explantes (PEREIRA, 2004).

As plantas lenhosas, em particular, apresentam mais dificuldades de se estabelecerem *in vitro*, em decorrência da alta taxa de oxidação dos explantes e formação de caloses em torno da superfície excisada, o que geralmente desencadeia modificações na composição química do meio (COSTA et al., 2007).

Para as lenhosas, o meio MS tem se mostrado pouco eficiente, podendo-se verificar que composições mais diluídas em macronutrientes promovem melhor desempenho *in vitro*. Formulações especialmente desenvolvidas como o meio WPM têm sido freqüentemente utilizadas como alternativa ao meio MS, por apresentar 25% das concentrações de íons nitrato e amônia, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, o que auxilia na sustentação do crescimento inicial das plântulas *in vitro* (PASQUAL, 2001; NERY et al., 2008).

## 4.2 Calogênese

A utilização do 2,4-D evidenciou que a concentração de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> promoveu melhores resultados, diferindo da concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, no entanto, houve uma elevada taxa de oxidação dos explantes. Em relação aos explantes, não foi possível verificar diferenças significativas entre os segmentos cotiledonares e foliares quando se utiliza a concentração de 2,0 mg.L<sup>-1</sup>, todavia, com 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, o segmento foliar demonstrou ser mais responsivo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Percentual de calos formados a partir dos segmentos cotiledonares e foliares de *Myracrodruon urundeuva* após 45 dias de cultivo *in vitro* com o meio WPM suplementado com duas concentrações de 2,4-D.

Concentração de 2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	Porcentagem de calos	
	Segmento cotiledonar	Segmento foliar
2,0	50	52
4,0	22	36*

\*Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.



Cerqueira et al. (2002) estudando o *Tridax procumbens*; Thomas & Philip (2005) analisando a *Tylophora indica*; e Dhar & Joshi (2005) trabalhando com diferentes explantes na calogênese de *Saussurea obvallata* verificaram significativa influência do tipo de explante sobre a taxa de formação dos calos, sendo os de origem foliar os que proporcionaram melhores resultados.

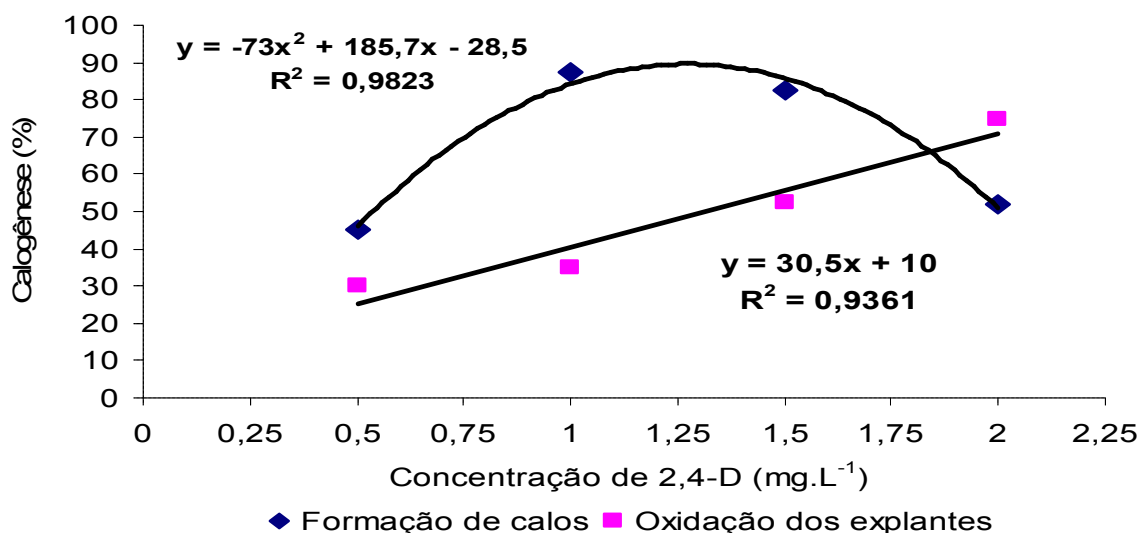
Diversas dificuldades são enfrentadas durante o estabelecimento *in vitro* das espécies lenhosas, principalmente as medicinais, como a contaminação e a elevada oxidação dos explantes, sendo a oxidação um dos principais problemas enfrentados durante o estabelecimento e o cultivo *in vitro* (XAVIER et al., 2007; VASCONCELOS-FILHO, 2008).

Neste ensaio, além do baixo percentual de calos formados, pôde-se verificar uma alta taxa de oxidação, com obtenção de calos com consistência compacta e coloração escura, indicando que a concentração do regulador 2,4-D interferiu diretamente na oxidação dos explantes.

Costa e Pereira (2005) afirmam que a presença do 2,4-D no meio de cultura está associada a uma maior taxa de oxidação dos explantes de *Piper hispidinervum*.

Em decorrência da elevada oxidação dos explantes, um novo experimento foi conduzido, avaliando-se doses mais baixas de 2,4-D. Neste pôde-se constatar que as respostas aos tratamentos com baixas concentrações do regulador adotaram uma curva de tendência polinomial quadrática, na qual a concentração de 1,25 mg.L<sup>-1</sup> correspondeu ao ponto máximo da curva, promovendo 89,6% de formação de calos.

Este comportamento quadrático indicou que concentrações acima e abaixo de 1,25 mg.L<sup>-1</sup> apresentam tendência de redução da percentagem de formação dos calos. No entanto, a taxa de oxidação dos explantes apresentou tendência linear, indicando que quanto maior for a concentração do 2,4-D no meio, maior será a percentagem de oxidação (Figura 7).



**Figura 7.** Percentagem de formação de calos e oxidação dos explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* nas diferentes concentrações de 2,4-D após 45 dias de cultivo *in vitro*.

O aumento linear da oxidação dos explantes pode ter ocorrido em função da liberação *in vitro* de compostos fenólicos que são os precursores da síntese de lignina. Segundo Sato et al. (2001), os compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas que inibem o desenvolvimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura.

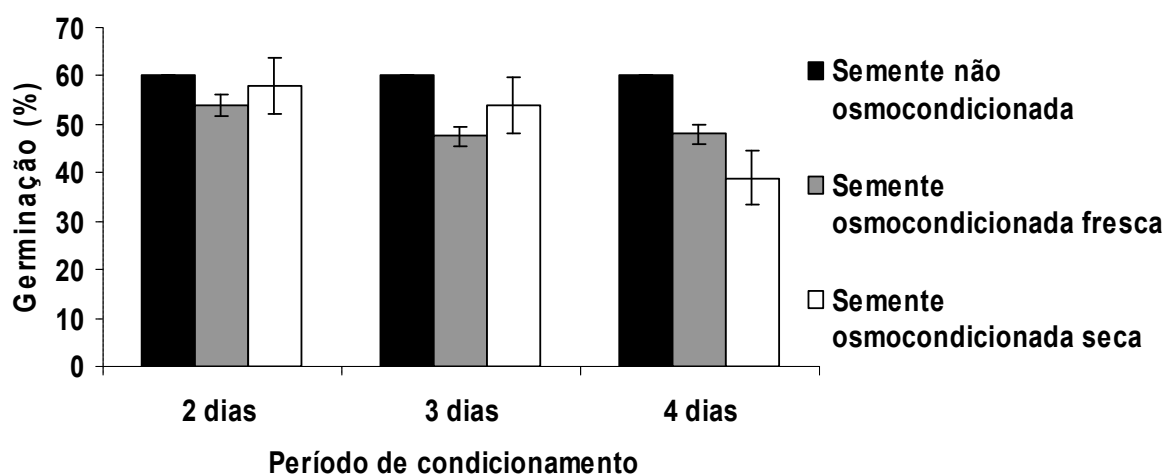
O regulador 2,4-D é a auxina mais utilizada para a indução de calos e, no caso dos explantes foliares de *M. urundeuva*, influenciou de forma positiva para indução da calogênese, levando-se em consideração a concentração utilizada.

Nogueira (2003) e Soares (2003) verificaram que explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss) e ingazeiro (*Inga vera* Willd.), respectivamente, também apresentaram maior percentagem de formação de calos na presença de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

Contraopondo-se a estes resultados, Sahoo et al. (1997), constatou que concentrações entre 0,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D não foram eficientes para induzir a formação de calos em explantes foliares de *Morus indica*, enquanto que para o *Schizolobium parahyba* ficou evidente que na presença de tais concentrações houve indução da calogênese (REIS et al., 2007).

### 4.3 Condicionamento osmótico

Para as sementes de *M. urundeuva*, os dados evidenciaram que o osmocondicionamento não foi eficiente para promover uma melhora na germinabilidade das sementes, pois os tratamentos avaliados não diferiram estatisticamente do tratamento controle – sementes não osmocondicionadas (Figura 8), o que pode estar diretamente relacionado à baixa qualidade do lote que atingiu apenas 60% de germinação, valor muito abaixo dos obtidos na maioria dos trabalhos com essa espécie, a exemplo do trabalho desenvolvido por Virgens et al. (2008), que obteve 90% de germinação.



**Figura 8.** Percentagem de germinação, em laboratório, das sementes de *Myracrodruon urundeuva* nos diferentes períodos de osmocondicionamento.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Heydecker e Coolbear (1977), os quais não obtiveram respostas satisfatórias para o osmocondicionamento das sementes de *Allium cepa*, apresentando germinação também abaixo de 60%. Isto indica que dependendo da espécie e da qualidade fisiológica dos lotes podem ocorrer diferentes respostas ao osmocondicionamento.

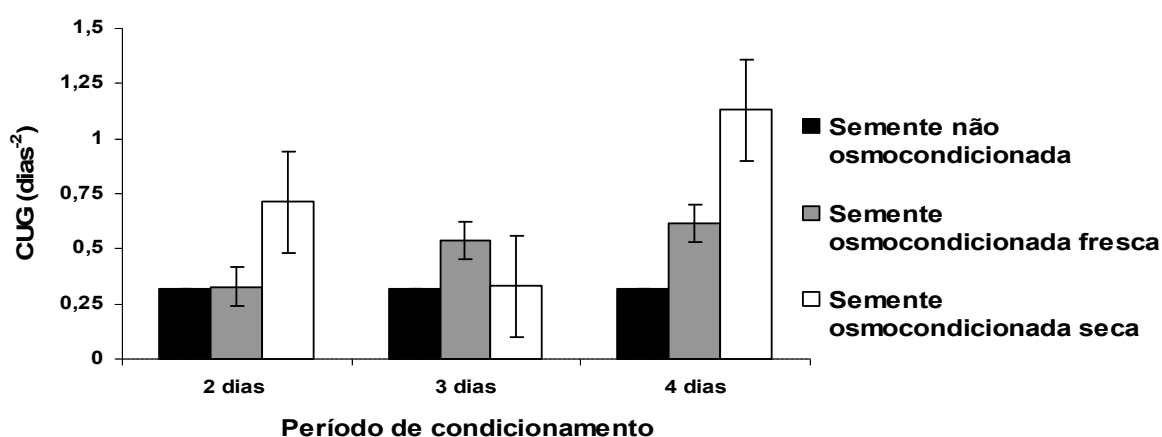
Em relação às variáveis germinativas: tempo médio ( $T_m$ ) e índice de velocidade germinativa (IVG) verificou-se que no tratamento controle a germinação ocorreu em menos tempo e com maior valor de IVG, sendo esse índice influenciado pelo tempo e pela velocidade média, não havendo, portanto, diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios das variáveis germinativas: tempo médio (Tm) e índice de velocidade germinativa (IVG) das sementes de *Myracrodruon urundeuva* após o osmocondicionamento.

Tratamentos	Variáveis analisadas	
	Tm (dias)	IVG (sem. dia <sup>-1</sup> )
Controle (sementes não osmocondicionadas)	2,05 a	0,49 a
2 dias	fresca	2,62 b
	seca	2,46 a b
3 dias	fresca	2,28 a b
	seca	2,57 b
4 dias	fresca	2,38 a b
	seca	2,42 a b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entres si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Por outro lado, em relação ao coeficiente de uniformidade germinativa (CUG) foi verificado um aumento significativo no tratamento em que as sementes foram osmocondicionadas por quatro dias com posterior secagem, resultado esse que não apresentou diferença estatística do tratamento com dois dias de osmocondicionamento e posterior secagem das sementes (Figura 9), no entanto, observa-se que para a germinação (Figura 8), o tratamento de dois dias de osmocondicionamento com posterior secagem das sementes apresentou resultados mais satisfatórios.



**Figura 9.** Coeficiente de uniformidade germinativa das sementes de *Myracrodruon urundeuva* após os diferentes períodos de osmocondicionamento.

De acordo com Bradford (1986), para se obter condições favoráveis ao osmocondicionamento são importantes o período de duração, o método, o tempo de secagem das sementes após o condicionamento, a espécie e o vigor dos lotes.

Fessel et al. (2002) trabalhando com sementes de *Lactuca sativa* confirmaram tais informações, verificando que a resposta ao osmocondicionamento variou em função do nível de vigor das sementes e do período de embebição das mesmas na solução osmótica.

Alguns trabalhos demonstram que a eficiência do osmocondicionamento na manutenção do poder germinativo das sementes, indica ser uma alternativa viável para melhorar o aproveitamento em campo, devendo-se levar em consideração a qualidade e o vigor das sementes (MURRAY et al., 1992; SILVA et al., 2005).

#### 4.4. Cultivo em casa de vegetação

Pôde-se constatar que as plantas oriundas de sementes osmocondicionadas emergiram de forma mais rápida e uniforme, e em maior quantidade que as oriundas das sementes não osmocondicionadas. Após sete dias de cultivo 20% das sementes osmocondicionadas já haviam emergido diferindo das sementes que não foram osmocondicionadas, com apenas 14%. Entretanto, após 15 dias a percentagem de germinação se igualou entre os tratamentos, com 43% de germinação para ambos.

Ao analisar as variáveis de crescimento inicial verificou-se que não houve diferença significativa nos resultados relativos à parte aérea e raiz (Tabela 4 e 5).

**Tabela 4.** Comprimento, peso fresco e seco da parte aérea e área foliar das plantas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes de sementes não osmocondicionadas (não osmo) e osmocondicionadas (osmo) com 21 e 42 dias de cultivo em casa de vegetação.

Parâmetros analisados	21 dias		42 dias	
	Não osmo	Osmo	Não osmo	Osmo
Comprimento (cm)	2,06	2,16	4,59	4,66
Peso fresco (g)	0,029	0,031	0,186	0,196
Peso seco (g)	0,006	0,007	0,042	0,046
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	4,22	5,38	39,85	50,30*

\*Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

Ao analisar a área foliar (Tabela 4) verifica-se que as plantas provenientes de sementes osmocondicionadas apresentaram maior expansão foliar, visto que os possíveis danos provocados pelo estresse inicial nas sementes induziram as plantas a desviar sua maquinaria metabólica acumulando biomassa na parte

aérea, numa tentativa de compensar alguma deficiência química ou metabólica frente ao déficit hídrico.

**Tabela 5.** Comprimento, peso fresco e seco da raiz das plantas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes de sementes não osmocondicionadas e osmocondicionadas com 42 dias de cultivo em casa de vegetação.

Parâmetros analisados	Tratamentos	
	Não osmocondicionadas	Osmocondicionadas
Comprimento (cm)	18,37	18,06
Peso fresco (g)	0,056	0,056
Peso seco (g)	0,020	0,023

Não significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

Os resultados demonstram que o efeito do osmocondicionamento nas sementes de aroeira-do-sertão foi eficiente para promover uma melhora no estande inicial das plantas em casa de vegetação, já que de acordo com Santos et al. (2008), essa técnica é utilizada para reduzir o tempo entre a semeadura e a emergência das plântulas, bem como sincronizar sua emergência, não influenciando no desenvolvimento das plantas ao longo do seu período de cultivo.

Larsen et al. (1998), afirma que a influência do vigor do lote sobre o desempenho das sementes pode existir mesmo quando não há diferenças no estande inicial de crescimento e desenvolvimento das plantas, em virtude dos ajustes bioquímicos. Sendo assim, pôde-se verificar que o osmocondicionamento promoveu um decréscimo nos teores das clorofilas “a” e “b” e dos carotenóides totais, havendo diferença significativa apenas para as clorofilas (Tabela 6).

**Tabela 6.** Teores de clorofilas “a” e “b”, e carotenóides totais nas folhas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes das plantas não osmocondicionadas e osmocondicionadas após 42 dias de cultivo em casa de vegetação.

Tratamentos	Teores de clorofila (mg.g <sup>-1</sup> )		
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenóides totais
Não osmocondicionada	0,27*	0,063*	0,079
Osmocondicionada	0,16	0,039	0,052

\*Significativo pelo Teste t a 5% de probabilidade.

Segundo Streit et al. (2005), as clorofilas são pigmentos instáveis, e sua concentração é influenciada por fatores como déficit hídrico, intensidade luminosa e variação de temperatura, esses fatores juntos ou isolados podem afetar a

integridade das moléculas, já os carotenóides totais têm importante papel na proteção das folhas, dissipando o excesso da energia de excitação (ASADA, 1999; MITTLER, 2002).

Beltrano (2006) identificou uma diminuição significativa no teor da clorofila “a” em *Triticum aestivum*, o que deve estar relacionado à ação dos agentes de degradação oxidativa, indo de encontro com Luís (2009) que ao avaliar as repostas da *Jatropha curcas* ao déficit hídrico, verificou um aumento significativo na concentração das clorofilas “a” e “b”.

Durante o período de déficit hídrico, promovido pelo osmocondicionamento, a diminuição do conteúdo de metabólitos é comum, tal fato deve-se a exposição das sementes a possíveis agentes de degradação oxidativa, que provocam danos no seu metabolismo (LOGGINI et al., 1999; LUÍS, 2009).

#### 4.5 Atividade antimicrobiana

Na triagem preliminar foi possível verificar que o extrato hidroalcoólico da raiz não apresentou atividade para nenhuma das cepas testadas e que o extrato aquoso do caule só inibiu o crescimento do SAIACLIN, na concentração de 3,0mg/disco. Contudo, o extrato aquoso das folhas, independente da concentração, apresentou atividade frente às cepas de *K. pneumoniae*, *S. cholerae-suis*, *S. aureus*, SAIACLIN e *P. aeruginosa*, no entanto, para o *M. luteus* apenas a concentração de 1,0mg/disco não apresentou atividade (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores médios do comprimento do halo de inibição do extrato aquoso das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, nas três concentrações testadas, frente às cepas de *K. pneumoniae*, *M. luteus*, *S. cholerae-suis*, *S. aureus*, SAIACLIN e *P. aeruginosa*.

Microorganismos	Concentração dos extratos (mg/disco)		
	1,0	2,0	3,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,0	13,0	14,0
<i>Micrococcus luteus</i>	---	8,0	10,0
<i>Salmonella cholerae-suis</i>	23,3	24,0	26,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,0	16,0	18,0
<i>Staphylococcus aureus</i> (SAIACLIN)	17,3	17,3	19,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,0	9,3	10,0

\*Antibióticos controle: Cloranfenicol (halo: 12,5 nm) e Ciprofloxacina (halo: 15,0 nm)

Estes resultados são compatíveis com os encontrados por Avancini et al. (2000) que verificou efeito inibitório dos extratos de *Baccharis trimera* para as bactérias gram-positivas; por Nascimento et al. (2000) que constatou atividade antimicrobiana nos extratos de *Rosmarinus officinalis* e *Melissa officinalis*; e por Oliveira et al. (2005) que verificou atividade nos extratos de folhas de *Syzygium cumini* frente ao *M. luteus*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Contra-pondo-se aos resultados obtidos neste trabalho, Alves et al. (2009) identificou atividade antimicrobiana da casca da *M. urundeuva* sobre alguns microorganismos da cavidade oral, como, por exemplo, a *C. albicans* e *C. krusei*.

Mediante os resultados da triagem preliminar um novo experimento foi conduzido para determinar a atividade antimicrobiana das folhas através da técnica da bioautografia, frente apenas à cepa de *S. aureus*.

Neste novo ensaio, avaliou-se a atividade das folhas provenientes do cultivo *in vitro*, das plantas oriundas de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas, além dos calos cultivados a partir do explante foliar. Essas amostras foram extraídas com acetona, acetato de etila, etanol e hexano, visto que, segundo Simões et al. (2004), o fracionamento do extrato bruto das plantas com solventes de polaridade distinta possibilita inferir as possíveis classes de substâncias bioativas extraídas de acordo com suas polaridades e solubilidades.

Através da cromatografia pôde-se constatar que nos extratos dos calos não foi possível visualizar formação de bandas. Entretanto, para as outras amostras foram visualizadas de uma a duas bandas para as amostras frescas, e de duas a três bandas para as amostras secas, destacando-se as amostras extraídas com o solvente hexano e as provenientes do cultivo *in vitro* (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores, em mm, do fator de retenção das amostras de folhas da *Myracrodruon urundeuva* extraídas com acetona, acetato de etila, etanol e hexano, eluídas através do sistema acetato de etila/hexano 3:1 (v/v) e visualizadas sob luz UV (366 nm).

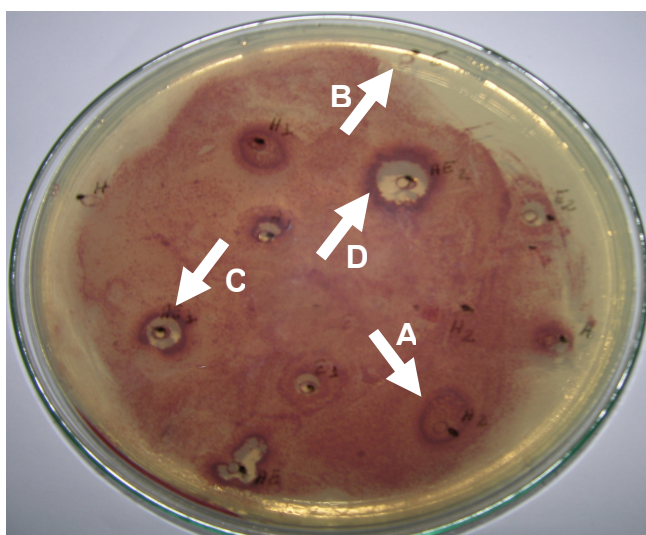
Amostras de folhas provenientes de sementes	Índice de Retenção (Rf)							
	Acetona		Acetato de etila		Etanol		Hexano	
Osmocondicionadas frescas	31		32	43	35		28	
Osmocondicionadas secas	31	35	32	37	34	39	28	31 37
Não osmocondicionadas frescas	31		32	43	34		28	
Não osmocondicionadas secas	30	35	32	36	33	37	27	31 38
Cultivadas <i>in vitro</i> secas			24	28	18	20	25	36 40 42



Ao analisar um cromatograma, as bandas significam um composto ou grupo de compostos separados, no qual quanto mais próxima a banda estiver da origem, mais polar é a substância ou grupo destas. Contudo, substâncias com alto peso molecular também podem ficar retidas próximas a origem, pois o alto peso molecular pode dificultar sua migração. No entanto, isso não quer dizer que tais compostos possuam atividade antimicrobiana, já que a cromatografia apenas fraciona os extratos com provável potencial biológico (SANTOS, 2008).

Apesar dos resultados positivos do ensaio preliminar, não foi possível verificar atividade antimicrobiana através da bioautografia, nas condições de extração e bioensaio testadas. Porém, como a triagem preliminar foi realizado com a utilização de extrato aquoso, um novo ensaio foi conduzido com a técnica de difusão em poços, a fim de se investigar o efeito antimicrobiano dos quatro extratos fracionados e avaliados através da bioautografia, entretanto, só foram analisados os extratos em que foi possível a visualização das bandas.

Neste, foi constatado que as amostras, independente da origem, extraídas com hexano não apresentaram atividade, já nas extraídas com etanol houve inibição tanto nas amostras como no solvente. Para as outras amostras, extraídas com acetona e acetato de etila, foi observada atividade inibitória, através da formação de regiões onde não houve crescimento celular (Figura 10).



**Figura 10.** Halos de inibição formados, em contraste com o corante TTC, da amostra de folhas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes de sementes osmocondicionadas: (A) ausência de inibição do extrato hexânico, (B) inibição do solvente etanol, (C) baixa inibição do extrato acetônico e (D) inibição do extrato preparado com acetato de etila.

As amostras extraídas com acetona apresentaram baixa atividade, só sendo detectada inibição quando se utilizou 10,0 µL do extrato; já as amostras extraídas com acetato de etila, apresentaram atividade tanto com 5,0 µL quanto com 10,0 µL do extrato, demonstrando ser esse o solvente mais adequado para determinação da atividade antimicrobiana das folhas de *M. urundeuva* (Tabela 9).

**Tabela 9.** Análise qualitativa da formação dos halos de inibição das amostras de folhas de *Myracrodruon urundeuva* extraídas com acetona e acetato de etila, frente ao *Staphylococcus aureus*, através do método de difusão em poços.

Amostras de folhas provenientes de sementes	Acetona		Acetato de etila	
	5,0 µL	10,0 µL	5,0 µL	10,0 µL
Osmocondicionadas frescas	s/a	+	+	+++
Osmocondicionadas secas	s/a	+	+	+++
Não osmocondicionadas frescas	s/a	+	+	+++
Não osmocondicionadas secas	s/a	+	+	+++
Cultivadas <i>in vitro</i> secas	s/a	s/a	s/a	+++

\* s/a (sem atividade); + (baixa atividade); +++ (elevada atividade).

Na literatura é muito variável a quantidade e a concentração dos extratos, e as substâncias utilizadas nos testes para detecção da atividade antibacteriana, contudo, é preciso que os pesquisadores unifiquem os procedimentos utilizando concentrações similares dos extratos para facilitar, ou até mesmo tornar viável, a interpretação e comparação dos resultados obtidos (VALGAS, 2002).

Com relação às amostras, as provenientes de plantas mantidas em casa de vegetação (osmocondicionadas e não osmocondicionadas), independentes de estarem frescas ou secas, apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*, entretanto, as cultivadas *in vitro* apresentaram baixa atividade, o que não deixa claro se tal amostra realmente possui efeito antimicrobiano.

Andresek et al. (2004) afirmou que diferentes amostras de diferentes extratos com compostos de diferentes polaridades freqüentemente apresentam tendência similar da atividade antimicrobiana, já que o extrato vegetal pode conter vários princípios ativos com o mesmo efeito (MÜLLER, 2006).

Baseado nos resultados encontrados através da técnica de difusão em poços, uma nova cromatografia foi realizada, apenas com as amostras que foram extraídas com acetato de etila, pois essas apresentaram atividade antimicrobiana independente da quantidade de extrato utilizado, o que pode estar relacionado a uma maior concentração dos compostos bioativos extraídos.

Através da análise do cromatograma, foi possível visualizar a formação de duas bandas para cada amostra (Tabela 10), entretanto, após a realização da bioautografia não foi detectada atividade inibitória nas bandas.

**Tabela 10.** Valores, em mm, do fator de retenção das amostras de folhas de *Myracrodruon urundeuva* extraídas com acetato de etila, eluídas através do sistema acetato de etila/hexano 3:1 (v/v) e visualizadas sob luz UV a 366 nm.

Amostras de folhas provenientes de sementes	Índice de Retenção (Rf)	
Osmocondicionadas frescas	37	31
Osmocondicionadas secas	33	30
Não osmocondicionadas frescas	36	32
Não osmocondicionadas secas	34	32
Cultivadas <i>in vitro</i> secas	32	28

Apesar de haver diferentes métodos para avaliar a atividade antimicrobiana, seus resultados não podem ser comparados, pois algumas metodologias favorecem a interação droga-microorganismo, propiciando melhores resultados (AHMAD & BEG, 2001).

Portanto, a não atividade das amostras, através da bioautografia, pode estar relacionada à baixa concentração dos compostos após o fracionamento, a dificuldade de difusão do extrato pelo ágar ou a um possível sinergismo dos compostos extraídos que quando separados não apresentam atividade.

No trabalho de Bonati (1980), foi observado que a *Cynara scolymus* apresenta substâncias que se mostram inativas quando analisadas isoladamente, mas quando presentes em uma mistura aumentam sua atividade biológica. Este efeito sinérgico também foi demonstrado por Butterweck et al. (1997) ao analisar a atividade do *Hypericum perforatum*, sendo detectado efeito inibitório apenas para as frações agrupadas, já que o sinergismo atribuído as substâncias aumentaram a biodisponibilidade dos princípios ativos.

O fato de um extrato vegetal poder apresentar vários princípios ativos com o mesmo efeito pode desencadear interações sinérgicas entre os compostos, sendo este grupo de compostos superior em eficácia quando comparado com os compostos isolados (WALRANT, 1990).

Os trabalhos publicados com substâncias bioativas oriundas de plantas envolvidas com a atividade antimicrobiana têm demonstrado que estas substâncias pertencem, principalmente, aos grupos dos compostos fenólicos

(Brantner et al., 1996). Choi et al. (2006) relata que muitas atividades biológicas são devido ao alto teor de fenóis totais, como os taninos e os flavonóides.

Considerando que os compostos bioativos presentes nas plantas resultam, em sua grande maioria, do metabolismo secundário, a técnica do osmocondicionamento pode elevar a concentração desses metabólitos nos tecidos das plantas, ampliando sua atividade biológica (SIMÕES et al., 2004).

Sendo assim, o estudo farmacológico das plantas tidas como medicinais na forma de chás e extratos exige investigações minuciosas em face dos inúmeros fatores que comumente dificultam a comprovação de modelos experimentais, visto que seus extratos são misturas complexas e indefinidas de princípios ativos e outros metabólitos secundários que, além de variarem constantemente na sua composição, podem se potencializar ou se antagonizar mutuamente, bem como, com certa freqüência, não produzir efeito agudo (CALIXTO, 2003).

#### 4.6 Determinação de compostos fenólicos

Ao analisar as concentrações dos compostos fenólicos pôde-se verificar que houve diferença significativa entre as quatro amostras avaliadas, sobressaindo-se as amostras provenientes de sementes osmocondicionadas, as quais apresentaram maior concentração (Tabela 11).

**Tabela 11.** Concentração de compostos fenólicos, após 42 dias de cultivo, nas folhas de *Myracrodruon urundeuva* provenientes de sementes não osmocondicionadas e osmocondicionadas cultivadas em casa de vegetação, cultivadas *in vitro* e nos calos.

Amostras de folhas provenientes de sementes	Compostos fenólicos (mg de EAG/g)
Não osmocondicionadas	103,89 b
Osmocondicionadas	106,02 a
Cultivadas <i>in vitro</i>	50,60 c
Calos	47,11 d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entres si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Alguns autores, como Bussotti et al. (1995) e Jacobson et al. (2005), afirmam que em condições de estresse os vegetais investem em estratégias químicas, como uma tentativa de se ajustar às oscilações metabólicas

desencadeadas, com conseqüente aumento na produção dos compostos fenólicos nos tecidos.

Segundo Dumas et al. (2003), a luz pode influenciar na concentração dos compostos fenólicos, o que confirmaria a maior concentração de compostos fenólicos encontrada nas plantas provenientes do cultivo em casa de vegetação, já que essas ficaram expostas as mudanças climáticas do ambiente, diferente das cultivadas *in vitro* que receberam intensidade luminosa controlada durante todo o período de cultivo.

Estes dados demonstram a grande variabilidade existente na concentração dos compostos fenólicos que a depender do ambiente de cultivo, desempenham inúmeras funções nos vegetais, possuindo dependência direta dos fatores ambientais (BRAVO, 1998; KUTCHAN, 2001).

Todavia, estudos realizados para a determinação dos compostos fenólicos apresentam resultados conflitantes e parece não ser possível estabelecer uma correlação clara entre sua concentração e o “estresse” sofrido, pois nem sempre há alterações no acúmulo desses metabólitos, como ocorre com os alcalóides de *Catharanthus roseus* e os fenóis totais de *Eucalyptus cladocalyx* (WATERMAN & MOLE, 1994; GLEADOW & WOODROW, 2002).

De acordo com Fumagali (2008), os produtos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência das espécies, pois, geralmente, são responsáveis por diversas atividades biológicas, atuando como antibióticos, antifúngicos e antivirais, protegendo as plantas dos patógenos.

Dourado (2006), afirma que os compostos fenólicos são os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas, apresentando grande importância ecológica, uma vez que podem atuar ou representar uma defesa química.

## **5 CONCLUSÃO**

A resposta da aroeira-do-sertão ao condicionamento osmótico é diretamente influenciada pela qualidade das sementes e pelo vigor do lote, afetando, sobretudo, a uniformidade da germinação. Neste, o ambiente e a forma de cultivo dessa espécie influenciam no crescimento inicial das plantas, desencadeando alterações na concentração dos compostos fenólicos, com maior

concentração nas plantas provenientes de sementes osmocondicionadas obtidas através do cultivo *ex vitro*.

As amostras das folhas extraídas com acetato de etila, independente da forma de cultivo, apresentam atividade antimicrobiana com maior ação frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella cholerae-suis*, demonstrando assim, que a *Myracrodruon urundeuva* representa uma fonte de novos fármacos com potencial antibiótico havendo, entretanto, a necessidade de novos estudos que busquem a identificação dos compostos bioativos e o esclarecimento dos seus mecanismos de ação.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier Ireland, v. 74, p. 113-123, 2001.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. S. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 27-38, 2005.

ALVES, et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009

AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 6, n. 30, p. 55-59, 2003.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ANDRADE, L. A. et al. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, estado da Paraíba. **Revista Cerne**, Lavras, v. 11, n. 3, p. 253-262, 2005.

ANDREI, P.; MARÍN, J. A. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock " Adesoto 101" (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, p. 258-267, 2005.

ANDRENESEK, S. B. et al. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom®. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p.181–187, 2004.

ARAÚJO, José Sérgio de. **Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L.** 2004. 41p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - UFLA, Lavras, Minas Gerais.

Arbustos e arvores nativos do Brasil. **Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*)** Disponível em: <[http://www.vivaterra.org.br/arvores\\_nativas.htm#aroeira](http://www.vivaterra.org.br/arvores_nativas.htm#aroeira)> Acesso em 27 set 2009.

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

ARNALDOS, T. L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 315-322, 2001.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 601-639, 1999.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less) D. C. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 52, p. 230-234, 2000.

BANDEIRA, M. A. M. *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira do sertão): constituintes químicos ativos da planta em desenvolvimento e adulta. In: LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa. 1. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 512, 2002.

BARRUETO CID, L. P. B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, Lavras, n. 18, p. 02-07, 1992.

BELTRANO, J.; RONCO, M.; ARANGO, M. Soil drying and rewatering applied at three grain developmental stages affect differentially growth and grain protein deposition in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 2, p. 341-350, 2006.

BICALHO, Beatriz. **Prospecção de antibióticos e biocatalisadores (haloperoxidases e Baeyer-villiger monoxigenases) em microrganismos**. 2003. 278f. Tese (Doutorado em Química) – UNICAMP, Campinas, São Paulo.

BIESKI, Isanete Geraldini Costa. **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT**. 2005. 92f. Monografia (Especialização em Plantas Medicinais) – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

BIRUEL, R. P. et al. Efeitos do condicionamento seguido ou não de secagem em sementes de *Pterogyne nitens* tul. sob estresse. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 119-128, 2007.

BITTENCOURT, M. L. C. et al. Controle da hidratação para o condicionamento osmótico de sementes de aspargo. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, p. 98-104, 2004.

BONATI, A. Problems relating to the preparation and use of extracts from medicinal plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 11, p. 5-12, 1980.

BRANCCINI, A. L., et al. Osmoconditioning effect on soybean seeds germination and vigor. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 19, n. 1, p. 71-79, 1997

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v. 21, p. 1105-1112, 1986.

BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Evaluation of a commercial protocol for *in vitro* multiplication of banana (*Musa sp*) Cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.

BRANDÃO, Geraldo Célio. **Isolamento biomonitorado de substâncias antimicrobianas de *Polygonum spectabil* Mart e determinação da CIM para uma chalcona antimicrobiana**. 2004. 194f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

BRANTNER, A. et al. Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier Ireland, v. 52, p. 119-122, 1996.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BURKHEAD, K. D.; SCHISLER, D. A.; SLININGER, P. J. Bioautography shows antibiotic production by soil bacterial isolates antagonistic to fungal dry rot of potatoes. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 1611-1616, 1995.

BUSSOTTI, F. et al. Morpho-anatomical alterations leaves collected from beech trees (*Fagus sylvatica* L.) growing in conditions of natural water stress. **Environmental and Experimental of Botany**, Amsterdam, v. 35, p. 201-213, 1995

BUTTERWECK, V. et al. Effects of the total extract and fractions of *hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. **Pharmacopsychiatry**, Stuttgart, v. 30, p. 117-124, 1997

CALIXTO, J. B. **Medicamentos Fitoterápicos**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais - sob a ótica da Química Medicinal Moderna. **Argos Editora Universitária**, Chapecó, p. 298-315, 2001.



CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, São Paulo, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMARGO, J. T. et al. Efeito do escuro e do seccionamento de internódios do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, na calogênese *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, p. 81-83, 1999.

CAPALDI, Flávia Regina. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. Don. "Elegans" cultivados *in vitro*: análises bioquímicas e relações entre reguladores vegetais**. 2002. 65f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, São Paulo.

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

CHOI, Y. M. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT – Food Science and Technology**, Elsevier, v. 39, n. 7, p. 756-761, 2006.

COIMBRA, Raul. **Manual de Fitoterapia**. 2 ed. Belém: CEJUP, 1994. In: SÁ, Roberto Araújo. **Constituintes químicos da Madeira-de-lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra fungos, bactérias e insetos**. 2008. 173f. Tese (Doutorado em Química) – UFPE, Recife, Pernambuco.

COSTA, C. J.; VILLELA, F. A. Osmotic conditioning of beet seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 1, 2006.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S. **Seleção de auxinas para a indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* visando o estabelecimento de cultivo de células em suspensão**. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS E 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23. 2. 2005. Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p. 656.

COSTA, A. S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 68-72, 2007

COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Revista Conceitos**, João Pessoa, v. 5, p. 77-85, 2004.

DANTAS, Joana D'arc Pereira. **Contribuição científica à medicina tradicional dos Tapebas do Ceará: *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. – (aroeira-do-sertão)**. 2003. Monografia (Graduação em Química) – UECE, Fortaleza, Ceará

DEL GIUDICE, Marcos Paiva. **Condicionamento osmótico de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1996. 130f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – UFV, Viçosa, Minas Gerais.

DELGADO, Liliana Ferreira. **Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileira de *Eugenia***. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo.

DHAR, U.; JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Report**, New York, v. 24, p. 195-200, 2005.

DORNELLES, M. C.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. Germinação de diásporos recém-colhidos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) ocorrente no cerrado do Brasil Central. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 399-408, 2005.

DOURADO, Rodrigo Strohmayr. **Isolamento de compostos secundários em extratos de caules e folhas de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson (Clusiaceae)**. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

DRUMOND, M. A. et al. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga**. In: Workshop de avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. EMBRAPA/CPATSA, Petrolina, 2000.

DUMAS, Y. et al. Review: Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, p. 369-382, 2003.

ELLOF, J. N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier Ireland, v. 60, p. 1-8, 1998.

ESAM, ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE MOSSORÓ. **Parque Zoobotânico**. Disponível em: <<http://www.esam.br/zoobotanico/vegetais/rozeira.htm>> Acesso em 24 jan 2007.

FARIA, Janine Tavares Camargo. **Calogênese e organogênese em porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd., Borkh)**. 1996. 51f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) – UFPel, Pelotas, Rio Grande do Sul.

FELIX, W. P. et al. Caracterização bioquímica de callus cotiledonares de *Glycine Max* (L.) Merril Var. RCH-SERIDÓ. **Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Disponível em: <<http://sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Estendido/018.pdf>> 2002.

FESSEL, S. A.; VIEIRA, R. D.; RODRIGUES, T. J. D. Germinação de sementes de alface submetidas a condicionamento osmótico durante o armazenamento. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p.73-77, 2002.

FILHO, J. M.; KIKUTI, A. L. P. Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor e desempenho das plantas em campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 165-169, 2008

FLORES, R. et al. Efeito de concentrações de 2,4-D, picloram e BAP na indução de calos e regeneração de plantas de morangueiro cv. Vila Nova. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 8, n. 2, p. 87-91, 2003.

FLORES, Regina. **Cultura de tecidos e produção de  $\beta$ -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE)**. 2006. 168f. Tese (Doutorado em Agronomia) – UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins, **Journal of Biology and Chemistry**, Bethesda, v. 73, p. 627-650, 1927.

FORTES, Gerson Renan de Luces **Calogênese e organogênese 'in vitro' de macieira (*Malus spp.*) afetada por fatores físicos, químicos e biológicos**. 1992. 163f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – UFV, Viçosa, Minas Gerais.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC, 2001. cap. 7, p. 105-124

FANK-DE-CARVALHO, S. M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L. F. (Amaranthaceae). **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 377-390, 2005.

FULLER, Thanise Nogueira. **Caracterização fenotípica, fitoquímica e molecular de populações de *Elionurus sp.* Humb. & Bompl ex Willd (capim-limão)**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008

GAO, W. Y.; FAN, L.; PAEK, K. Y. Yellow and red pigment production by cell cultures of *Cathamus tinctorius* in a bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Springer Netherlands, v. 60, p. 95-100, 2000.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. **Apresentação: O instituto do Milênio do Semi-Árido**. In: Recursos Genéticos do Semi-árido Nordeste. IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-Árido), Recife, v. 5, p. 7, 2006.

GLEADOW, R. M.; WOODROW, I. E. Defense chemistry of cyanogenic *Eucalyptus cladocalyx* seedlings is affected by water supply. **Tree Physiology**, Canadá, v. 22, p. 939-945, 2002.

GONZALEZ TORRES, D. M. Catálogo de plantas medicinales y alimenticias y utilizas usadas en Paraguay. Asunción: Litocolor (1986). In: SÁ, Roberto Araújo. **Constituintes químicos da Madeira-de-lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra fungos, bactérias e insetos**. 2008. 173f. Tese (Doutorado em Química) – UFPE, Recife, Pernambuco.

GOODALL, R. R.; LEVI, A. A. A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. **Revista Nature**, London, v. 158, p. 675-676, 1946.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p. 99-170, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, v. 1, p. 183-242, 1998

GUERRA, Carla Renata Silva Baleroni. **Conservação genética ex situ de populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. em sistema silvipastoril**. 2008. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia) – UNESP, Ilha Solteira, São Paulo.

GUIMARÃES, Renato Mendes. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 180f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

HEYDECKER, W.; COOLBEAR, P. Seed treatments for improved performance survey and attempted prognosis. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 5, p. 353-425, 1977.

HILHORST, H.; LEPRINCE, O. **Germination: Topics I to IV**. In: Simpósio Curso de Fisiologia de Sementes, UFLA/WAV, Lavras, 1998.

HOELZEL, Solange Cristina da Silva Martins. **Estudo fitoquímico, morfo-histoquímico e atividade antimicrobiana da casca da raiz de *Waltheria douradinha* ST. Hill**. 2001. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Search for new antifungal compounds from higher plants. **Journal Pure and Applied Chemistry**, IUPAC (Grã-Bretanha), v. 66, p. 2231-2234, 1994.

HUIMEI, W. Z. et al. Assessment of factors affecting in vitro shoot regeneration from axillary bud explant of *Camptotheca acuminata*. **Journal of Forestry Research**, Springer Northeast Forestry University, v. 16, p. 52-54, 2005.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Ecosistemas Brasileiros: Caatinga (A Caatinga é um ecossistema único com ocorrência de rica vegetação em região semi-árida)**. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/caatinga.htm>.> Acesso em 02/11/2007.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista oficial das espécies da flora ameaçadas de extinção**. Diário Oficial. Portaria 006/92-N de 15 de janeiro de 1992. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm>> Acesso em 23/07/2006

JACOBSON, T. K. B. et al. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron sp.*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.

KHAWAR, K. M. et al. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. **Journal Botany**, Turk, v. 28, p. 421-426, 2004.

KILIKIAN, B. V. **Introdução à cromatografia**. In: PESSOA, J. R., A.; KILIKIAN, B. V. (org). **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. São Paulo: Manole, Barueri, p.167-175, 2005.

KILLIAN, S.; LEIVA, M. Efecto de sales de sodio y potasio sobre la germinación de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) y albahaca, (*Ocimum basilicum* L.). **Revista del CIZAS**, Argentina, v. 6, p. 40-47, 2005.

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

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

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, Germany, v. 125, p. 58-60, 2001.

LARSEN, S. U. et al. The influence of seed vigour on field performance and the evaluation of the applicability of the controlled deterioration vigour test in oil seed rape and pea. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 26, p. 627-641, 1998.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Universidade Federal de Pernambuco: Universitária, 2003. 804p.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymology**, New York: Academic Press, v. 148, p. 350-385, 1987.

LIMA, C. A. A., et al. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (Cnsl) dos clones de Cajueiro-anão-precoce Ccp-76 e Ccp-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 358-362, 2000.

LIMA, E. O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p. 481-501, 2001.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

LOGGINI, B. et al. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. **Plant Physiology**, Germany, v. 119, p. 1091-1099, 1999.

LOPES, H. M. et al. Germinação e vigor de sementes de cebola (*Allium cepa* L.) influenciados pelo período de temperatura de condicionamento osmótico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 18, n. 2, p.173-179, 1996.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. de. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 1. ed. Nova Odessa, São Paulo: Plantarum, 2002. 512p

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, São Paulo: Plantarum. 1992.

LU, M. C. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 107, p. 64-69, 2005.

LUCZKIEWIEZ, M.; ZÁRATE, R.; DEMBINSKA-MIGAS, W. M. Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. **Plant Science**, Limerick, v. 163, p. 91-100, 2002.

LUÍS, Ricardo Miguel Fortes Cardoso Barata. **Resposta de *Jatropha curcas* L. ao déficit hídrico. Caracterização bioquímica e ecofisiológica**. 2009. 62f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) – Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.

MACIEL, Anna Lygia de Rezende. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** 2001. 60f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

MALLAVARAPU, G. O. Contribution of medicinal plants to modern medicine. **Journal of Medicinal Plants to Modern Medicine**, p. 572 -578, 2001.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária 2000.

MELO, A. A. M.; ALVARENGA, A. A. de. Shading of 'Pacifica White' *Catharanthus roseus* (L.) G. Don plants with colored nets: vegetative development. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, 2009.

MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. Anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. **Fitoterapia**, Milano, v. 57, p. 55-57, 1986.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MONTEIRO, J. M. et al. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005

MORAES, João Paulo Saraiva. **Estudos sobre a propagação in vitro da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão)**. 2006. 116f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – UFC, Fortaleza, Ceará.

MOREIRA, M. S. A. et al. **Avaliação da atividade espasmolítica da fase aquosa dos extratos etanólicos de plantas do cariri**. In: XIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UVFC. 1994.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, 2000.

MÜLLER, Juliane Borba. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva das folhas da *Luehea divaricata* Martius**. 2006. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437–497, 1962.

MURRAY, G. A.; SWENSEN, J. B.; BEAVER, G. Emergence of spring- and summer-planted onions following osmotic priming. **HortScience**, Alexandria, v. 27, p. 409-410, 1992.

NASCIMENTO, G. C. F. et al. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 247-256, 2000

NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards) **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard**. 8. ed. NCCLS document M2-A8, Wayne, Pennsylvania, 2003.

NERY, M. C. et al. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões sementes de *Tabebuia serratifolia* (VAHL) NICH. **Revista Cerne**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2008

NOBRE-JÚNIOR, H. V. et al. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochemical Research**, Springer Netherlands, v. 34, p. 066–1075, 2009.

NOGUEIRA, Raírys Cravo. **Propagação in vitro, análise anatômicas e bioquímicas de Murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss)**. 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

NOGUEIRA, R. C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

NUNES, Y. R. F. et al. Ecological aspects of aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão - Anacardiaceae): Phenology and seed germination. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 233-243, 2008

OLIVEIRA, A. C. P. et al. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier Ireland, v. 102, p. 465-469, 2005.

OLIVEIRA, S. A.; MORAES, M. L. T.; BUZETTI, S. Aspectos nutricionais da variação genética em progenies de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob condições de cultivo. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 29, n. 1/2, p. 03-14, 2002

OLIVEIRA, D. C. et al. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: *Psyllidae*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 657-667, 2006.

OLIVEIRA, M. M. **Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal**. Revista Boletim de Biotecnologia, Sociedade Portuguesa, n. 66, cap. Biotecnologia Molecular: Avanços e Aplicações, p. 22-27, 2000.

OPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier. 2000. 254 p.

PACHECO, M. V. et al. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (ANACARDIACEAE). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 359-367, 2006.



PALÚ Ednamar Gabriela. **Indução *in vitro* de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L.** 2002. 47f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

PASQUAL, M. **Meios de cultura.** (Textos Acadêmicos), Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.

**Plantas do Cerrado.** Disponível em <<http://www.biologo.com.br/plantas/fichas/aroeira.html>>. Acesso em 27 set 2009.

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow EX Roemer & Schultes DC E *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (Unha de gato)** 2004. 208f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

PEREIRA, M. D. et al. Germination and vigor of carrot seeds primed in moistened paper and aerated solution. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 30, n. 2, p. 137-145, 2008

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos de regeneração de plantas *in vitro*. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, Ano IV, n. 25, p. 44-48, 2002.

PINTO, Cristiana da Purificação. **Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero *Lippia* do Semi-árido da Bahia.** 2008. 118f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UEFS, Feira de Santana, Bahia.

POSSE, S. C. P. et al. Efeitos do condicionamento osmótico e da hidratação na germinação de sementes de pimentão (*Capsicum annuum* L.) submetidas às baixas temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 123-127, 2002

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**. Viçosa, v. 26, n. 4, p. 485 – 492, 2002a.

QUEIROZ, C. G. S; GARCIA, Q. S.; LEMOS FILHO, J. P. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14 p. 59-63, 2002b.

REESE, R. E.; BETTS, R. F.; GUMUSTOP, B. **Manual de Antibióticos**, 3. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica. 2002. 719 p.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 498-500, 2007.

SÁ, Roberto Araújo. **Constituintes químicos da Madeira-de-lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra fungos, bactérias e insetos.** 2008. 173f. Tese (Doutorado em Química) – UFPE, Recife, Pernambuco.

SABÁ, R. T. et al. Micropropagação do jaborandi. **Revista Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2002.

SAHOO, Y.; PATTAIK, S. K.; CHAND, P. K. Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 69, n. 1/2, p.85-98, 1997.

SANTANA, J. R. F.; BRITO, A. L.; BELLINTANI, M. C. **Cultura de tecidos vegetais? Micropropagação e conservação de germoplasma do semi-árido.** In: IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-Árido). Recife, v. 5, cap. 4, p. 125-126, 2006.

SANTOS, Suikinai Nobre. **Determinação da atividade antifúngica de biomoléculas obtidas do metabolismo secundário de rizobactérias em linhagem de *Candida albicans*.** 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UEFS, Feira de Santana, Bahia.

SANTOS, M. C. A. et al. Condicionamento osmótico de sementes – Revisão de literatura. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 2, p. 01-06, 2008

SATO, A. Y. et al. Micropropagação de *Celtis sp.*: controle da contaminação e oxidação. **Revista Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SILVA, G. S.; ASSIS, M. B.; BARBOSA, W. L. R. Investigação fitoquímica e microbiológica da espécie *Ananas erectifolius* (curauá). **Revista Científica**, UFPA – Pará, n. 1, p. 1-5, 2001;

SILVA, L. M. M.; RODRIGUES, T. J. D.; AGUIAR, I. B. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, p. 691-697, 2002.

SILVA, L. M. de M. et al. Estresse hídrico e condicionamento osmótico na qualidade fisiológica de sementes de *Cnidioscolus juercifolius*. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 66-72, 2005.

SILVA, Milena Dutra. **Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco.** 2008. 74f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – UFRPE, Recife, Pernambuco.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/UFSC. Florianópolis. 2004.

SOARES, Gustavo de Araújo. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn.]**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

SOUZA, Tatiana Maria. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae)**. 2007. 171f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UNESP, Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, São Paulo.

SOUZA, S. M. C. et al. Antiinflammatory and Antiulcer Properties of Tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. **Phytotherapy Research**, Interscience Wiley, v. 21, p. 220–225, 2007.

STREITH, N. M. et al. The Chlorophylls. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005

TEÓFILO, E. M. et al. Qualidade fisiológica de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* ALLEMÃO) em função do tipo de embalagem, ambiente e tempo de armazenamento. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2004.

THOMAS, T. D.; PHILIP, B. Thidiazuron-induced light frequency shoot organogenesis from leaf-derived callus of medicinal climber, *Tylophora indica* (Burn F.) Merril. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Springer Berlin / Heidelberg, v. 41, p. 124-128, 2005.

TIWARI, V.; TIWARI, K. N.; SINGH, B. D. Comparative studies of cytokinin on in vitro propagation of *Bacopa monniera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Springer Netherlands, v. 66, p. 9-16, 2001.

TORRES, A. T. **Glossário de biotecnologia vegetal**. 2000. Brasília: Embrapa Hortaliças. 128p.

TROVÃO, D. M. B. M. et al. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 3, p. 307-311, 2007.

VALGAS, Cleidison. **Avaliação de métodos de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais**. 2002. 91f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – UFSC, Florianópolis, Santa Catarina.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P. M.; HARBONE, J. D. (eds), **Methods in Plant Biochemistry**, Academic Press, London, 1991. p. 47.69.

VASCONCELOS-FILHO, Sebastião Carvalho. **Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica de calos de murici [*Bysonima verbascifolia* (L.) Rich, ex Juss.]** 2008. 82f. Tese (Mestrado em Botânica) – UFV, Viçosa, Minas Gerais.

VENKATAIAH, P. et al. Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L. **Journal of Plant Biotechnology**, Bristol, v. 5, n. 4, p. 245-250, 2003.

VIANA, G. S. B. et al. **Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.): estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico**, 2. ed. Revisada e Ampliada. Edições: UFC. Fortaleza. 1995.

VIRGENS, I. O. et al. **Avaliação do comportamento fisiológico de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Submetidas a estresse hídrico**. In: 59º Congresso nacional de Botânica, 2008, Natal. **Anais...** Natal: JC Record's Serviços Fonográficos, 2008.

WALRANT, P. V. F. **Como detectar ações farmacológicas de extratos vegetais em modelos experimentais “in vivo”**. XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. João Pessoa: Programa de Resumos, 1990.

WANLI, Z.; LEIHONG, L.; PEREZ, S. C. J. G. A. Pré-condicionamento e seus efeitos em sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 146-153, 2001.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1994. 238p.

WHITHAM, F. H.; BLAYDES, D. F.; DEVLIN, R. N. **Experiments in plant physiology**. D. van Nostrame Company, New York, 1. ed. 1971. p. 55-88.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. **Micropropagação e enxertia in vitro de espécies florestais**. In: Borém, A. (ed) Biotecnologia Florestal. Suprema Gráfica e Editora: Viçosa. 2007, p. 53-74.

YU, K. et al. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier B.V, v. 23, p. 53-56, 2005.

ZAICOVSKI, C. B. et al. Effects of mechanical injury, temperature decreasing, and 1-MCP on the post-harvest metabolism of Legacy broccoli. **Ciência e Tecnologia & Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 840-845, 2008

ZUANAZZI, J. A. S. **Flavonóides**. Farmacognosia - Da planta ao medicamento. 3. ed. Florianópolis:UFSC. 1999. 197-220p. In: SILVA, Milena Dutra. **Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco**. 2008. 74f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – UFRPE, Recife, Pernambuco.

## ANEXO

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA

- Estabelecimento *in vitro*

## Plântulas formadas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.209595	0.209595	2.741	0.0997
erro	165	12.616753	0.076465		
Total	166	12.826347			
CV (%) =			30.18		

## Comprimento da parte aérea

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	290.986736	290.986736	573.272	0.0000
erro	142	72.077639	0.507589		
Total	143	122.493056			
CV (%) =			19.97		

## Número de folhas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	25.840278	25.850278	37.964	0.0000
erro	142	96.652778	0.680653		
Total	143	122.493056			
CV (%) =			22.8		

- Condicionamento osmótico

## Germinação

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	6	6.297725	1.049621	3.785	0.0103
erro	21	5.823918	0.277329		
Total	27	12.121643			
CV (%) =			7.37		

## Tempo médio

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	6	0.866277	0.144379	2.966	0.0294
erro	21	1.022307	0.048681		
Total	27	1.888584			
CV (%) =			9.21		

## IVG

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	6	0.028960	0.004827	3.712	0.0113
erro	21	0.027303	0.001300		
Total	27	0.056262			
CV (%) =			8.54		

## CUG

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	6	2.059274	0.343212	5.992	0.0009
erro	21	1.202875	0.057280		
Total	27	3.262149			
CV (%) =			42.12		

- Cultivo em casa de vegetação
  - Análise com 21 dias de cultivo

## CPA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.115052	0.115052	0.518	0.4754
erro	46	10.219396	0.222161		
Total	47	10.334448			
CV (%) =			22.31		

## Peso fresco (cpa)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.000046	0.000046	0.453	0.5044
erro	46	0.004675	0.000102		
Total	47	0.004721			
CV (%) =			34.05		

## Peso seco (cpa)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.000005	0.000006	0.768	0.3853
erro	46	0.000281	0.000006		
Total	47	0.000285			
CV (%) =			39.92		

- Análise com 42 dias de cultivo

## CPA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.0052669	0.052669	0.072	0.7898
erro	46	33.704079	0.732697		
Total	47	33.756748			
CV (%) =			18.48		

## Peso fresco (cpa)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.001210	0.001210	0.287	0.5946
erro	46	0.193809	0.004213		
Total	47	0.195019			
CV (%) =			34.03		

## Peso seco (cpa)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.000133	0.000133	0.550	0.4620
erro	46	0.011149	0.000242		
Total	47	0.011282			
CV (%) =			34.98		



## Raiz

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	1.104133	1.104133	0.343	0.5610
erro	46	148.120633	3.220014		
Total	47	149.224767			
CV (%) =			9.85		

## Peso fresco (raiz)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.000001	0.000001	0.002	0.9665
erro	46	0.026368	0.000573		
Total	47	0.026369			
CV (%) =			42.90		

## Peso seco (raiz)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.000184	0.000184	2.354	0.1318
erro	46	0.003598	0.000078		
Total	47	0.003782			
CV (%) =			41.13		

## CHLA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.018260	0.018260	8.019	0.0473
erro	4	0.009108	0.002277		
Total	5	0.027368			
CV (%) =			21.91		

## CHLB

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.000869	0.000869	8.121	0.0464
erro	4	0.000428	0.000107		
Total	5	0.001297			
CV (%) =			20.11		

## CAR

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.001072	0.001072	6.771	0.0599
erro	4	0.000633	0.000158		
Total	5	0.001705			
CV (%) =			19.12		

## Compostos fenólicos

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	3155.568500	1051.856167	1.0E+0009	0.0000
erro	0	-1.7763568E-0015	0.00000000E+0000		
Total	8	3155.568500			
CV (%) =			0.00		

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)