

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

***Verbena litoralis* KUNTH (VERBENACEAE)  
MICROPROPAGAÇÃO, ESTAQUIA E ANÁLISE DE  
FLAVONÓIDES E CUMARINAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Rosiana Bertê**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

*Verbena litoralis* KUNTH (VERBENACEAE)  
**MICROPROPAGAÇÃO, ESTAQUIA E ANÁLISE DE  
FLAVONÓIDES E CUMARINAS**

**Rosiana Bertê**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Melânia Palermo Manfron**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-graduação em Agrobiologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de  
Mestrado**

***Verbena litoralis* KUNTH (VERBENACEAE)  
MICROPROPAGAÇÃO, ESTAQUIA E ANÁLISE DE FLAVONÓIDES  
E CUMARINAS**

elaborada por  
**Rosiana Bertê**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Agrobiologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Melânia Palermo Manfron, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. – UFSM**  
(Presidente/Orientadora)

**Michel Mansur Machado, Prof. Dr. – UNIPAMPA**

**Hilda Hildebrand Soriani, Dr<sup>a</sup>. – UFSM**

Santa Maria, 31 de julho de 2013

“Tentar e falhar é pelo menos aprender. Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda do que poderia ter sido”  
(Geraldo Eustáquio)

Dedico  
à minha maravilhosa mãe Marilete e a Rodrigo  
Marchionatti, com amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela força, coragem e por me guiar todos os dias de minha vida.

À minha mãe, por me dar a vida, por me ensinar a lutar, pelos valores, por ser minha grande incentivadora, amiga e por me apoiar sempre, compartilhando alegrias e dificuldades.

Ao meu amor Rodrigo pelo amor, paciência, amizade, conselhos companheirismo e compreensão nos momentos felizes e difíceis em que estivemos longe.

À minha orientadora Melânia Palermo Manfron, pela amizade, apoio, paciência, dedicação e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Juçara T. Paranhos pelos ensinamentos, amizade sinceridade, apoio, paciência, humildade e por me compreender nos momentos necessários.

À amiga incansável e guerreira Hilda Hildebrand Soriani pelo apoio, amizade, disponibilidade e auxílio nos experimentos e na concretização deste trabalho. Minha eterna gratidão e amizade!

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, que sempre apoiaram e ajudaram muito para que esta pesquisa se concretizasse. Agradeço especialmente às amigas Lisiane e Bruna pelo companheirismo, amizade, conforto, pela parceira de trabalho e de muitas alegrias. Para sempre lembrarei de vocês com muito carinho e sentirei imensa saudade! Aos demais colegas do laboratório, Alberi, Gabriela, Simone, Tiele e à laboratorista Tânia, pelo companheirismo, amizade e auxílio nos experimentos. Vocês foram muito importantes no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, Aline, Rafaela, Tiago, Daiane, Queila, Luíza, Rosana, a laboratorista Vera, e especialmente a Amanda Gindri e Rachel pela amizade, paciência e ensinamentos. A todos vocês agradeço pelos momentos de descontração, apoio e aprendizagem.

À Juliana e Dani que foram amigas e companheiras de viagem.

À Marlene e Jair que me acolheram como filha durante todo período de estudos e também aos seus filhos e a Suzana pelos momentos de descontração e incentivo.

Aos demais familiares e amigos que de alguma forma contribuíram, apoiaram minha escolha e torceram para que este sonho se tornasse real.

À Universidade Federal de Santa Maria, em especial aos professores, funcionários e colegas do programa de Pós-graduação em Agrobiologia, pelos ensinamentos e convivência.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento das pesquisas.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### *Verbena litoralis* KUNTH (VERBENACEAE) MICROPROPAGAÇÃO, ESTAQUIA E ANÁLISE DE FLAVONÓIDES E CUMARINAS

AUTORA: Rosiana Bertê  
ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de julho de 2013

A espécie *Verbena litoralis* Kunth é conhecida popularmente como erva-de-pai-caetano ou gervãozinho do campo, e no sul do Brasil é utilizada como desintoxicante, antifebril e em diarreias. O objetivo do presente trabalho foi estudar a propagação vegetativa, através da micropropagação e estaquia de *V. litoralis*, avaliar os parâmetros fisiológicos como fluorescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos e identificar os compostos fitoquímicos presentes no extrato das plantas obtidas *in vitro* após a aclimatização das mesmas. O experimento de micropropagação foi realizado utilizando MS completo, acrescido de 0,1 ml L<sup>-1</sup> de fungicida (Carbendazim®), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e quatro combinações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA): 0; 1,0; 2,0; 4,0 e 0; 0,1; 0,2; 0,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, e presença ou ausência de carvão ativado (1 mg L<sup>-1</sup>). As plantas obtidas *in vitro* foram transferidas para copos descartáveis e mantidas em sala de crescimento durante todo o experimento com temperatura de 25° ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas. A análise fitoquímica no extrato das partes aéreas e raízes de *V. litoralis*, obtido por maceração hidroetanólica, foi realizada por CLAE e detectou porcentagens de rutina próximos de 4,76%, quercetina 9,18% e cumarina 0,031%. Na micropropagação, a ausência de BAP e ANA, proporcionou uma porcentagem de 21% de plantas formadas. As plantas aclimatizadas apresentaram desenvolvimento homogêneo já que todas foram submetidas ao mesmo tipo de substrato e temperatura.

**Palavras-chave:** Verbena; Cultivo *in vitro*; Estaquia; Fluorescência; Metabólitos secundários.



## ABSTRACT

Master Degree Dissertation  
Post-Graduation Course in Agrobiologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

*Verbena litoralis* Kunth (VERBENACEAE)  
**MICROPROPAGATION, CUTTING AND ANALYSIS AND  
FLAVONOIDS AND CUMARINS**

AUTHOR: Rosiana Bertê  
ADVISOR: Melânia Palermo Manfron  
Date and Place of Defense: Santa Maria, July 31, 2013.

The species *Verbena litoralis* Kunth is popularly known as wort or father-caetano gervãozinho field, and southern Brazil is used as detoxifying, antipyretic and diarrhea. The aim of this study was to vegetative propagation through cuttings and micropropagation of *V. litoralis*, evaluate the physiological parameter settings as chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments and identify the phytochemical compounds present in the extracts of plants obtained in vitro after acclimatization of the same. The experiment was conducted using micropropagation complete MS plus 0.1 ml L<sup>-1</sup> fungicide (carbendazim®), 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 6.0 g L<sup>-1</sup> agar and four combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA): 0, 1.0, 2.0, 4.0 and 0, 0.1, 0.2, 0.4 mg L<sup>-1</sup>, respectively, and presence or absence of coal enabled (1 mg L<sup>-1</sup>). The plants obtained in vitro were transferred to disposable cups and kept in a growth chamber throughout the experiment with a temperature of 25 ± 2 ° C and 16 hours photoperiod. The phytochemical analysis of the extract of the aerial parts and roots of *V. litoralis*, obtained by maceration hydroethanol was performed by HPLC and detected percentages of near 4.76% rutin, quercetin 9.18% and 0.031% coumarin. In micropropagation, the absence of BAP and NAA led to a percentage of 21% of grown plants. The acclimatization showed homogeneous development since all were subjected to the same substrate type and temperature.

**Keywords:** Verbena; Cultivation *in vitro*; Cutting; Fluorescence; Secondary metabolites.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Respostas obtidas <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) completo, 30 g L <sup>-1</sup> de sacarose, testando-se quatro combinações de fitorreguladores, na ausência ou presença de carvão ativado (1,0 mg L <sup>-1</sup> ).....	41
Tabela 2 -	Parâmetros fisiológicos de crescimento, de fluorescência da clorofila <i>a</i> e pigmentos fotossintéticos em plantas micropropagadas de <i>V. litoralis</i> .....	46
Tabela 3 -	Porcentagem de brotos nas estacas apicais e basais submetidas a doses de ácido indolil butírico (AIB) por três horas antes do cultivo em diferentes substratos, sendo as misturas destes na proporção 2:1. Usou-se estacas herbáceas sem folhas com 12 cm de comprimento e espessura padronizada em 2 a 5 mm de diâmetro. Cada tratamento teve três repetições e seis estacas por repetição.....	52
Tabela 4 -	Dosagem de Flavonóides, Polifenóis e Cumarinas em extratos de partes aéreas e raízes de <i>V. litoralis</i> oriundas da aclimatização.....	55
Tabela 5 -	Teor de Flavonóides e Cumarinas em extratos de partes aéreas e raízes de <i>V. litoralis</i> oriundas da aclimatização.....	56

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Plantas de *Verbena litoralis* crescendo naturalmente no *campus* da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS. A: vista geral em período vegetativo; B: período reprodutivo; C: inflorescência..... 23
- Figura 2 - Plantas de *Verbena litoralis* mantidas em casa de vegetação, Departamento de Biologia, CCNE, UFSM, Santa Maria-RS..... 31
- Figura 3 - Plantas de *Verbena litoralis* na fase de aclimatização em sala de crescimento, sob temperatura controlada de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas utilizando-se lâmpadas fluorescentes brancas (RFA de  $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A: Fase inicial da aclimatização, B: Plantas aclimatizadas aos 60 dias após a transferência para substrato plantmax..... 34
- Figura 4 - Curva analítica do padrão Ácido Gálico para Polifenóis nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,02 e 0,03  $\text{mg mL}^{-1}$  demonstrando a relação linear entre a concentração e a absorbância deste padrão apresentando Coeficiente de Correlação (r) de 0,99..... 36
- Figura 5 - Curva analítica do padrão Quercetina para Flavonóides nas concentrações de 0,002; 0,006; 0,01; 0,014 e 0,018  $\text{mg mL}^{-1}$  apresentando Coeficiente de Correlação (r) de 0,99..... 37
- Figura 6 - Curva analítica do padrão Cumarina nas concentrações de 0,80; 1,55; 3,25; 6,25 e 12,50  $\text{mg mL}^{-1}$  demonstrando a relação linear entre a concentração e a absorbância deste padrão apresentando Coeficiente de Correlação (r) de 0,99..... 38
- Figura 7 - Número de folhas e raízes de plantas completas oriundas da micropropagação de *Verbena litoralis* em MS completo, com 4 doses de fitorreguladores (BAP/ANA) e 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de carvão ativado mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas (Radiação Fotossinteticamente Ativa de  $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , lâmpadas fluorescentes brancas), e  $T^\circ 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ..... 43
- Figura 8 - Micropropagação de *Verbena litoralis* em meio MS completo, suplementado com 0,0 + 0,0, 1,0 + 0,1; 2,0 + 0,2; 4,0 + 0,4  $\text{mg L}^{-1}$  de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), respectivamente, 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose, 6  $\text{g L}^{-1}$  de ágar e presença e ausência de 1  $\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado. A: plantas completas formadas a partir de segmentos nodais. B: Formação de calo na base do explante C: Explantes oxidados. D: Explantes contaminados..... 45
- Figura 9 - Curvas de luz para Taxa de Transporte de Elétrons (ETR,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  - A) e eficiência fotoquímica efetiva (Y(II) - B) nos três

	grupos de plantas de <i>V. littoralis</i> micropropagadas. RFA = Radiação Fotossinteticamente Ativa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).....	47
Figura 10 -	Estacas apical e basal mergulhadas em ácido-indolbutírico (AIB), nas concentrações 0; 1200 e 2400 g L <sup>-1</sup> durante três horas e transferidas para bandejas contendo substratos Plantmax®; Plantmax®:Vermiculita; Plantamax®:Areia e Plantamax®:Casca de arroz, na proporção 2:1. As estacas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas utilizando lâmpadas fluorescentes brancas (RFA de ~36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).....	54
Figura 11 -	Curva analítica do Ácido Gálico para Polifenóis e Flavonóides demonstrando a relação linear entre a concentração e a absorbância deste padrão apresentando Coeficiente de Correlação (r) de 0,99.....	57
Figura 12 -	Curva analítica do padrão Cumarina doseado demonstrando a relação linear entre a concentração e a absorbância deste padrão apresentando Coeficiente de Correlação (r) de 0,99.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorção
ANA	Ácido naftalenoacético
ATP	Adenosina Trifosfato
AIB	Ácido-indolbutírico
BAP	6-Benzilaminopurina
B	Coefficiente linear
C	Concentração
Carot./Chl	Carotenoide/Clorofila total
C18	Fase octadecilsilica
Chl a	Clorofila <i>a</i>
Chl b	Clorofila <i>b</i>
Chl total	Clorofila total,
Chl <i>a/b</i>	Razão clorofila <i>a</i> e <i>b</i>
CL	Dose Letal Mediana
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ETR <sub>1500</sub>	Taxa de transporte de elétrons máxima
F <sub>o</sub>	Fluorescência inicial
F <sub>m</sub>	Fluorescência máxima
F <sub>v</sub>	Fluorescência variável (F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> )
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	Eficiência fotoquímica máxima
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Média
K	Coefficiente angular
MF	Massa Fresca
MS	Murashige e Skoog
MeOH	Metanol
Milli-Q	Água deionizada <i>Millipore Corporation</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato
N <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido
PA	Parte aérea
PSII	Fotossistema II

PVC	Policloreto de polivinila
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa
V	Volume do extrato de folhas (mL)
YII <sub>125</sub>	Eficiência fotoquímica efetiva máxima

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Família Verbenaceae.....	19
2.1.1 <i>Verbena litoralis</i> Kunth.....	21
2.2 Micropropagação.....	23
2.3 Metabólitos Secundários.....	25
2.3.1 Flavonóides.....	27
2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Micropropagação.....	30
3.2 Aclimatização das plantas obtidas <i>in vitro</i> .....	34
3.3 Propagação vegetativa por estacas.....	35
3.4 Determinações fitoquímicas em <i>Verbena litoralis</i> .....	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
4.1 Micropropagação.....	40
4.2 Propagação vegetativa <i>ex vitro</i> através da estaquia.....	51
4.3 Determinações fitoquímicas em <i>V. litoralis</i> .....	54
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A biotecnologia tem atraído a atenção entre as novas tecnologias, e tem provado ter potencial para gerar riquezas e influenciar setores importantes da economia. Esta área tem influenciado significativamente a saúde, produção e processamento de alimentos, agricultura, florestas, proteção do meio ambiente, e produção de materiais e substâncias químicas (GAVRILESCU; CHISTI, 2005).

Dentro da área biotecnológica, a cultura de tecidos se destaca como uma importante ferramenta para a preservação de espécies vegetais, propagação comercial de plantas, e contribui com estudos bioquímicos servindo como uma alternativa para a produção *in vitro* de metabólitos secundários (ABREU, 1998; FUMAGALI et al., 2008).

As etapas de crescimento, desenvolvimento e estádios fenológicos das espécies vegetais, podem causar alterações bioquímicas e fisiológicas no metabolismo primário e secundário modificando a síntese e concentração das substâncias ativas (TAIZ; ZEIGER, 2004). A utilização de plantas medicinais na medicina tradicional torna importante o conhecimento das substâncias biologicamente ativas presentes nas espécies, incluindo aspectos qualitativos e quantitativos.

A presença dos metabólitos secundários nas plantas fez com que estas fossem utilizadas há séculos na medicina popular. Atualmente, os princípios ativos naturais são utilizados em medicamentos, cosméticos, matéria-prima para indústria e recentemente como nutracêuticos (AMARAL et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2008; YUNES; CHECHINEL-FILHO, 2001).

Nos países ocidentais, onde a síntese química é a base da indústria farmacêutica, 25% das moléculas alvo são originalmente isoladas de plantas (BARREIRO, 1991; VIEGAS JR et al., 2006).

*Verbena litoralis* (verbenaceae) é uma espécie medicinal conhecida como erva-de-pai-caetano ou gervãozinho do campo, encontrada na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, Chapada Diamantina, na Bahia (SALIMENA-PIRES; GIULIETTI, 1998), além de ser encontrada em locais de pastagens no Estado do Rio Grande do Sul (FREITAS et al., 2010). Popularmente, é utilizada como desintoxicante do organismo, em diarréias e distúrbios gastrintestinais e também por suas propriedades antifebris. Estudos fitoquímicos realizados por Souza et al. (2005), demonstraram que as partes aéreas de *V. litoralis*



apresentam constituintes químicos como flavonóides, cumarinas, saponinas, taninos e heterosídeos cardiotônicos. De acordo com Li (2003) e Cáceres (1999) também é atribuído a esta planta, atividade antimicrobiana, antioxidante e ativadora do fator de crescimento neural.

Em estudos realizados com *Verbena officinalis*, Woodward (1997) e Brandel e Schütz (2003), mostraram que além da importante atividade medicinal dessa espécie observaram que a distribuição geográfica e sobrevivência da espécie é dificultada pelas flutuações climáticas e dormência das sementes.

O cultivo *in vitro* de plantas torna-se um método alternativo para a propagação de plantas com valor medicinal e que são especialmente vulneráveis às alterações climáticas (ROUT; SAMANTARAY, 2000; NAIKA; KRISHNA, 2008). Este tipo de cultivo é uma alternativa de propagação vegetativa amplamente estudada e difundida nas mais diversas espécies vegetais. Entre suas vantagens estão à possibilidade de obtenção de várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; melhores condições sanitárias e reprodução de espécies que produzem poucas sementes ou que tenham baixa germinação (ERIG; SCHUCH, 2005).

Neste tipo de cultivo, as plantas são submetidas à alta umidade relativa do ar, baixa irradiação, baixo teor de gás carbônico e a presença de açúcares e reguladores de crescimento no meio de cultivo (KADLECEK et al., 2003) e estas condições podem interferir no desenvolvimento dos processos fotossintéticos. Neste caso é interessante avaliar a cinética de emissão da fluorescência das clorofilas, que indica a performance fotossintética das plantas, pois reflete mudanças na organização e funcionamento das membranas dos tilacóides (OUZONIDOU; ILIAS, 2005).

Os metabólitos secundários são os princípios ativos responsáveis pelos efeitos terapêuticos e biológicos das plantas e tem sua produção e concentração influenciadas por fatores ambientais e fisiológicos, sendo este um dos principais obstáculos ao seu processamento nas indústrias de fitomedicamentos e cosméticos (LIMA et al., 2003; ZARONI et al., 2004).

O objetivo do presente trabalho foi estudar a propagação vegetativa, através da micropropagação e estaquia, de *Verbena litoralis*, avaliar os parâmetros fisiológicos como, fluorescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos e identificar os compostos

fitoquímicos presentes no extrato das plantas obtidas *in vitro* após a aclimatização das mesmas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Verbenaceae

A família Verbenaceae possui ampla distribuição geográfica, e apresenta cerca de 34 gêneros e 1.175 espécies (APG III, 2009), que são encontradas especialmente, nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do hemisfério Sul, estando menos representadas no hemisfério Norte. Seus representantes apresentam hábito variado, desde árvores de grande porte (*Tectoma grandis* L.) até ervas (*Verbena officinalis* L.) (METCALFE; CHALK, 1972).

Troncoso (1974), estudando os gêneros de Verbenaceae da América do Sul extratropical, subdividiu a família em duas subfamílias a Verbenoideae com 32 gêneros distribuídos em seis tribos, Verbenaceae, Lantaneae, Privaeae, Petreae, Citharexyleae e Casseliae. A subfamília Viticoideae, representada por seis gêneros e quatro tribos, Callicarpeae, Viticeae, Clerodendreae e Parodiantheae. No Sul do Brasil estão presentes 16 gêneros de diferentes tribos, exceto as tribos Privaeae e Parodiantheae.

Para a flora do Rio Grande do Sul são mencionados os gêneros: *Aegiphila* Jacq., *Aloysia* Palau, *Bouchea* Cham., *Casselia* Nees & C. Mart., *Citharexylum* L., *Clerodendrum* L., *Duranta* L., *Glandularia* J.F. Gmel., *Lantana* L., *Lippia* L., *Phyla* Lour., *Stachytarpheta* Vahl, *Verbena* L., *Verbenoxylum* Tronc. e *Vitex* L. (RAMBO, 1965; TRONCOSO, 1974). Segundo Salimena et al. (2013), *Casselia* não tem representantes nativos na região sul do Brasil. Os gêneros *Aegiphila*, *Clerodendrum* e *Vitex* foram transferidos para a família Lamiaceae, conforme a classificação baseada em morfologia, anatomia e sequenciamento genético (CANTINO, 1992; THORNE, 1992; WAGSTAFF; OLMSTEAD, 1997).

As espécies possuem habitat diversificado, podendo ser encontradas em campos, beira de estrada, lavouras ou mata e em solo rochoso, seco, úmido, charcos ou banhados (BUENO; LEONHARDT, 2011). No estudo realizado por Freitas et al. (2010), foram encontradas em pastagens no estado do Rio Grande do Sul, algumas espécies da família Verbenaceae destacando-se *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc., *Glandularia*

*peruviana* (L.) Small, *Glandularia tenera* (Spreng.) Cabrera, *Glandularia thymoides* (Cham.) N. O’Leary, *Lantana camara* L., *Lippia arechavaletae* Moldenke e *Verbena litoralis* Kunth.

Algumas espécies do gênero *Pétrea* (viuvinha), *Lantana* (chumbinho) e *Amosonia* (RIBEIRO et al., 1999) são indicadas para ornamentação e outras também utilizadas na conservação ambiental cujos frutos servem de alimento para a avifauna (LORENZI; SOUZA, 1999; SANCHOTENE, 1989; LEONHARDT et al., 2002).

De acordo com Ribeiro (1999) as plantas da família verbenácea são em geral, ervas perenes, com ou sem xilopódio, subarbustos, arbustos, árvores, raras lianas. As folhas são opostas ou subopostas e verticiladas, geralmente simples, às vezes palmadas. As inflorescências são cimosas ou racimosas, congestas ou laxas. As flores apresentam formas variadas, com o cálice apresentando cinco lobos persistentes, a corola apresentando quatro ou cinco lobos, às vezes bilabiada, formando um tubo distinto. O fruto é drupa ou esquizocarpo com 1 a 4 sementes, raramente cápsula bivalvada. Na fase jovem, o ovário apresenta placenta parietal, que se projeta para o centro onde se une completamente ou incompletamente, formando neste caso uma fenda mediana no pirênio da drupa. A polinização das flores é feita por insetos e aves, e a dispersão por animais e, em alguns casos pelo vento.

A família tem ampla aplicabilidade medicinal, sendo algumas espécies herbáceas e arbustivas empregadas na etnobotânica, usadas como remédio ou como aromáticas (FONT QUER, 1978; RUDDER, 1997), podendo ser utilizadas na forma de infusão pela população, como é o caso de *Lippia alba* (erva-cidreira) e *Stachytarpheta cayennensis* (jervão) (RIBEIRO et al., 1999).

A família Verbenaceae se destaca pelo potencial medicinal, alguns de seus representantes são utilizados popularmente por suas propriedades digestivas (AGRA et al., 2007; 2008; BONZANI et al., 2003; LEITÃO et al., 2009), antidiabética (DORNAS et al., 2009) antimalárica (FROELICH et al., 2008; MARIATH et al., 2009), antiúlcera e anti-inflamatória (JESUS et al., 2009), em odontologia (OLIVEIRA et al., 2007), em cosmética (BIAVATTI et al., 2007).

Um estudo de bioatividade com extratos aquosos de 55 espécies de Verbenaceae, mostrou índices de letalidade frente à *Artemia salina* significativos para alguns gêneros, principalmente *Clerodendrum*, *Verbena*, *Stachytarpheta* e *Vitex*, onde os valores de CL 50 (Dose letal mediana) foram menores que 1000 µg/mL (OLIVEIRA et al., 1992).

Os iridóides e os feniletanóides glicosídicos estão entre os principais metabólitos secundários presentes nas Verbenáceas, juntamente com terpenóides, flavonóides, saponinas, quinonas e alcalóides apresentando um vasto espectro de atividades biológicas (VANDRESEN, 2005).

Os feniletanóides são compostos fenólicos geralmente derivados do ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico, podendo existir sob as formas isoméricas *cis* e *trans*, sendo que os mais encontrados na natureza possuem conformação *trans* e são os mais estáveis (SIMÕES et al., 2004). Para esta classe de metabólito secundário, destacam-se as atividades antibacteriana, antialimentar, citotóxica e anti-inflamatória, inibidores de atividades enzimáticas (SCHAPOVAL et al., 1998; SKRZYPEK et al., 1999), e auxiliar no controle da hipertensão arterial (GHISALBERTI, 2000).

Na espécie *V. officinalis* foi isolado um novo triterpeno derivado do ácido ursólico, onde o extrato clorofórmico das partes aéreas desta planta apresentou atividade anti-inflamatória (CATALÁN et al., 1983; DEEPAK; HANDA, 1998).

### 2.1.1 *Verbena litoralis* Kunth

*Verbena litoralis* (Figura 1) caracteriza-se por seu caule quadrangular, folhas ovadas, ovado-lanceoladas, lanceoladas, espatuladas ou lineares, de base afilada, com pecíolo curto, e também por suas inflorescências que são caracteristicamente longas e pouco densas quando comparadas com as espécies com as quais poderia ser eventualmente confundida como *Verbena bonariensis* L. e *V. brasiliensis* Vell. (YEO, 1989).

A espécie *V. litoralis* pode ser encontrada na região andina do Chile ao Peru, Guianas, Venezuela, Argentina (LORENZI, 2000), regiões Sudeste e Sul do Brasil e eventualmente na Austrália e África (SOUZA, 2005). No Brasil, pode ocorrer em alguns locais específicos de diversidade, localizados na Cadeia do Espinhaço (MG), na Chapada Diamantina (BA) (SALIMENA-PIRES; GIULIETTI, 1998), e no Rio Grande do Sul (GIEHL, 2012). É utilizada na medicina tradicional da América Central e do Sul como remédio contra diarreia, febre, distúrbios gastrointestinais e algumas doenças sexualmente transmissíveis (OCAMPO; MAFFIOLI, 1987; PÉREZ-ARBELÁEZ, 1978).

Vendrusculo et al. (2005) com estudo comparativo referente as indicações originais ou tradicionais do uso de *V. littoralis* citadas no Brasil e países vizinhos como a Argentina e o Uruguai, e suas indicações atuais, constataram que atualmente o uso restringe-se à ação contra dor de cabeça e afecções do fígado.

No Rio grande do Sul as partes aéreas de *V. littoralis* são usadas em inflamações do útero e dos ovários, problemas do estômago, da bexiga e dos rins, vesícula, afecções da coluna, dor de barriga, colite, doenças do estômago e do fígado, para eliminar os vermes e contra prisão de ventre (GALERT, 2000; MARODIN, 2000; SEBOLD; 2003).

O extrato aquoso obtido das folhas de *V. littoralis* administrado oralmente em ratos na dose de  $500\text{mg/Kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$  exibiu atividade antimalárica parcial, sendo que a dose utilizada reduziu 43% da parasitemia de *Plasmodium berghei* desses animais (CARRILLO-ROSÁRIO; RAMÍREZ, 2006).

De acordo com Souza et al. (2005), as partes aéreas de *V. littoralis* apresentam constituintes químicos como flavonóides, cumarinas, saponinas, taninos e heterosídeos cardiotônicos. LI et al., (2001ab e 2003a) identificaram no extrato das partes aéreas de *V. littoralis* compostos importantes como verbenachalcona, littoralisona e littorachalcona. Castro-Gamboa e Castro (2004) isolaram dois novos iridóides, 6S-hidroxi-8S-metil-4-metileno-hexa-hidro-ciclopenta [c] pirano-3-ona e 6S, 9S-di-hidroxi-metil-8S-4-metileno-hexa-hidro-ciclopenta [c] pirano-3-ona, que mostraram moderada atividade antibacteriana, reflexo peristáltico intestinal e atividades antioxidantes. Além disso, há relatada a presença de atividade ativadora do fator de crescimento neural atribuída a estes compostos (LI, 2003; CÁCERES, 1999).



Figura 1 – Plantas de *Verbena litoralis* crescendo naturalmente no campus da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS. A: vista geral em período vegetativo; B: período reprodutivo; C: inflorescência; Fonte: Rosiana Bertê

## 2.2 Micropropagação

A cultura de tecidos baseia-se na regeneração de plantas utilizando o princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira (FLORES, 2006). Esta técnica pode ser definida como a manutenção, propagação e regeneração de partes da planta (células ou tecidos), que são cultivados em ambiente asséptico e em condições controladas (*in vitro*), e por isso vem sendo uma das áreas de maior êxito da biotecnologia vegetal (MROGINSKI et al., 2004).

Segundo Torres et al. (2001), as necessidades requeridas para o crescimento e desenvolvimento das plantas intactas são as mesmas para os segmentos de plantas no cultivo *in vitro*. De acordo com Caldas et al. (1998), as plantas cultivadas *in vitro* utilizam as mesmas vias bioquímicas e metabólicas, no entanto, processos como a fotossíntese podem ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células.

Entre outras técnicas da cultura de tecidos *in vitro*, a micropropagação é uma das mais utilizadas, pois proporciona a obtenção de um número significativo de plantas saudáveis, de qualidade e de larga utilização comercial em diversos países (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Aumentar a multiplicação de gemas é um dos objetivos da

micropropagação, gerando um aumento no número de plantas geneticamente idênticas que podem ser produzidas o ano todo facilitando a propagação de plantas cuja semente apresenta baixa germinação (GIRI et al., 2004).

Para o sucesso da micropropagação, é necessário o controle de variáveis, como antecedentes genéticos, tipos de tecidos ou explantes, componentes nutricionais, reguladores de crescimento e ambiente de cultivo (GIRI et al., 2004). Cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, portanto, as exigências para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O estabelecimento e a propagação *in vitro* de uma espécie estão submetidos a fatores como nutrientes minerais e reguladores de crescimento no meio de cultura que, em combinação com o estado físico do meio de cultivo, podem facilitar a propagação das espécies (KOZAY et al., 1997; FORTES; PEREIRA, 2001). O estado físico do meio de cultura modifica a resistência física e de contato dos explantes com o meio, podendo influenciar no desenvolvimento das plantas *in vitro* (CHEN; ZIV, 2001) e pode ser alterado pela exclusão ou adição de ágar, modificando, assim, a disponibilidade de água, nutrientes e dos reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os reguladores vegetais no meio de cultura bem como sua composição e concentração têm papel fundamental no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de micropropagação (CALDAS, 1998). Os reguladores vegetais são substâncias sintéticas que apresentam função semelhante a dos hormônios vegetais e por isso, devem ser adicionados ao meio de cultura em baixas concentrações (SILVA, 2003).

O uso de reguladores vegetais no meio de cultura suplementa os teores endógenos de hormônios vegetais que os explantes apresentam por estarem desligados das regiões produtoras na planta matriz (BORGATTO; HAYASHI, 2002). Esta utilização deve ser de forma criteriosa, pois em determinados casos, em fases específicas do desenvolvimento, estas substâncias poderão provocar respostas não desejáveis (NASCIMENTO, 2007).

Os principais reguladores de crescimento utilizados pertencem ao grupo das auxinas, responsáveis por controlar o alongamento celular e a rizogênese. As citocininas são promotoras da divisão celular e da emissão de gemas adventícias. As giberelinas, responsáveis, principalmente, pelo alongamento de caules (HINOJOSA, 2000; BARRUETO-CID, 2000; MATSUMOTO, 2000). De acordo com Nascimento (2007), no cultivo *in vitro*, a maior relação citocinina:auxina favorece a multiplicação de brotos e ao



diminuir esta relação promove-se o desenvolvimento das raízes. A produção de calos é beneficiada quando se tem concentrações iguais dos reguladores vegetais, como auxina e citocinina.

A concentração de sacarose promove o aumento da biomassa, devido a incorporação de carbono, mas também afeta a produção de metabólitos secundários e a composição da parede celular, por isso, a concentração de sacarose utilizada é um fator determinante no crescimento e é dependente do tipo de explante. A concentração mais utilizada no preparo do meio de cultura Murashige e Skoog (MS) é  $30 \text{ g L}^{-1}$ , entretanto, modificações na quantidade podem beneficiar o cultivo (PASQUAL, 2001).

O excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das culturas (YAMADA; SATO, 1978). A redução de sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente para a produção comercial de mudas (HOFFMANN, 1999).

O suprimento de macro e micronutrientes no meio de cultura é parte essencial no sistema de cultivo *in vitro*. Os meios utilizados são baseados nas modificações empíricas de algumas formulações básicas e nas exigências nutricionais de plantas inteiras. As necessidades consideradas ideais variam amplamente entre os genótipos das plantas e sistemas de cultura (WILLIAMS, 1993; ZIV, 1995; FORTES; PEREIRA, 2001).

### **2.3 Metabólitos Secundários**

As plantas medicinais foram os primeiros recursos terapêuticos naturais utilizados pelo homem. O desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização desses recursos na medicina e no controle de pragas (VIEGAS JR. et al., 2006). No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está relacionada às culturas indígena, negra e dos imigrantes europeus e é praticada até os dias atuais (MACEDO; FERREIRA, 2004).

A convivência e o aprendizado com os grupos étnicos contribuíram para o conhecimento da relação entre a estrutura química de um determinado composto, suas propriedades biológicas e a inter-relação animais/insetos-planta. A natureza forneceu diversos modelos moleculares que fundamentam estudos relacionados a estrutura e a

atividade e inspiram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (VIEGAS JR. et al., 2006).

Entre os fármacos empregados nos países industrializados, estima-se que 25% tenham sido desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais, especialmente de plantas (YUNES; CALIXTO, 2001).

Os metabólitos secundários são compostos considerados não essenciais ao metabolismo das plantas, mas relacionam-se diretamente nos processos de defesa das plantas contra herbívoros, microrganismos, protegem contra os raios ultravioletas, atraem polinizadores e podem apresentar atividades alelopáticas que auxiliam na adaptação e sobrevivência da espécie. Podem variar de acordo com a família, gênero ou espécie e ser utilizados como marcadores taxonômicos (BENNET; WALLSGROVE, 1994; SANTOS, 2004).

Alguns fatores podem alterar a taxa de produção de metabólitos secundários. Dentre eles pode-se citar a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, altitude, poluição atmosférica e estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. A época de coleta do vegetal é um dos fatores importantes, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. Existem relatos mostrando que a composição de metabólitos secundários de uma planta pode variar apreciavelmente durante o ciclo dia/noite (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Algumas das variações podem ser decorrentes do desenvolvimento da planta e do surgimento de novos órgãos. Isto pode levar à menor concentração destes metabólitos que se diluem na planta, no entanto, pode resultar em maior quantidade total, devido ao aumento de biomassa (SPRING; BIENERT, 1987; HENDRIKS, et al., 1997)

Os metabólitos secundários são geralmente classificados com base na rota de formação e pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato dando origem aos principais grupos que são os compostos nitrogenados, terpenos e compostos fenólicos como os flavonóides (SIMÕES, et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2009). Esses compostos despertam interesse, pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, como também pela atividade farmacológica. Além da importância farmacêutica, são utilizados comercialmente na área alimentar, agrônômica, perfumaria e produtos de higiene (SIMÕES et al., 2007).

### 2.3.1 Flavonóides

Os flavonóides foram descobertos em 1930 por Szent-György, que extraiu a citrina da casca do limão, a qual possuía a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Inicialmente os flavonóides foram denominados como vitamina P e também por vitamina C<sub>2</sub>, visto que algumas das substâncias pertencentes a esta classe apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C. Porém a não confirmação dessas substâncias como vitaminas, fez com que esta classificação fosse abandonada em 1950 (MARTÍNEZ - FLOREZ, 2002).

Os flavonóides constituem a maior classe de compostos fenólicos presentes nos vegetais, apresentando ação fotoprotetora, contra herbivoria, atividade polinizadora e atividade antioxidante (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Nas plantas, a distribuição dos flavonóides depende de fatores ambientais e variam com a ordem, família e espécie a qual pertence. Além disso, as classes e concentrações dos flavonóides podem diferir conforme os órgãos como caule, folhas, ramos, raízes, flores e frutos (SIMÕES et al., 2000).

Entre as funções atribuídas aos flavonóides nas plantas pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (SIMÕES et al., 2000; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Segundo Heim, Tagliaferro, Bobilya (2002) e Degáspari, Waszczyński (2004), os pigmentos das flores, derivados de antocianinas, atraem insetos polinizadores e são responsáveis pelas cores vermelha e azul, características de bagas, vinhos e de certos vegetais, que são as maiores fontes de flavonóides na dieta humana.

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas sendo definidos por um núcleo comum de fenilcromanona com substituição em uma ou mais hidroxilas que podem estar ligadas a açúcares (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001). Possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, duas fenilas ligadas por três átomos de carbono (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Os flavonóides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas, porém freqüentemente ocorrem como glicosídeos. As substituições glicídicas incluem D-glicose, L-rhamnose, glicorhamnose, galactose, lignina e arabinose (BIRT;

HENDRICH; WANG, 2001). Quando se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

São subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos descritos até 1990. As subclasses são: chalconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas (apigenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandirol, antocianidina, isoflavonóides (genisteína, daizdeína), bioflavonóides e proantocianinas (BRAVO,1998).

Flavonóides e isoflavonóides ocorrem comumente como ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001). Exceto o grupo das leucoantocianinas, os demais flavonóides ocorrem em plantas sempre acompanhados por glicídios (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

O interesse econômico pelos compostos flavonoídicos é atribuídos aos efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório, antiplaquetário e aumento na permeabilidade capilar (PELZER et al., 1998). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonóides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido oxidases (FERGUSON, 2001).

## **2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida e empregada em laboratórios de análise químicas e farmacêuticas, na área médica e em muitos outros campos da ciência. A CLAE têm sido utilizada em análises rápidas, sem comprometer o desempenho cromatográfico. Para que o sistema fosse eficiente, vários estudos foram desenvolvidos para otimizar o tamanho das partículas da fase estacionária, o que permitiu separações cada vez melhores (MALDANER; JARDIM, 2009).

O procedimento de análise em Cromatografia Líquida, pode ser baseado em frações obtidas de acordo com o perfil cromatográfico, verificado por Cromatografia em Camada

Delgada (CCD). Em muitos casos, se obtém compostos puros numa única Cromatografia em Coluna (CC) ou após a recristalização da substância isolada. As frações dos extratos orgânicos, após serem analisadas farmacologicamente e apresentarem atividade, devem ser submetidas à técnicas cromatográficas especiais, como a CLAE (GÓMEZ-SERRANILLOS; CARRETERO; VILLAR, 1995).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utiliza-se de um método físico-químico de separação. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante o desenvolvimento cromatográfico, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, ocorrendo migrações diferenciais destes componentes (DEGANI et al., 1998).

A CLAE tem sido uma das técnicas analíticas utilizadas para a determinação da “impressão digital” das plantas medicinais em função da facilidade de manuseio e por não estar limitada à volatilidade ou estabilidade dos compostos da amostra. Porém, a otimização das condições para uma boa separação não são triviais por envolver fatores como fase móvel, ajuste de pH, pressão de bombas e tantos outros (COLLINS et al., 1997; LIANG et al., 2004).

As separações analíticas normalmente são realizadas em fase reversa, sendo a fase octadecilsilica (C18) a mais usada, pois são preferidas fases que atuem no modo normal para fins preparativos, já que separações no modo reverso utilizam fases móveis aquosas (DEGANI et al., 1998).

Segundo Gan e Ye (2006) a análise dos extratos das plantas através de CLAE tem sido utilizada para verificar a autenticidade ou fornecer o controle de qualidade das plantas medicinais, pois fornece um perfil químico sob a forma de um cromatograma.

O sucesso da utilização do método CLAE está relacionado à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar substâncias não voláteis e termicamente instáveis (TONHL et al., 2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no período de 2011 a 2012, no Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) e no Laboratório de Farmacognosia, do Departamento de Farmácia Industrial, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em Santa Maria-RS.

#### 3.1 Micropropagação

As plantas de *V. littoralis* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Santa Maria. Uma exsicata está depositada no Herbário SMDB do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM, sob registro 13095.

As plantas jovens coletadas foram transplantadas para recipientes contendo solo e mantidas em casa de vegetação, submetidas a rega três vezes por semana e pulverizadas a cada 15 dias com fungicida carbendazim (Bendazol®) na concentração de  $1\text{ mg L}^{-1}$  por três meses (Figura 2), com a finalidade de obter-se plantas com menor índice de contaminação. A partir destas, foram retirados os segmentos nodais para a realização do experimento.

Os explantes passaram por um processo de desinfestação que consistiu de quatro etapas realizadas sucessivamente, lavagem em água corrente durante 20 minutos; imersão em álcool 70% por 30 segundos, após imersão dos segmentos nodais em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% por 15 minutos e três lavagens em água esterilizada.

Os segmentos nodais (1,0 cm) foram inoculados em meio MS completo (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $6\text{ g L}^{-1}$  de ágar,  $1,0\text{ mg L}^{-1}$  de fungicida carbendazim (Bendazol®) e  $1,0\text{ mg L}^{-1}$  de carvão ativado. Foram testados em  $\text{mg L}^{-1}$ , quatro combinações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) respectivamente, T1 (0;0), T2 (1,0; 0,1), T3 (2,0; 0,2) e T4 (4,0; 0,4), na presença ou ausência de carvão ativado ( $1,0\text{ mg L}^{-1}$ ). Antes da autoclavagem do meio, o pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ . O ensaio foi realizado em câmara de fluxo laminar com tubos de ensaio medindo 25 X 150 mm contendo cada tubo 15 mL de meio de cultura

e um explante, sendo então fechados com papel alumínio e filme PVC. Após, as culturas foram mantidas em sala escura durante sete dias sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e posteriormente transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas (Radiação Fotossinteticamente Ativa de  $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , lâmpadas fluorescentes brancas), e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sendo o experimento constituído de um bifatorial  $4 \times 2$  (quatro combinações de fitorreguladores e presença ou ausência de carvão ativado), com três repetições, sendo cada parcela experimental formada por 15 tubos de ensaio.



Figura 2 – Plantas de *Verbena litoralis* mantidas em casa de vegetação, Departamento de Biologia, CCNE, UFSM, Santa Maria-RS.

Fonte: Rosiana Bertê.

### 3.1.1 Parâmetros analisados

Para determinar o melhor tratamento para a obtenção de plantas micropropagadas, após 60 dias da inoculação dos explantes, foram analisados os parâmetros porcentagem de

plantas regeneradas, porcentagem de brotações, porcentagem de oxidação, contaminação, calo, explantes sem resposta, número de folhas e raízes dos explantes regenerados. Nas plantas completas (raiz, caule e folha), fez-se uma seleção, compondo três grupos morfológicamente distintos visualmente. O grupo 1, formado por plantas com menor comprimento de haste e com folhas pouco desenvolvidas (menor área foliar), o grupo 2 formado por plantas com comprimento de haste e área foliar intermediários e o grupo 3 formado por plantas com maior comprimento de haste (atingindo o topo do tubo de ensaio) e com maior área foliar, onde foram determinados parâmetros de crescimento, fluorescência da clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos que cresceram em meio com carvão ativado.

### 3.1.1.1 Determinação de parâmetros de crescimento, fluorescência da clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos.

Para as medições de fluorescência, foram utilizadas três plantas por grupo, sendo as medições realizadas em duas folhas do terço superior de cada planta com o fluorômetro de pulso modulado.

Para determinar a fluorescência máxima ( $F_m$ ), antes das medições, realizadas em câmara de crescimento (fotoperíodo e temperatura controlada), as folhas foram pré-adaptadas ao escuro pelo período de 30 minutos para a determinação da fluorescência inicial ( $F_o$ ), e posteriormente submetidas a um pulso de luz saturante ( $10.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 0,6 segundos.

A eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fotossistema II) ( $F_v/F_m$ ), foi calculada através da razão da fluorescência variável ( $F_v = F_m - F_o$ ) e a fluorescência máxima.

A taxa de transporte de elétrons máxima ( $ETR_{1500}$ ) foi determinada através de curvas de luz (taxa de transporte de elétrons versus RFA – Radiação Fotossinteticamente Ativa), as quais foram construídas submetendo-se cada amostra a nove níveis de radiação (0, 125, 190, 285, 420, 625, 820, 1150 e  $1500 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 10s, e ajustadas através da equação:  $ETR = ETR_{\text{max}} [1 - e^{-kQ}]$ ; e, a eficiência fotoquímica efetiva máxima ( $Y(II)_{125}$ ) foi calculada no menor nível de radiação ( $125 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e as curvas ajustadas através da equação:  $YII = ax^2 + bx + c$ .



Para determinar as concentrações de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl total), a razão clorofila *a/b*, o teor de carotenóides (Carot.) e a razão Carot./Chl total seguiu-se a metodologia descrita por Hendry e Price (1993), sendo utilizadas três amostras por tratamento.

Os pigmentos fotossintéticos foram determinados utilizando as folhas da análise da fluorescência da clorofila, com área e massa conhecidas. Estas foram congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a -80°C até o momento da quantificação após maceradas com N<sub>2</sub> líquido, homogeneizadas em 5 mL de acetona 80% e transferidas para tubos tipo falcon de 15 mL, centrifugadas a 4.000 g por 4 minutos a 25°C. Em espectrofotômetro modelo SF325NM foram realizadas as leituras de absorbâncias do sobrenadante a 480 nm, 645 nm e 663 nm sendo determinadas as concentrações de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides totais e calculadas através das equações abaixo e expressas em mg g<sup>-1</sup> de massa fresca.

$$\text{Chl}a \text{ (mg g}^{-1} \text{ MF)}: \frac{(((11,75 \times A663) - (2,35 \times A645)) \times V)}{\text{MF}}$$

$$\text{Chl}b \text{ (mg g}^{-1} \text{ MF)}: \frac{(((18,61 \times A645) - (3,96 \times A663)) \times V)}{\text{MF}}$$

$$\text{Chl total (mg g}^{-1} \text{ MF)}: \text{Chl}a + \text{Chl}b$$

$$\text{Carotenóides (mg g}^{-1} \text{ MF)}: \frac{((1000 \times A480) - (2,27 \times \text{Chl}a) - (81,4 \times \text{Chl}b)) / 227}{\text{MF}} \times V$$

Onde: V = volume do extrato de folhas (mL),

MF = massa fresca da amostra (mg).

A análise estatística dos dados foi realizada através do software específico, e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e análises complementares através do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e teste (*T*).

### 3.2 Aclimatização das plantas obtidas *in vitro*

As plantas completas obtidas *in vitro*, foram transferidas para copos descartáveis de 430 ml contendo substrato plantmax e cobertas por copos plásticos transparentes de 700 mL com furos na base. Após 30 dias, o fundo dos copos que as protegia foi removido e aos 60 dias foram retirados completamente (Figura 3). As plantas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas utilizando-se lâmpadas fluorescentes brancas (RFA de  $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), regadas três vezes por semana.

Após a aclimatização, e aos 90 dias, avaliou-se a sobrevivência das plantas (%), altura (cm), número de ramos, número de folhas, número de raízes, comprimento da raiz principal (cm), massa fresca das raízes, caules e folhas (g), área foliar ( $\text{cm}^2$ ) e massa seca das raízes (g). A área foliar de cada planta foi medida utilizando-se um medidor de área foliar modelo AM 300. O comprimento das plantas foi mensurado com o uso de régua e para a quantificação de massa seca (balança analítica), a parte aérea (PA) e as raízes foram colocadas em estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 72 horas.

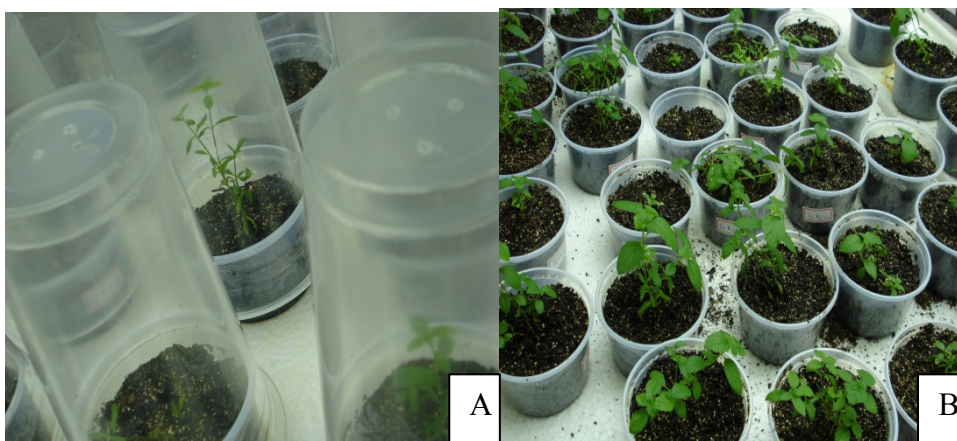


Figura 3 – Plantas de *Verbena litoralis* na fase de aclimatização em sala de crescimento, sob temperatura controlada de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas utilizando-se lâmpadas fluorescentes brancas (RFA de  $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A: Fase inicial da aclimatização, B: Plantas aclimatizadas aos 60 dias após a transferência para substrato plantmax.

Fonte: Rosiana Bertê.

### 3.3 Propagação vegetativa por estacas

Para a propagação vegetativa por estacas foram utilizadas estacas herbáceas sem folhas com 12 cm de comprimento e espessura padronizada em 2 a 5 mm de diâmetro obtidas da parte aérea, de plantas adultas coletadas no Campus da UFSM.

As estacas foram classificadas em apical e basal de acordo com sua posição no ramo. Foram utilizadas três repetições com seis estacas cada grupo. A base das estacas permaneceu mergulhada em ácido-indolbutírico (AIB), nas concentrações 0; 1200 e 2400 mg L<sup>-1</sup> durante três horas e após transferidas para bandejas contendo substratos Plantmax®; Plantmax®:Vermiculita; Plantamax®:Areia e Plantamax®:Casca de arroz, na proporção 2:1. As estacas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas utilizando lâmpadas fluorescentes brancas (RFA de ~36 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), e as irrigações feitas no período da manhã.

Aos 30 dias, foi avaliada a porcentagem de enraizamento, número de raízes, número de brotações novas por estaca e porcentagem de sobrevivência. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído de um trifatorial 4x2x3 (quatro substratos, dois tipos de estacas e três concentrações de AIB), com 3 repetições e seis estacas por repetição.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software específico e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), e as análises complementares feitas através do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4 Determinações fitoquímicas em *Verbena litoralis*

#### 3.4.1 Obtenção dos extratos das raízes e partes aéreas das plantas micropropagadas

O extrato bruto das partes aéreas (2,2635 g) e raízes (0,3420 g), secos em estufa a 40°C foi obtido por maceração em 25 ml de metanol e sonicado por 1 hora. Posteriormente os extratos foram filtrados com papel filtro para um frasco previamente tarado e

concentrados até resíduo seco e o rendimento calculado em relação a quantidade de amostra inicial.

### 3.4.2 Dosagem total de polifenóis

A dosagem de polifenóis foi realizada através do método de Folin- Cicalteau conforme Chandra e Mejia (2004) com modificações. Ao extrato de *Verbena litoralis* na concentração de 0,05% diluído em água, foi adicionado 1,0 mL do reativo Folin Cicalteau. Após a incubação no escuro por 5 minutos, foi acrescentado 2 ml de carbonato de sódio a 20%. As soluções foram homogeneizadas e permaneceram no escuro durante 10 minutos. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (UV-VIS 1201 SPECTROPHOTOMETER/SHIMADZU) a 730 nm. A equação da reta:  $y = 30,767x - 0,0087$  e  $R^2 = 0,99$  foi obtida pela curva de calibração, construída através das respectivas leituras das absorbâncias versus as concentrações de ácido gálico (0,001; 0,01; 0,02 e 0,03  $\text{mg mL}^{-1}$ ) (Figura 4), (RUSAK et al., 1993).

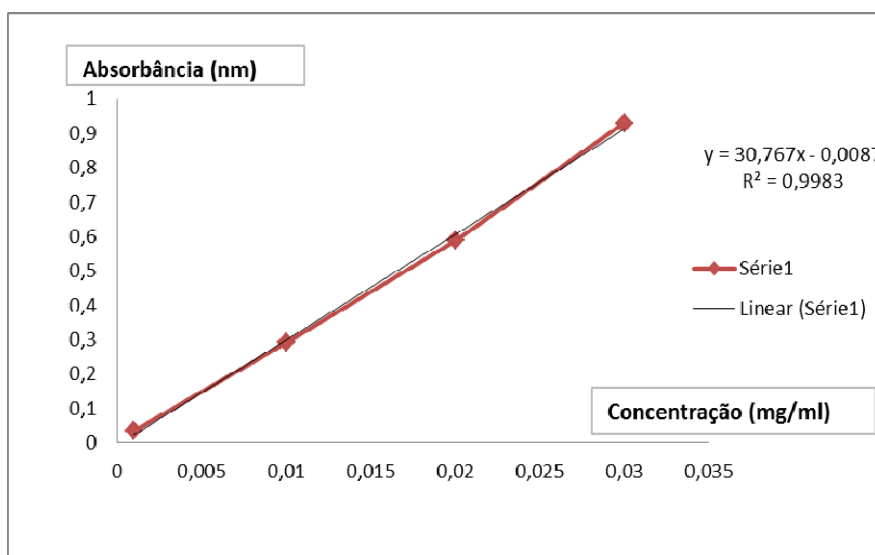


Figura 4 - Curva analítica do padrão Ácido Gálico para polifenóis nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,02 e 0,03  $\text{mg mL}^{-1}$ .

### 3.4.3 Dosagem de flavonóides

A dosagem de flavonóides foi realizada de acordo com a metodologia de Rio (1996) modificada. Ao extrato de *V. litoralis* na concentração de 0,1% diluído em metanol 70% foi adicionado 75  $\mu\text{L}$  de cloreto de alumínio 5% em metanol e 4 mL de metanol 70%, permanecendo em repouso no escuro por 30 minutos. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (UV-VIS 1201 SPECTROPHOTOMETER/SHIMADZU) a 425 nm. A partir de uma solução de quercetina nas concentrações de 0,002; 0,006; 0,01; 0,014 e 0,018  $\text{mg mL}^{-1}$  foi obtida uma curva padrão para o cálculo dos flavonóides presentes na amostra que corresponde a  $y = 40,175x + 0,001$  e  $R^2 = 0,99$  (Figura 5).

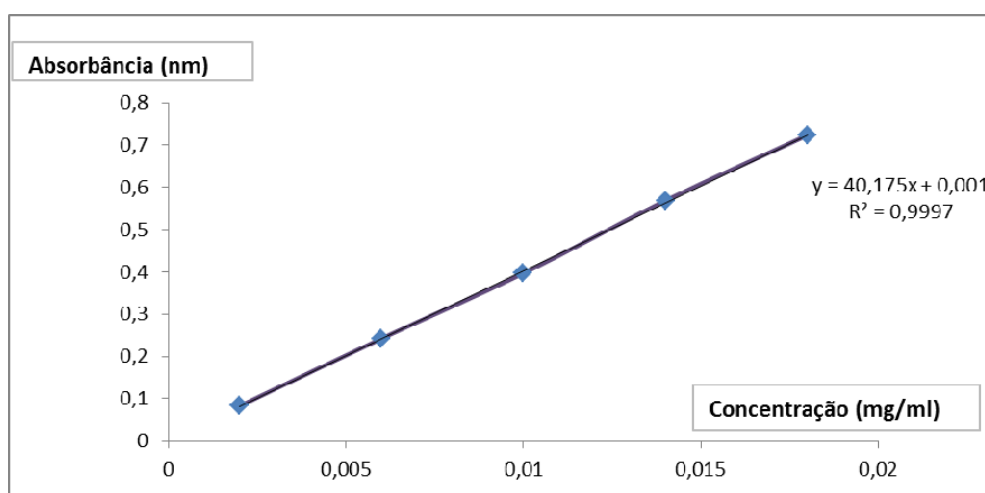


Figura 5 - Curva analítica do padrão quercetina para flavonoides nas concentrações de 0,002; 0,006; 0,01; 0,014 e 0,018  $\text{mg mL}^{-1}$ .

#### 3.4.4 Dosagem de cumarinas

Para a dosagem de cumarinas foi preparada uma solução padrão em metanol/água 80% na concentração de 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para selecionar em espectrofotômetro na região do UV, o comprimento de onda de maior absorção que foi 275,4 nm. Os extratos das partes aéreas e das raízes foram preparados com metanol/água 80% v/v, na concentração de 0,3  $\text{mg mL}^{-1}$  e 0,8  $\text{mg mL}^{-1}$  respectivamente. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (UV-VIS 1201 SPECTROPHOTOMETER/SHIMADZU) a 275,4 nm, e a concentração determinada através da reta de calibração comparativamente com a solução de cumarina padrão.

Dissolveu-se 100 mg de cumarina padrão em 100mL de metanol/água. Realizaram-se sucessivas diluições para obtenção de diferentes concentrações de 0,80; 1,55; 3,25; 6,25 e 12,50 mg mL<sup>-1</sup> e realizadas leituras das absorvâncias na região UV a 275,4 nm. Tendo como equação da reta a seguinte expressão:  $y = 0,093x + 0,019$  e  $R^2 = 0,99$  (Figura 6).

Os resultados das dosagens foram comparados estatisticamente através do teste (*t*).

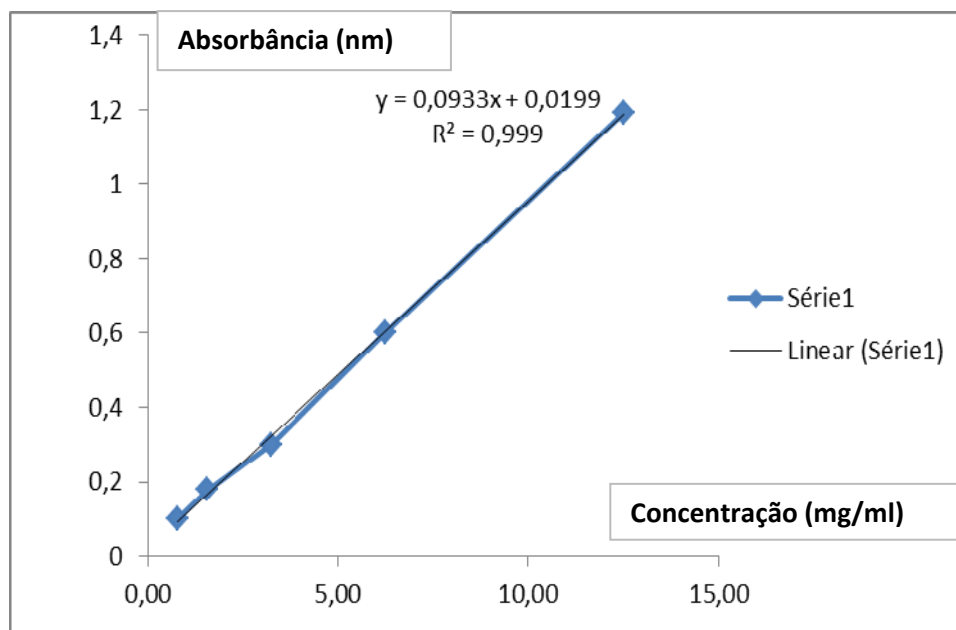


Figura 6 - Curva analítica do padrão cumarina nas concentrações de 0,80; 1,55; 3,25; 6,25 e 12,50 mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.4.5 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi realizada com o sistema de CLAE (SHIMADZU), com auto amostrador Prominence (SIL-20A), equipado com bombas Shimadzu LC-20 AT alternadas conectadas a um degaseificador DGU 20A5, com integrador CBM 20A, detector UV-VIS, DAD SPD-M20A e coluna Phenomenex C-18 (250 mm x 4.6 mm), empacotada com partículas de 5 µm de diâmetro.

#### 3.4.5.1 Quantificação de rutina e quercetina por CLAE

A quantificação de rutina e quercetina nas partes aéreas e raízes de *V. littoralis* foram determinadas de acordo com Huber et al. (2007), modificada. Estas foram preparadas na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup> em metanol. Os solventes orgânicos foram de grau HPLC (Merck®, Vetec® e Sigma®), água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®) e os padrões quercetina (Sigma®) rutina (Merck®).

A fase móvel foi metanol e água destilada (v/v), ambos acidificados com 0,3% de ácido fórmico, com eluição em gradiente. O gradiente começou com 20:80 de MeOH:H<sub>2</sub>O, 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, com gradiente linear, e fluxo de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi 20 µL. Os picos foram identificados em comparação com o tempo de retenção da solução dos padrões, no comprimento de onda de 370 nm.

As curvas de calibração dos padrões rutina (0,75; 1; 1,25; 2,5 e 5 mg mL<sup>-1</sup>) e quercetina (1,2; 2,5; 3 e 4 mg mL<sup>-1</sup>) foram:  $y = 32.761.794x + 7.594.339$ ,  $R^2=0,9911$  e  $90.997.587x - 41.747.087$ ,  $R^2=0,9965$  respectivamente. O tempo de retenção da rutina 13 minutos e da quercetina foi 19 minutos.

#### 3.4.5.2 Quantificação de cumarina por (CLAE)

A cumarina foi quantificada nas partes aéreas e raízes de *V. littoralis* segundo a metodologia de Celeghini et al. (2001), com modificações. As amostras foram testadas em triplicada, na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>, utilizando como fase móvel água destilada e acetonitrila 60:40 (v/v), com eluição isocrática, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, obtendo-se tempo de retenção de 6,0 minutos. O volume de injeção foi 20 µL. Os picos foram identificados em comparação com o tempo de retenção da solução dos padrões, no comprimento de onda de 274 nm. A curva de calibração do padrão cumarina (6,25; 12,5; 25; 50; 100,0 µg mL<sup>-1</sup>) foi:  $y = 269.961x - 330.456$ ,  $R^2=0,9997$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Micropropagação

Segmentos nodais retirados de plantas de *V. littoralis* cultivadas em casa de vegetação climatizada foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) completo, contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, testando-se quatro combinações de BAP e ANA, com e sem carvão ativado. As respostas obtidas *in vitro* encontram-se na Tabela 1, onde se observa que as porcentagens de plantas completas formadas não variaram entre os meios contendo as quatro combinações dos fitorreguladores na presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado, apresentando em média 21% de plantas completas. Na ausência de carvão ativado, o meio de cultura livre dos fitorreguladores apresentou valores superiores (31,1%) e diferenciou significativamente dos meios que continham as combinações de BAP e ANA. Entretanto, a porcentagem de brotações nos explantes foi maior nos meios sem fitorreguladores ou com as menores concentrações de BAP e ANA (1,0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), quando utilizado carvão ativado e não diferiram estatisticamente do meio contendo 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,4 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Na ausência de carvão ativado, este último meio apresentou melhor resposta, porém não diferiu dos demais tratamentos contendo as combinações dos fitorreguladores. A menor porcentagem de formação de brotos ocorreu no meio sem BAP e ANA.

As porcentagens de oxidação não diferiram entre os tratamentos de fitorreguladores e carvão ativado, apresentando em média 30% com carvão ativado e 37,7% sem carvão ativado. O mesmo ocorreu para as porcentagens de contaminação onde não houve diferenças significativas entre os tratamentos utilizados, apresentando em média 16% e 13% nos meios contendo ou não carvão ativado, respectivamente.

A utilização de carvão ativado contribuiu para a ausência de calos na base do explante em todos os tratamentos. Nos tratamentos sem carvão ativado, somente o meio sem fitorreguladores não formou calo, enquanto que os demais formaram calo, apresentando média de 22,2%, diferindo significativamente dos tratamentos onde foi utilizado o carvão ativado.



A porcentagem de explantes que não responderam aos tratamentos com fitorreguladores foi de 15,7% quando utilizado carvão ativado e 5% quando não se utilizou carvão ativado.

Tabela 1 – Respostas obtidas *in vitro* a partir de segmentos nodais cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) completo, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, testando-se quatro combinações de fitorreguladores, na ausência e presença de carvão ativado (1,0 mg L<sup>-1</sup>).

Respostas <i>in vitro</i> (%)	Carvão Ativado	Fitorreguladores (mg L <sup>-1</sup> )			
		0,0 BAP+ 0,0 ANA	1,0 BAP+ 0,1 ANA	2,0 BAP+ 0,2 ANA	4,0 BAP+ 0,4 ANA
Plantas completas	Com	15,6 aA*	24,4 aA	20,0 aA	24,4 aA
	Sem	31,1 aA	6,7 bB	8,9 abA	0,0 bB
Brotações sem raízes	Com	30,0 aA	20,0 abA	6,8 bA	13,3 abA
	Sem	6,7 bB	17,8abA	11,1 abA	26,7 aA
Oxidação	Com	26,7 aA	33,3 aA	35,6 aA	24,4 aA
	Sem	40,0 aA	35,6 aA	31,1 aA	44,4 aA
Contaminação	Com	17,8 aA	13,3 aA	17,8 aA	13,3 aA
	Sem	11,1 aA	22,2 aA	13,3 aA	6,7aA
Calo	Com	0,0 aA	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB
	Sem	0,0 cA	15,5 bA	31,1 aA	20,0 abA
Explantes sem resposta	Com	10,0 aA	8,9 aA	19,8 aA	24,4 aA
	Sem	11,1 aA	2,2 aA	4,4 aB	2,2 aB

\*Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha e médias seguidas de letras maiúsculas iguais na coluna, dentro de cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância  $\leq 0,05$ .

A formação de planta completa sem fitorreguladores demonstra um satisfatório balanço hormonal endógeno nos explantes utilizados. Essa resposta pode ser atribuída ao fato das plantas estarem em pleno desenvolvimento vegetativo no período de coleta, pois mesmo sem a adição de fitorreguladores exógenos é possível a formação de brotações, folhas e raízes, o que é um bom indicativo para propagação desta espécie, tendo em vista a redução dos custos finais de produção das mudas propagadas.

A significativa formação de brotos sem raízes pode demonstrar que alguns explantes não apresentavam células determinadas para a formação destas. Neste caso, uma segunda fase de cultivo *in vitro*, onde as brotações são transferidas para meio de enraizamento com auxina no meio de cultura, principalmente ácido indolil butírico (AIB)

pode ser necessária para estimular a indução do enraizamento nas brotações. O enraizamento dos explantes está relacionado, entre outros fatores, a qualidade das partes aéreas utilizadas na micropropagação, pois embora a capacidade de multiplicação e a competência de enraizamento sejam características correlacionadas, elas não são adquiridas ao mesmo tempo pelas culturas. Para auxiliar no enraizamento de algumas espécies, o carvão ativado tem sido importante para simular a condição de escuro para que as raízes se desenvolvam (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Braga et al. (2012), trabalhando com que *V. litoralis*, obtiveram 100% de enraizamento usando meio de cultura contendo 50% dos sais de MS e baixas concentrações de BAP. Em estudo com *Melissa officinalis* L., as plantas presentes no meio MS, sem BAP, tiveram, em média, 2,2 raízes após três subcultivos (REIS et al., 2008). Já nas plantas presentes em meio contendo BAP não houve formação de raízes em nenhum dos subcultivos.

De acordo com Disarz e Martins-Corder (2009), a adição de carvão ativado no meio de cultura MS proporcionou maior multiplicação de gemas, área foliar, formação de raízes, menor formação de calos e ausência de clorose em explantes retirados de plântulas de *Acacia mearnsii* De Wild.

A presença de calos na base dos explantes cultivados em meio sem carvão ativado pode ser atribuída ao efeito fitotóxico causado pelo uso de citocinina e auxina exógena, aliado aos níveis endógenos desses fitorreguladores no explante. Nota-se que nos tratamentos em que o carvão ativado estava presente no meio não houve formação dos mesmos. De acordo com Pasqual et al. (2001), o carvão ativado auxilia na retenção de substâncias inibitórias do meio, ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, além de compostos orgânicos como auxinas e citocininas. Efeitos fitotóxicos de fitorreguladores já foram observados em outras espécies, como no caso do louro-pardo, onde a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA inibiu a multiplicação e o desenvolvimento das brotações, em meio de cultura WPM, em função do excesso de calosidade formada (MANTOVANI et al., 2001).

A média do número de raízes por planta completa bem como o número de folhas, foram superiores na ausência de fitorreguladores (Figura 7). Os resultados obtidos com *V. litoralis* corroboram Asmar et al. (2012), na multiplicação *in vitro* de *Lippia alba* (verbenaceae), os quais obtiveram maior número de folhas na ausência de BAP, enquanto que Blank et al. (2008), com a espécie *Lippia sidoides* observaram maior número de folhas

na concentração de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Em outro estudo realizado com *Verbena litoralis* coletadas na Cadeia do Espinhaço (MG) e micropropagadas em MS contendo 50% dos sais, a interação dos fitorreguladores BAP e ANA mostrou diferenças significativas para média do número de brotos em resposta ao aumento de BAP no meio de cultura. A melhor resposta neste caso foi obtida com  $7,5 \text{ }\mu\text{M}$  de BAP e  $0,005 \text{ }\mu\text{M}$  de ANA (BRAGA et al., 2012).

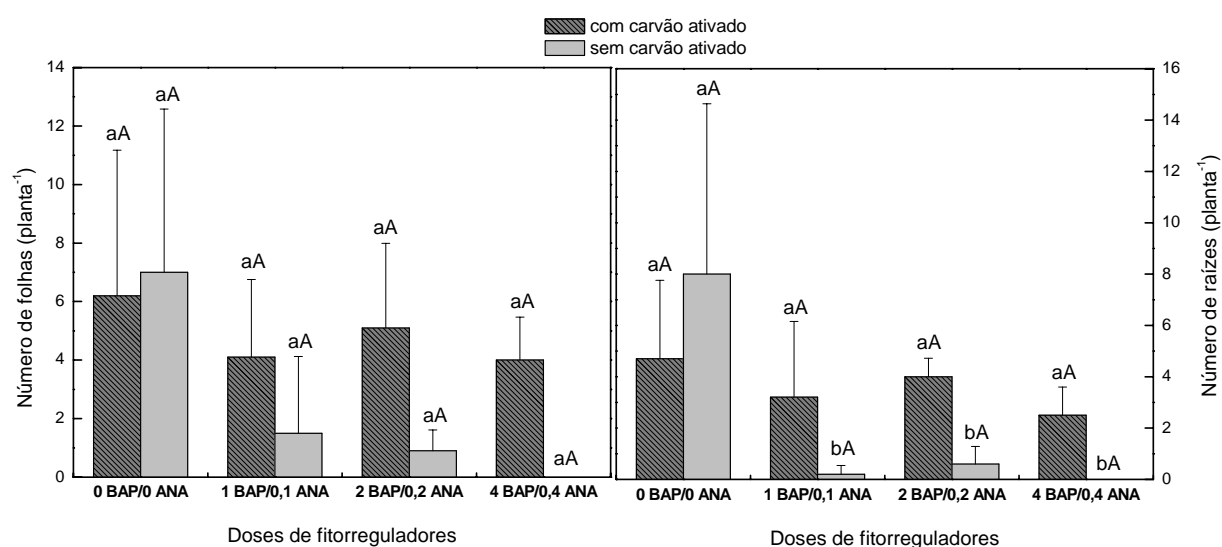


Figura 7 – Número de folhas e raízes de plantas completas oriundas da micropropagação de *Verbena litoralis* em MS completo, com 4 doses de fitorreguladores (BAP/ANA) e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de carvão ativado. \*Médias seguidas de letras maiúsculas se referem ao tratamento e letras minúsculas referem-se a presença e ausência de carvão ativado.

As diferentes respostas na micropropagação de plantas podem ser atribuídas aos níveis de hormônios presentes nos tecidos vegetais, os quais dependem de vários fatores, podendo diferir entre as espécies dentro de um gênero ou família.

A necessidade do uso de reguladores na regeneração *in vitro* é frequente e pode ser atribuída a fatores como tipo e estado fisiológico do explante (BORDÓN et al., 2000; MOREIRA-DIAS et al., 2000; SILVA et al., 2005; YUCESAN et al., 2007).

No presente estudo observou-se que os explantes apicais desenvolveram-se melhor e mais rapidamente quando comparado aos explantes com gemas axilares, inclusive permitindo que os explantes apicais chegassem ao estágio de floração (dados não demonstrados). Os explantes com gemas axilares estão sob o efeito da dominância apical e

por isso os apicais podem apresentar maior capacidade de crescimento. Isso é comum em plantas herbáceas ornamentais e olerícolas, enquanto que o contrário, em geral, vale para as espécies arbóreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em testes preliminares realizados com *V. litoralis* a fim de reduzir as taxas de oxidação e contaminação, observou-se diferenças marcantes em cada micropropagação realizada ao longo do ano. Os explantes retirados de plantas mantidas em casa de vegetação sob temperatura e umidade controlada apresentaram as melhores respostas de estabelecimento *in vitro*, principalmente quando as plantas encontravam-se em período vegetativo. Quando os segmentos eram obtidos de plantas mantidas no campo em períodos de alta umidade relativa do ar e temperaturas baixas ou em períodos de seca e na época de floração, o percentual de perda dos explantes em função da contaminação e oxidação era superior a 90% (dados não demonstrados). Resultados semelhantes foram obtidos para *Lippia sidoides* (Verbenaceae) onde observaram-se diferenças marcantes no estabelecimento *in vitro* dos explantes em relação às diferentes épocas do ano, o qual foi favorecido quando estes eram obtidos em época seca, quando a umidade relativa do ar é menor. Na época chuvosa ocorreu uma maior incidência de microorganismos, principalmente bactérias endógenas, além da oxidação (COSTA et al., 2007).

No que se refere à oxidação (Figura 8), o percentual foi elevado nas primeiras semanas para todos os tratamentos. Sabendo-se que *V. litoralis* acumula elevada concentração de polifenóis, os explantes inoculados foram mantidos durante 7 dias em escuro contínuo, na tentativa de reduzir a oxidação fenólica dos explantes que pode ocorrer, principalmente, logo após o isolamento dos mesmos. A alta oxidação e contaminação em explantes de *V. litoralis* na micropropagação também é relatada por Braga et al. (2012) e em outras espécies de Verbenaceae como *Lippia gracilis* Schauer (MARINHO et al., 2011), *Aloysia virgata* (FREITAS et al., 2009) e *Lippia sidoides* (COSTA et al., 2007), e segundo Marinho et al. (2011), o elevado percentual de oxidação pode ser atribuído a fatores relacionados à época do ano, idade do explante ou mecanismos de defesa da planta expressos através da produção de polifenóis, os quais sofrem a ação das polifenases provocando o escurecimento do meio e/ou do explante.

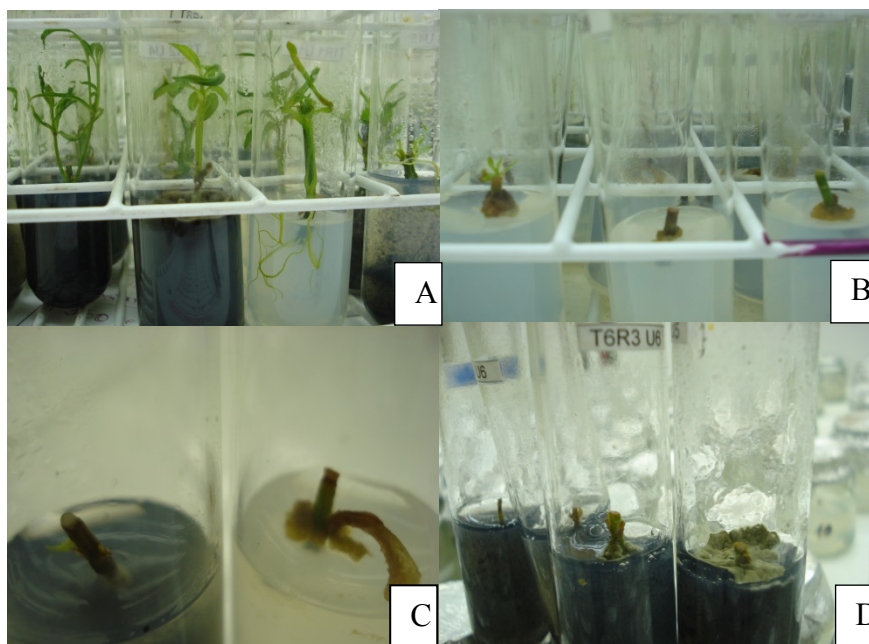


Figura 8 – Micropropagação de *Verbena litoralis* em meio MS completo, suplementado com 0,0 + 0,0, 1,0 + 0,1; 2,0 + 0,2; 4,0 + 0,4 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), respectivamente, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e presença e ausência de 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado.  
Fonte: Rosiana Bertê

#### 4.1.1 Parâmetros fisiológicos de crescimento, avaliação da fluorescência da clorofila e pigmentos fotossintéticos nos três distintos grupos

Para todas as variáveis de crescimento analisadas o grupo 3 (G3) foi superior aos demais grupos, sendo que o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) não diferiram entre si. O comprimento da haste variou entre 3,2 cm (G1) e 20,0 cm (G3), enquanto que a área foliar foi em média 3,0 vezes maior no G3. O número de folhas em plantas do G3 foi em média 1,5 vezes maior comparado aos outros dois grupos. Em relação à massa fresca da parte aérea, o G3 apresentou valor significativamente superior aos outros grupos, sendo 6,5 e 1,7 vezes maior comparado ao G1 e G2, respectivamente e a para massa fresca de raiz o valor encontrado no G3 foi em média 2,5 vezes maior (60 mg planta<sup>-1</sup>) (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros fisiológicos de crescimento, de fluorescência da clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos em plantas micropropagadas de *V. littoralis*.

Variável	Parâmetros de crescimento			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	P
Comprimento haste (cm)	3,2 <i>b</i> *	7,0 <i>b</i>	20,0 <i>a</i>	0,001
Área Foliar (cm <sup>2</sup> )	6,3 <i>b</i>	13,0 <i>b</i>	39,5 <i>a</i>	0,003
Número de folhas	13,0 <i>b</i>	10,7 <i>b</i>	30,0 <i>a</i>	0,035
Massa fresca PA (mg planta <sup>-1</sup> )	43,7 <i>b</i>	120,7 <i>b</i>	328,7 <i>a</i>	0,001
Massa fresca raiz (mg planta <sup>-1</sup> )	15,7 <i>b</i>	18,7 <i>b</i>	60,0 <i>a</i>	0,011
	Fluorescência da clorofila			
Fo	124 <i>a</i>	112 <i>a</i>	106 <i>a</i>	0,797
Fv/Fm	0,757 <i>a</i>	0,774 <i>a</i>	0,782 <i>a</i>	0,685
Y (II) <sub>125</sub>	0,198 <i>b</i>	0,293 <i>ab</i>	0,348 <i>a</i>	0,011
ETR <sub>1500</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	19,4 <i>b</i>	38,5 <i>b</i>	110,7 <i>a</i>	0,001
	Pigmentos Fotossintéticos			
Clorofila a (mg g <sup>-1</sup> MF)	1,82 <i>ab</i>	1,59 <i>b</i>	2,54 <i>a</i>	0,014
Clorofila b (mg g <sup>-1</sup> MF)	0,49 <i>b</i>	0,48 <i>b</i>	0,92 <i>a</i>	0,010
Chl total (mg g <sup>-1</sup> MF)	2,31 <i>b</i>	2,07 <i>b</i>	3,46 <i>a</i>	0,011
Chl a/ Chl b	3,78 <i>a</i>	3,32 <i>ab</i>	2,96 <i>b</i>	0,003
Carotenóides (mg g <sup>-1</sup> MF)	0,40 <i>ab</i>	0,36 <i>b</i>	0,57 <i>a</i>	0,016

\* Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha não diferem entre si para o teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ,  $n=3$ .

A fluorescência inicial (Fo) não variou entre os grupos e a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) ficou acima do valor considerado limite para situações de estresse que é de 0,7, segundo Bolhar-Nordenkampf e Öquist (1993), a média para os três grupos foi de 0,771. Resposta semelhante foi obtida por Cassana (2007) em plantas de batata-doce, que observou uma Fv/Fm de 0,773 nas avaliações realizadas ao término da cultura *in vitro* mantida sob fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e concentração de  $20 \text{g L}^{-1}$  de sacarose.

Segundo Krause e Weis (1991) a razão Fv/Fm demonstra a eficiência da captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II. Esta relação

também representa a eficiência quântica do transporte de elétrons através do fotossistema II, servindo como indicador para os danos fotoinibitórios que podem ser causados por fatores ambientais como temperatura, salinidade, radiação, seca, entre outros, que afetam o crescimento das plantas (HAVAUX et al., 1988).

Por outro lado a eficiência fotoquímica efetiva do PSII – Y(II), na radiação de 125  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , foi maior no G3 e menor no G1, evidenciando a condição de melhor utilização da energia em plantas mais desenvolvidas (G3), observada também em maiores radiações (Figura 9). Com o aumento da radiação (RFA) a eficiência fotoquímica efetiva do PSII (Y(II)) é reduzida, com maior intensidade no G1 e G2, enquanto no G3 passa de 0,35 na menor radiação para 0,20 em 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 9).

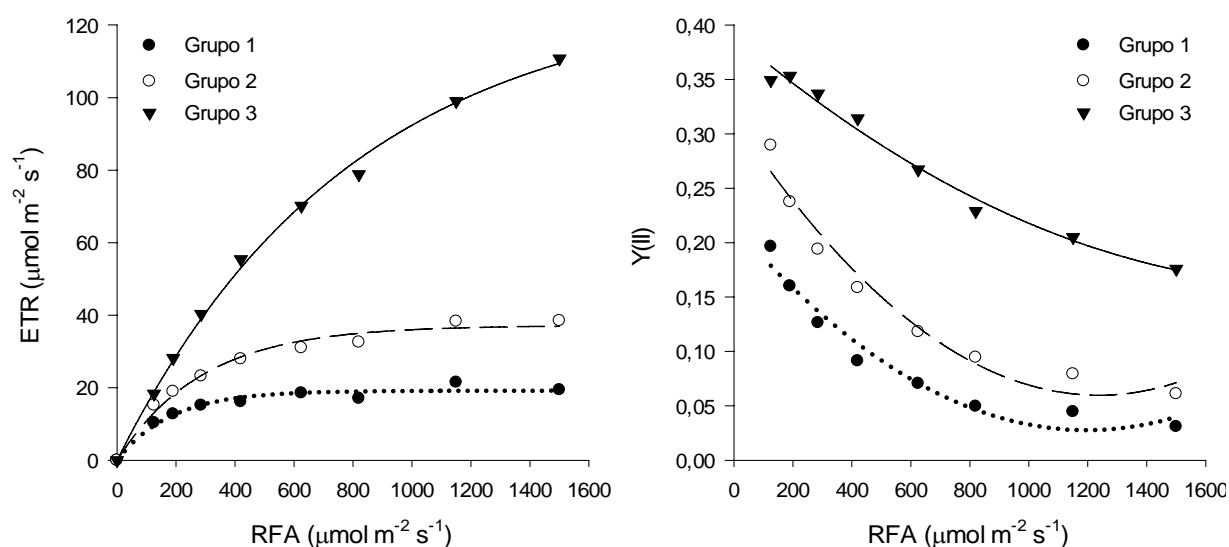


Figura 9 - Curvas de luz para taxa de transporte de elétrons (ETR,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  - A) e eficiência fotoquímica efetiva (Y(II) - B) nos três grupos de plantas de *V. littoralis* micropropagadas. RFA = Radiação Fotossinteticamente Ativa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

A eficiência fotoquímica efetiva (Y(II)) indica a fração de energia absorvida pela clorofila associada ao fotossistema II que foi utilizada em atividade fotoquímica e, como tal, informa a quantidade de elétrons transportados, sendo um indicativo da fotossíntese (LICHTENTHALER et al., 2005), permitindo assim, avaliar o rendimento e funcionamento do PSII (GENTY et al., 1989).

A partir desses conceitos nota-se que a análise da fluorescência oferece muitas vantagens como instrumento qualitativo para o estudo do transporte de elétrons durante a fotossíntese, pois através de um fluorômetro, é possível registrar o comportamento da fase inicial da fotossíntese, que é o transporte de elétrons no fotossistema II (ARALDI et al., 2011).

A taxa de transporte de elétrons (ETR) é uma medida da separação de cargas do centro de reação do PSII e é equivalente a: produção de quantum do PSII ( $Y(II)$ ) x medida da radiação fotossinteticamente ativa em  $\mu\text{mols elétrons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  x coeficiente de absorção da folha (0,84) x fração de luz absorvida pelo complexo antena do PSII (0,50). Na equação são usados valores-padrão, porém ambos os coeficientes de absorção e fração da luz absorvida pelo PSII podem variar. Embora 0,84 seja um valor médio para muitas espécies de plantas, trabalhos têm mostrado que o coeficiente de absorção da folha pode variar com a qualidade da luz, espécie, conteúdo de clorofila e refletância da folha. Para a fração de luz que é absorvida pelo complexo antena do PSII os trabalhos mostram que ocorre variação de acordo com a espécie, que se estende de 0,42 a 0,60 (LAISK; LORETO, 1996).

Em nosso estudo, valores significativamente maiores de ETR tanto na maior radiação ( $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) como a partir de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pode ser observado para o G3 (Tabela 2, Figura 9). A ETR aumentou de acordo com o aumento do comprimento da haste e área foliar, indicando que plantas mais desenvolvidas apresentaram maior ETR.

Um dos fatores ligados à eficiência fotossintética de plantas e conseqüentemente ao crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes é a clorofila, presente em todos os vegetais verdes (ENGEL; POGGIANI, 1991).

A adaptação das plantas às diferentes condições de irradiância pode ser atribuída à quantidade de clorofilas e nitrogênio foliar, já que a luz é considerada como um dos principais fatores associados ao metabolismo envolvendo a clorofila. Frequentemente a clorofila está em processo de síntese e degradação (foto-oxidação), no entanto, sob radiações intensas esse processo ocorre de forma pronunciada, enquanto sob condições de sombreamento, as concentrações foliares de clorofilas tendem a aumentar (KRAMER; KOZLOWSKI, 1979; WHATLEY; WHATLEY, 1982; BRAND, 1997; ALVARENGA et al., 1998).

A concentração de clorofila *a* (*Chl a*), clorofila *b* (*Chl b*), assim como de carotenóides foi maior no G3, porém, para *Chl a* e carotenóides este grupo não diferiu



significativamente do G1, devido provavelmente ao efeito de concentração destes pigmentos em razão do menor desenvolvimento das plantas deste grupo.

O conteúdo de clorofilas e carotenóides é um dos fatores ligados à eficiência fotossintética de plantas e, conseqüentemente, ao crescimento e à adaptabilidade a diversos ambientes. A concentração total desses pigmentos, a proporção entre eles e entre as clorofilas *a* e *b* mudam de acordo com a intensidade luminosa e desenvolvimento da planta. Os teores de clorofila nas folhas frequentemente são utilizados para estimar o potencial fotossintético das plantas, devido à capacidade de realizarem a absorção e transferência de energia luminosa. Uma planta com alta concentração de clorofila é capaz de atingir taxas fotossintéticas mais altas, pelo seu valor potencial de captação de “quanta” na unidade de tempo. Entretanto, nem sempre esta relação existe pois, a etapa bioquímica da fotossíntese pode limitar o processo (CHAPPELLE; KIM, 1992).

A taxa fotossintética em plantas micropropagadas ocorre em menor magnitude do que em plantas crescidas em condições normais, pois existem fatores que contribuem para a redução do desempenho fotossintético (VIÑA et al., 1999). Entre estes fatores pode-se incluir a baixa quantidade de radiação fotossinteticamente ativa, alta concentração de CO<sub>2</sub> e adição de fonte de carbono no meio de cultura (MOREIRA et al., 1999).

Durante o crescimento *in vitro*, os tecidos fotossintéticos podem aclimatar-se de acordo com o ambiente. Essa aclimatação se refere às mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas da planta em resposta às condições ambientais (VIÑA et al., 1999). Neste estudo, plantas mais desenvolvidas, com maior área foliar e comprimento da haste apresentaram maiores teores de pigmentos fotossintéticos e uso mais eficiente da energia, através de uma maior eficiência fotoquímica (Y(II)), indicando que com o desenvolvimento do aparato fotossintético, as plantas passam de uma condição heterotrófica para uma autotrófica.

#### 4.1.1.1 Aclimatização de *V. litoralis*

O objetivo da aclimatização de *V. litoralis* no presente estudo visou o crescimento homogêneo das plantas micropropagadas, a fim de obter a maior quantidade possível de massa seca para o preparo dos extratos bruto da parte aérea e raiz. Baseado nisso, todas as

plantas foram submetidas às mesmas condições de cultivo observando o tipo de solo, umidade, temperatura e luz. Assim, todas as variáveis analisadas não apresentaram diferenças entre os tratamentos para o nível de significância  $\leq 0,05$ .

Apesar das médias entre os tratamentos não diferirem para todas as variáveis estudadas, o tratamento T1 (controle - sem fitorreguladores e sem carvão ativado) utilizado na micropropagação, se destacou na média de sobrevivência entre as plantas aclimatizadas (22%) comparado aos demais tratamentos (em média 10,4%). Este resultado diferiu da porcentagem de sobrevivência das plantas quando micropropagadas, que se adaptaram, em geral, melhor na presença de carvão ativado.

A aclimatização é uma etapa que exige muitos cuidados para que as mudas obtidas *in vitro* não sejam perdidas nessa fase, pois um grande percentual das espécies micropropagadas não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa de vegetação ou campo (HARARIKA, 2003). O processo de aclimatização consiste em modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas necessárias às plantas para que possam sobreviver e crescer vigorosamente em um novo ambiente. Para a maior sobrevivência das plântulas cultivadas *in vitro*, estudos sugerem manter a sacarose no nível normalmente utilizado ( $30\text{g L}^{-1}$ ) ou, até mesmo, aumentá-lo numa fase anterior a aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CARVALHO et al., 1999; HARARIKA, 2003). Esse pré-condicionamento em altas concentrações de sacarose aumentaria as reservas de carboidratos armazenados pelas folhas, aumentando, assim, a energia disponível para as plântulas durante o processo de aclimatização (CALVETE, 1998; SKREBSKY et al., 2004).

Algumas pesquisas relatam que as mudas micropropagadas possuem mais sucesso na aclimatização quando são enraizadas *in vitro*, como é o caso de *Eriostemon myoporoides* (AULT, 1994). De acordo com George (1996), algumas espécies, quando enraizadas *in vitro*, crescem melhor, apresentam maior taxa de sobrevivência e emitem novas raízes mais rapidamente durante o período de aclimatização. Para Debergh (1991), as raízes formadas *in vitro* nas plantas micropropagadas, na maioria dos casos, morrem após duas semanas em substratos de aclimatização, e neste mesmo período novas raízes desenvolvem-se indicando que para algumas espécies, as raízes *in vitro* não são funcionais.

Assim, nota-se que o sucesso de um protocolo de micropropagação depende do desempenho dos explantes durante as fases de enraizamento *in vitro* e posteriormente na

aclimatização. Estas etapas exigem cuidados e detalhamentos metodológicos uma vez que o comportamento varia entre cada espécie.

No presente trabalho os resultados indicam que a aclimatização das plântulas de *V. litoralis* é possível mesmo sem a utilização de fitorreguladores na micropropagação, no entanto, o percentual de sobrevivência desta espécie foi baixo, ocorrendo perdas significativas na aclimatização (80 a 90%). Por isso sugere-se que outras metodologias sejam testadas para otimizar seu cultivo, pois é de relevante importância medicinal.

#### **4.2 Propagação vegetativa *ex vitro* através da estaquia**

De maneira geral, não obteve-se sucesso no experimento de estaquia (Figura 10) realizados para *V. litoralis* para a formação de plantas. As estacas não enraizaram e nem formaram folhas, e emitiram poucas brotações. No que se refere ao percentual de formação de brotos houve interação tripla entre os fatores. Conforme mostra a Tabela 3, não houve diferença significativa entre os tratamentos, entretanto, observa-se que as estacas basais apresentaram maior porcentagem de brotos (33,33%) quando submetidas por três horas em  $1.200 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB e cultivadas em substrato Plantmax e vermiculita na proporção 2:1. Esse substrato não diferiu da mistura plantmax e areia nessas condições. No entanto, as estacas basais mergulhadas em  $1200 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, mantidas em plantmax + casca de arroz e somente plantmax não brotaram.

Em outros experimentos de estaquia realizados com espécies de Verbenaceae também houve dificuldade na indução de enraizamento das estacas. Algumas das espécies testadas foram *Premna mucronata* Roxb, uma Verbenaceae de uso medicinal e espécies de *Lippia* não domesticadas provenientes da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais (HARTMAN et al., 2002). Segundo os autores, para o enraizamento destas espécies possivelmente seja necessário a presença de algum cofator de enraizamento associado ao AIB e/ou a outras auxinas.

A predominância de brotos na parte mediana ou basal, pode ser, segundo Taiz e Zeiger (2004) devido ao desbalanço hormonal acarretado pela remoção do ápice, resultando no crescimento das gemas laterais. O substrato também pode ser determinante para o sucesso do enraizamento de estacas, embora para algumas espécies vegetais, e

mesmo cultivares, não haja efeito do mesmo (POKORNY; AUSTIN, 1982). A utilização de areia como substrato é vantajosa, pois é de baixo custo, de fácil disponibilidade e apresenta características positivas quanto a drenagem, sendo seu uso adequado para estacas herbáceas e semilenhosas (FACHINELLO et al., 1994).

O elevado percentual de oxidação das estacas de *V. littoralis* impediu que as estacas se desenvolvessem, afetando a formação das raízes e folhas. De acordo com Marinho et al., (2011), fatores como a época do ano, a idade do explante, e até mesmo os mecanismos de defesa da planta, através da produção de polifenóis, os quais sofrem ação das polifenases, podem estar relacionados aos altos níveis de oxidação. Em estudos realizados com *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), estes mesmos autores observaram elevada oxidação nos explante de quando realizada sua micropropagação. Outros trabalhos relacionados à propagação vegetativa de algumas espécies de *Lippia* já foram realizados e os resultados apontam para baixos percentuais de enraizamento e de sobrevivência de mudas produzidas a partir de estacas (CAPOTE et al., 1999; JULIANI JR. et al., 1999).

Tabela 3 – Porcentagem de brotos nas estacas apicais e basais submetidas a doses de ácido indolil butírico (AIB) por três horas antes do cultivo em diferentes substratos, sendo as misturas destes na proporção 2:1. Usou-se estacas herbáceas sem folhas com 12 cm de comprimento e espessura padronizada em 2 a 5 mm de diâmetro. Cada tratamento teve três repetições e seis estacas por repetição.

<b>Porcentagem de Brotações</b>			
<b>Tipo de substrato</b>	<b>Estaca apical</b>		
	<b>Doses de AIB (mg L<sup>-1</sup>)</b>		
	<b>0</b>	<b>1200</b>	<b>2400</b>
<b>Plantmax + Vermiculita</b>	11,11 a A*	0,00 a B	0,00 a A
<b>Plantmax + Areia</b>	16,66 a A	0,00 a A	5,55 a A
<b>Plantmax + Casca de arroz</b>	0,00 a A	5,55 a A	0,00 a A
<b>Plantmax</b>	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A
<b>Tipo de substrato</b>	<b>Estaca basal</b>		
	<b>Doses de AIB (mg L<sup>-1</sup>)</b>		
	<b>0</b>	<b>1200</b>	<b>2400</b>
<b>Plantmax + Vermiculita</b>	0,00 a A	33,33 a A	11,11 a A
<b>Plantmax + Areia</b>	0,00 a A	16,66 ab A	0,00 a A
<b>Plantmax + Casca de arroz</b>	0,00 a A	0,00 b A	0,00 a A
<b>Plantmax</b>	5,55 a A	0,00 b A	0,00 a A

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna indicam comparação entre tipo de substrato nas estacas apicais e basais com as diferentes doses de AIB, enquanto que letras maiúsculas na linha indicam comparação entre as doses de AIB dentro do tipo de estaca e substrato. Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

De acordo com Fachinello et al. (2005), as auxinas são os reguladores vegetais que possuem ação na formação de raízes adventícias, ativação de células do câmbio e promoção do crescimento de plantas. Aliado a isso, existe os cofatores do enraizamento que são de ocorrência natural e atuam em conjunto com as auxinas no processo de formação de raízes, como é o caso dos compostos fenólicos (HARTMANN et al., 2002; FACHINELLO et al., 2005).

Os resultados obtidos para a formação de raízes e brotos podem ser atribuídos a época de coleta dos explantes, o estado fitossanitário influenciado pelo ambiente e idade das plantas. No que se refere ao uso de estaquia com plantas medicinais pouco se sabe, porém em alguns trabalhos utilizando Verbenaceas como o alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), Mendonça (1997), constatou que sob sombrite o melhor tipo de estaca foi a herbácea com a presença de folhas.

Os resultados insatisfatórios obtidos no trabalho em questão podem ter sido influenciados pelas baixas reservas nutricionais das estacas. A baixa quantidade de carboidratos, não fornecerá a energia necessária para que ocorra bom enraizamento das estacas (VEIERSKOV, 1988; MAYER et al., 2006), pois a emissão de raízes ocorre devido a interação entre fatores endógenos e das condições ambientais proporcionadas ao enraizamento (NICOLOSO et al., 2001). Em estudo com plantas de *L. alba* encontrados por Biasi e Costa (2003) e em plantas de *Pfaffia glomerata* verificados por Nicoloso et al. (2001) foi relatado que as estacas semilenhosas por serem mais espessas possuem melhores condições de sobrevivência que as herbáceas, por apresentarem elevadas quantidades de assimilados e, por isso podem produzir raízes sob condições de fraca luminosidade.

Ouros estudos promovidos no Brasil e no exterior demonstraram que a utilização, no plantio, de estacas herbáceas, semilenhosas e lenhosas, com folha presente ou ausente, assim como a época de coleta, influenciam consideravelmente no enraizamento (BEZERRA; LEDERMAN, 1995). Portanto, sugere-se que novos testes de propagação vegetativa sejam realizados com *V. littoralis*, utilizando o maior número possível de

variáveis analisadas a fim de que se obtenha respostas consistentes sobre essa forma de propagação.



Figura 10 – Estacas apical e basal mergulhadas em ácido-indolbutírico (AIB), nas concentrações 0; 1200 e 2400 g L<sup>-1</sup> durante três horas e transferidas para bandejas contendo substratos Plantmax®; Plantmax®:Vermiculita; Plantamax®:Areia e Plantamax®:Casca de arroz, na proporção 2:1. As estacas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas utilizando lâmpadas fluorescentes brancas (RFA de ~36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).  
Fonte: Rosiana Bertê

### 4.3 Determinações fitoquímicas em *V. litoralis*

#### 4.3.1 Rendimento dos extratos

Apartir de 2,26 g de partes aéreas e 0,34 g de raízes de *V litoralis* foi obtido 0,1319 mg e 0,0399 mg de extrato seco, respectivamente.

#### 4.3.2 Doseamentos

Os doseamentos de polifenóis, flavonóides e cumarinas foram realizados nos extratos brutos das partes aéreas e das raízes de *V. litoralis* micropropagada. Os resultados dos doseamentos nos extratos das partes aéreas e das raízes encontram-se na tabela 4.

A presença de polifenóis totais nas partes aéreas de *V. litoralis* também é confirmada em outras espécies desta família como *Cordia verbenacea* D.C. e *Lippia grandis* Schau (MICHIELIN, 2009; DAMASCENO, et al., 2002). A presença de flavonóides e cumarinas, entre outros metabólitos nesta espécie, é confirmada por Souza (2005). A curva analítica do padrão cumarina doseado demonstra a relação linear entre a concentração e a absorvância deste padrão, estando de acordo com a ANVISA (2003) que determina que o coeficiente de correlação (r) apresente um valor mínimo de 0,99.

A presença de polifenóis e flavonóides pode estar relacionada à capacidade antioxidante de *V. litoralis*, que pode ser considerada satisfatória por se tratar de um extrato bruto. Este resultado, juntamente com os dados levantados na revisão bibliográfica, justifica o direcionamento dos estudos cromatográficos para grupos fenólicos de metabólitos secundários.

Tabela 4 – Conteúdo de Polifenóis totais, Flavonóides e Cumarinas em extratos de partes aéreas e raízes de *V. litoralis* oriundas da aclimatização.

<b>Metab. Secundário</b>	<b>Partes Aéreas (mg/g)</b>	<b>Raízes (mg/g)</b>	<b>P*</b>
Polifenóis	872,53 ± 6,13	————	————
Flavonóides	211,94 ± 4,38	19,96 ± 2,97	0,001
Cumarina	27,9 ± 0,006	9,01 ± 0,048	0,001

\*Médias com nível de significância  $\leq 0,01$  diferem a 1% de probabilidade de erro.

#### 4.4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

##### 4.3.2.1 Quantificação de rutina e quercetina por CLAE

Os extratos das partes aéreas e raízes de *V. littoralis*, na concentração de 5mg/ml apresentaram quercetina com teores de 91,84 mg g<sup>-1</sup> e 91,01 mg g<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 11). Os teores de rutina nas partes aéreas e raízes também foram significativos, resultando em 47,20 mg g<sup>-1</sup> e 46,52 mg g<sup>-1</sup> respectivamente. Estes metabólitos foram obtidos nos tempos de retenção de 19,0 e 13,5 minutos respectivamente. (Tabela 5).

Tabela 5 – Teor de Flavonóides e Cumarinas em extratos de partes aéreas e raízes de *V. littoralis* oriundas da aclimatização.

<b>Metab. Secundário</b>	<b>Partes Aéreas (mg/g)</b>	<b>Raízes (mg/g)</b>	<b>P*</b>
Quercetina	91,84 ± 0,010	91,79 ± 0,001	0,004
Rutina	47,2 ± 0,003	46,52 ± 0,001	0,001
Cumarina	0,312 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,001

\*Médias com nível de significância  $\leq 0,01$  não diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



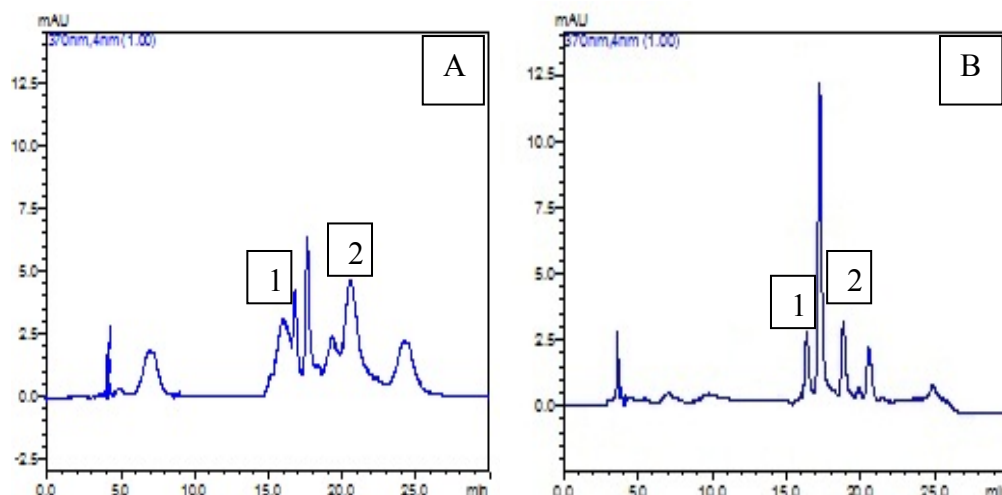


Figura 11 – A: Cromatograma das partes aéreas de *V. litoralis*. (1) Quercetina (2) Rutina; B: Cromatograma das raízes de *V. litoralis*. (1) Quercetina (2) Rutina.

Em um estudo realizado concomitantemente, quantificou-se os mesmos compostos flavonóidicos das plantas de *V. litoralis* coletadas em seu habitat natural. As concentrações encontradas para quercetina foram de  $94,64 \text{ mg g}^{-1}$  e rutina  $55,78 \text{ mg g}^{-1}$ , valores que são muito próximos aos encontrados nas plantas micropropagadas. O percentual de diferença entre quercetina e rutinas nos extratos das plantas de habitat natural e as plantas micropropagadas foi de 3% e 18% respectivamente.

Em *V. litoralis* já foram identificados os flavonóides verbenachalcona, littoralisona e littorachalcona (LI et al., 2001a, b; 2003a), bem como iridoides por Castro-Gamboa e Castro (2004).

As concentrações de quercetina de *V. litoralis* são maiores que as encontrados em chás como o chá-verde e chá preto que apresentam quantidades que variam entre 2,5 e  $3,4 \text{ mg g}^{-1}$  de folha seca (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

Estes teores de rutina e quercetina nos extratos das plantas micropropagadas, demonstram que a espécie *V. litoralis* possui potencial para propagação. A vasta atividade medicinal desta planta relaciona-se com a presença substancias polifenólicas como os flavonóides que apresentam atividade antioxidante provavelmente devido a presença dos flavonoides entre outros, a rutina, quercetina e compostos como iridóides glicosídicos e feniletanóides.

#### 4.3.2.2 Quantificação de cumarina por (CLAE)

Os teores de cumarina obtidos através de CLAE (Figura 12) foram de 0,31 mg g<sup>-1</sup> no extrato das partes aéreas, enquanto que nas raízes a concentração foi de 0,25 mg g<sup>-1</sup> (Tabela 5).

Os teores da cumarina quantificados nas partes aéreas de *V. littoralis* obtidas no habitat natural foram de 0,55 mg g<sup>-1</sup> os quais comparados com as plantas micropropagadas foram 77% maiores. Dessa forma, houve diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) na concentração de cumarinas no extrato das plantas de habitat natural em comparação às plantas micropropagadas, o que pode ser atribuído a radiação solar.

*M. glomerata* cultivadas em diferentes tratamentos de radiação, em pleno sol, foram obtidos os maiores teores de cumarina (CASTRO et al., 2006). Souza et al., (2011), atribuem esses resultados à alterações morfofisiológicas da folha de *M. glomerata* sob diferentes níveis de radiação, o que demonstra uma associação estreita entre a adaptação anatômica e a eficiência em processos fisiológicos.

No entanto, é frequente e cientificamente comprovado que plantas cultivadas a campo possuem maior concentração de metabólitos secundários. Este fato ocorre devido ao estresse sofrido em função dos raios ultravioletas, herbivoria, temperatura, estresse hídrico e variabilidade sazonal que podem influenciar nos teores de compostos secundários. De acordo com Waterman (1989), Heil e Bostock (2002), os danos causados a plantas por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patógenos, freqüentemente levam a uma resposta bioquímica, que reduz a aceitabilidade do órgão ou de todo o organismo a ataques futuros.

A idade do vegetal também pode estar envolvida nos conteúdos de metabólitos secundários. Em *Digitalis obscura* micropropagada foi observado que os conteúdos de lanatosídeo A e de digitoxina aumentam consideravelmente com o desenvolvimento da planta (GAVIDIA; PEREZ-BERMÚDEZ, 1997). No entanto, Gobbo-Neto e Lopes (2007) afirmam que a constância de concentrações de metabólitos secundários no metabolismo vegetal é rara.

Extratos diclorometânicos das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel mostraram que a planta propagada por estaca produziu cumarina e ácido caurenóico, enquanto que o material micropropagado acumulou apenas cumarina (SOUZA et al., 2011). A maior produção de determinado metabólito secundário em plantas micropropagadas, como no

caso de Ipeca onde foi encontrado 1,8% a mais de emetina demonstra que há maior produção de um ou outro metabólito de acordo com a espécie e ou os metabólitos analisados.

A micropropagação pode servir como uma ferramenta viável para a produção de metabólitos secundários, além de auxiliar na obtenção de um grande número de espécies sadias e na preservação do material genético vegetal. No entanto são necessários estudos para a otimização da propagação das plantas para aumentar os teores desses compostos secundários, pois dependendo da molécula e do tecido estudado, a síntese e o acúmulo dos compostos do metabolismo secundários podem diferir no cultivo *in vitro* quando comparados ao cultivo *in vivo* (KIRAKOSYAN et al., 2000).

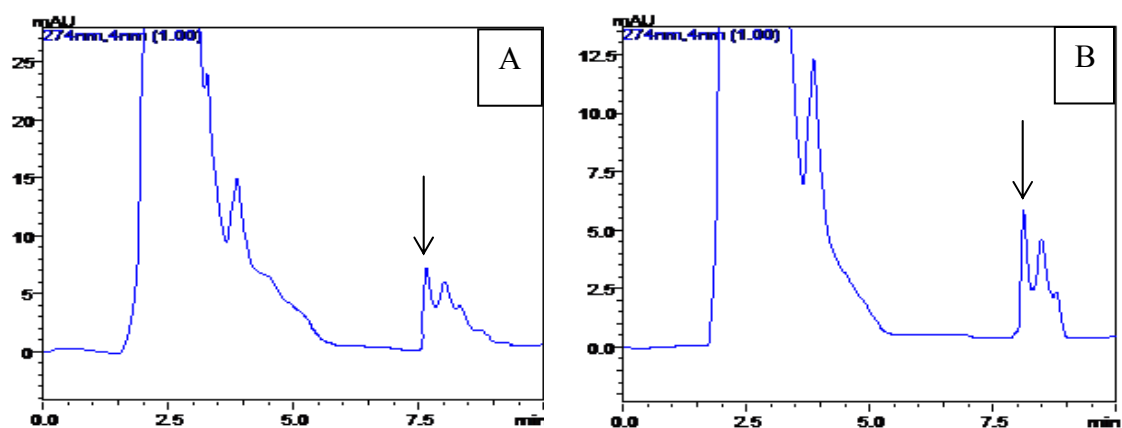


Figura 12 – A: Cromatograma das partes aéreas de *V. litoralis* indicando a presença de cumarina; B: Cromatograma das raízes de *V. litoralis* indicando a presença de cumarina.

## 5 CONCLUSÕES

- A micropropagação de *V. litoralis* pode ser realizada sem a utilização de fitorreguladores (BAP/ANA) e carvão ativado, utilizando meio de cultura completo.
- O carvão ativado ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) contribuiu para o enraizamento dos explantes, na sobrevivência e na diminuição da formação de calos.
- O carvão ativado ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) não contribuiu para a diminuição da oxidação.
- A média do número de raízes e folhas nas plantas completas, foi maior na ausência de fitorreguladores.
- A formação de calos na base do explante nesta espécie foi favorecida por elevadas concentrações de fitorreguladores.
- A contaminação endógena e a oxidação impediram a obtenção de maior número de plantas.
- A taxa de transporte de elétrons (ETR,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e eficiência fotoquímica efetiva (Y(II)) apresentaram-se mais eficientes no grupo 3, o qual era formado por plantas maiores.
- A oxidação das estacas dificultou a propagação destas.
- As estacas basais apresentaram maior porcentagem de brotos (33,33%) quando submetidas em  $1.200 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB e cultivadas em substrato Plantmax e vermiculita na proporção 2:1.

- As dosagens de polifenóis, flavonóides e cumarinas estão de acordo com outros estudos já realizados com esta espécie.
- As plantas micropropagadas de *V. litoralis* apresentaram teores relevantes de rutina e quercetina quando comparadas a espécie obtida diretamente do campo.
- Houve biossíntese de cumarina nas plantas de *V. litoralis* propagadas *in vitro*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que o estabelecimento *in vitro* de *V. littoralis* pode ser efetuado, contudo, novos testes devem ser realizados a fim de monitorar o melhor período para a coleta dos explantes. Entre todos os testes realizados a fim de otimizar a micropropagação da espécie em estudo, as melhores respostas foram obtidas quando os explantes foram coletados das plantas que apresentavam novas brotações e ainda não encontravam-se em período de floração. Além disso, nota-se a importância do controle da umidade nas plantas matrizes mantidas em casa de vegetação antes da realização dos experimentos, pois a mesma propicia a presença de contaminação *in vitro*. Assim, as observações realizadas durante o período dos experimentos corroboram com Grattapaglia e Machado (1998) que afirmam que a retirada dos explantes deve ser feita preferencialmente a partir de brotações novas que são formadas durante a fase de crescimento da planta, nos meses mais quentes do ano, como a primavera e o verão e após o final do período de dormência.

No presente estudo percebeu-se que para a obtenção uniforme de plantas, não são necessárias elevadas concentrações de fitorreguladores. O carvão ativado adicionado ao meio de cultivo prejudicou a formação de maior número de plantas, no entanto favoreceu o crescimento uniforme de raízes em todos os tratamentos e evitou a formação de calos. Além disso, os explantes inoculados em meio MS com ausência de fitorreguladores formaram bom percentual de plantas completas, fato que auxilia na obtenção de mudas com custo reduzido.

Quanto a propagação vegetativa, acredita-se que esta seja possível, no entanto, há necessidade de aprofundar os estudos sobre a realização de experimentos de estaquia com *V. littoralis*.

A análise de fluorescência da clorofila e dos pigmentos fotossintéticos nos mostram que cultivo *in vitro* permite que as plantas desenvolvam seu aparato fotossintético em um período superior a 60 dias. Fato pode ser confirmado nas plantas de maior altura e número de folhas, característica que facilitou a adaptação das mesmas na fase de aclimatização.

Com os resultados obtidos na análise fitoquímica, pode-se perceber que a micropropagação pode auxiliar na obtenção de compostos secundários, pois os mesmos foram produzidos em concentrações satisfatórias. A confirmação se dá pela presença de polifenóis, quercetina e rutina e cumarinas no extrato das raízes e parte aérea de *V. littoralis*. O potencial antioxidante atribuído a esta espécie, confirma a presença de polifenóis constatado também por outros pesquisadores.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. **Propagação in vivo e in vitro, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – UFL, Lavras, 101f, 1998.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 472-508, 2008.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 114-140, 2007.
- ALVARENGA, A. A. et al. Desenvolvimento de mudas de Guarea [*Guarea guidonea* (L.) Sleumer]. **Revista Daphne**, v. 8, n. 3, p. 22-26, 1998.
- AMARAL, F. M. M. et al. **Plants and chemical constituents with giardicidal activity**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.16 (Supl.): 696-720, 2006.
- APG (The Angiosperm Phylogeny Group) III. Un update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, GB, v. 161, p. 105-121, 2009.
- ARALDI, R. et al. Efeitos na taxa de transporte de elétrons de plantas daninhas após aplicação de amicarbazone. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 647-653, 2011.
- ASMAR, S. A. et al. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia Alba*[(Mill.) N.E.Brown]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, p.149-153, 2012.
- AULT, J. R. *In vitro* propagation of *Eriostemon myoporoides* and *Eriostemon 'Stardust'*. **HortScience**, v. 29, n. 6, p. 686-688, 1994.
- BARBOSA-FILHO, J. M. et al. **Sources of alpha-, beta, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.18: 135-154, 2008.



BARREIRO, E. A. Importância da Síntese de Fármacos na Produção de Medicamentos. **Química Nova**, v. 14, p. 179-188, 1991.

BARRUETO CID, L. P. **Citocininas**. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). Introdução aos hormônios vegetais. Brasília: Embrapa/Cenargen, p. 55-81, 2000.

BEZERRA, J. E. F.; LEDDERMAN, I. E. **Propagação vegetativa por estaquia da aceroleira**. In: SÃO JOSÉ, A. R.; ALVES, R. E. Acerola no Brasil, produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, p. 32-40, 1995.

BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 455-459, 2003.

BIAVATTI, M. et al. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.17, p. 640-653, 2007.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonóides and isoflavonoids. **Pharmacology Therapeutics**, v. 90, p. 157-177, 2001.

BLANK, A. F. et al. *In vitro* establishment of *pepper rosmarin* nodal segments. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 255-258, 2008.

BOLHÀR- NORDENKAMPF, H. R., ÖQUIST, G. O.: Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. – In: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhâr-Nordenkampf, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (ed.): Photosynthesis and Production in a Changing Environment. **A Field and Laboratory Manual**. Pp. 193-206. Chapman & Hall, London – Glasgow – New York – Tokyo – Melbourne – Madras 1993.

BONZANI, N. E.; FILIPPA, E. M.; BARBOSA, G. E. Estudio anatómico comparativo de tallo en algunas especies de Verbenaceae. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México**. Serie Botânica, v.74, p. 31-45, 2003.

BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; GARCÍA-LUIS, A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of Citrus rootstocks. **Annals of Botany**, v. 86, p. 159-166, 2000.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. **Biotecnologia de plantas**. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. (Eds.). Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal. Maringá: Eduem, p. 227-253, 2002

BRAGA, V. F. et al. Micropropagation, antinociceptive and antioxidant activities of extracts of *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n.1, p. 139-148, Feb. 24, 2012.

BRAND, M. H. Shade influences plant growth, leafcolor and chlorophyll content of *Kalmia latifolia* L.cultivars. **Horticultural Science**, v. 32, n. 2, p. 206-208, 1997.

BRANDEL, M.; SCHÜTZ, W. Seasonal dormancy patterns and stratification requirements in seeds of *Verbena officinalis* L. **Basicand App Eco**, v. 4, p. 329-37, 2003.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutritions Reviews**. V. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BUENO, O. L.; LEONHARDT, C. Distribuição e potencial paisagístico dos gêneros *Citharexylum* L. e *Verbenoxylum* Tronc. no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**: Série Botânica. Porto Alegre, v. 66, n. 1, p. 47-60, jul. 2011.

CÁCERES, A. “**Plantas de Uso Medicinal em Guatemala**”. Editorial Universitária, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, p. 369s, 1999.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPQ, v. 1, p. 87-132, 1998.

CALVETE, E. O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv. campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 108 f., 1998.

CANTINO, P. D. Towards a phylogenetic classification of Labiatae. In: HARLEY, R.M., REYNOLDS, T. (Ed.) **Advances in Labiate science**. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 27-37, 1992.

CAPOTE, A. et al. Micropropagación y regeneración de plantas *in vitro* de oreganillo *Lippia micromera* Schau. **Revista Del Jardín Botánico Nacional**, v. 10, p.139-42, 1999.

CARVALHO, G. R. et al. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas “*in vitro*”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, 1999.

CASSANA, F. F. **Caracterização fotossintética e do desenvolvimento de plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* e aclimatizadas**. 2007. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

CASTRO, E. M. et al. Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (Guaco) under different irradiation levels and photoperiod. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 25, n. 3, p. 387-392, 2006.

CASTRO-GAMBOA, I.; CASTRO, O. Iridoids from the aerial parts of *Verbena litoralis* (Verbenaceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2369-2372, 2004.

CATALÁN, C. A. et al. **Phytochemistry**, Oxford, v. 22, p. 1507-1508, 1983

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng. (“guaco”) Leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 706-709, 2001.

CHANDRA, S.; GONZALES, M. E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHAPPELLE, E. W.; KIM, M. S. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): na algorithm for a remotesestimation of the concentracions of clorophyll A, chorophyllB, and carotenoids in soybean leaves. **Remote Sensing of Environment**, New York, v. 39, p. 239- 247, 1992.

CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture Narcissus. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 1, p. 22-27, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, A. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Editora da UNICAMP, 1997.

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

DAMASCENO, E. I. T. et al. Capacidade antioxidante de extratos de *Lippia grandis* Schau. com ocorrência na Serra de Carajás, PA. **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ**. Poços de Caldas, MG, 2002.

DEBERGH, P. C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 291-300, 1991.

DEEPAK, M.; HANDA, S. S. **Phytochemistry**. v. 49, p. 269- 271, 1998.

DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DISARZ, R.; MARTINS-CORDER, M. P. R. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* de Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 33, n. 4, p. 599-606, 2009.

DORNAS, W. C. et al. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 488-500, 2009.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n.1, p. 39-45, 1991.

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

FACHINELLO, J. C. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPel, 179 p., 1994.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 221 p., 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2005. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, sexto fascículo, 4. Ed., 2005.

FERGUSON, L. R. **Role of plant polyphenols in genomic stability**. Mutation Research., v. 475, p. 89-111, 2001.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, 2006.

FONT QUER, P. **Plantas Medicinales**. Barcelona: Labor. 1033p. il. 1978.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 183-185, 2001.

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, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FREITAS, et al. Floristic of sandy soil grasslands in southwestern Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 112-130, jan./mar. 2010.

FREITAS, R. M. O. de, et al. Efeito dos tratamentos de oxidação em *Aloysia virgata*. **Revista Caatinga** (UFERSA), v. 22, n. 1, 2009.

FROELICH, S. et al. Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.)Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 517-520, 2008.

GAN, F; YE, R. New approach on similarity of chromatographic fingerprint of herbal medicine. **Journal of Chromatography, A**, v. 1104, p. 100-105, 2006.

GALRET, T.M.B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brasil**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós Graduação em Botânica, Dissertação de Mestrado. 220p. 2000.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. **Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry**. Review. *Biotechnol. Adv.*, v. 23, p.471- 499, 2005.

GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P. Cardenolides of *Digitalis obscura*: the effect of phosphate and manganese on growth and productivity of shoot-tip cultures. *Phytochemistry* **45**: 81–85, 1997.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochemistry and Biophysical Acta*, v. 990, p. 1243-1250, 1989.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture; Part 2 in practice**. 2ed. Edington: Exegetics, 1361 p., 1996.

GHISALBERTI, E. L. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia*, v. 71, n. 5, p. 467-86, sept. 2000.

GIEHL, E. L. H. (coordenador). **Flora digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Disponível em: <http://ufrgs.br/floradigital>, 2012.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, n. 18, p. 115-135, 2004.

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

GÓMEZ - SERRANILLOS, M. P.; CARRETERO, M. P.; VILLAR, A.; Analytical study and analgesic activity of oripavine from *Papaver somniferum* L. *Phytotherapy Research*, vol. 2, 346- 349, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA - SPI/ EMBRAPA - CNPH, p. 864, 1998.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARARIKA, B. N. **Acclimatization of tissue-cultured plants**. Current Science,

Stamford, v. 85, n.12, p.1704-1712, 2003.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice–Hall, 7.ed. 880 p., 2002.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. **Annals of Botany**, v. 89, 503p., 2002.

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.1, p. 572-584, 2002.

HINOJOSA, G. F. **Auxinas**. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). Introdução aos hormôniosvegetais. Brasília: Embrapa/Cenargen, p. 15-53, 2000.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudasmicropropagadas dos porta-enxertos de maceira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’**. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUES, M. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 142-151, 2007.

JESUS, N. Z. T. et al. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlceras e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 130-139, 2009.

JULIANI JÚNIOR, R. et al. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 175-9, 1999.

KADLECEK, P.; RANK, B.; TICHÁ, I. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* grown plantlets. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p. 1017-1024, 2003.

KIRAKOSYAN, A. et al. Stimulation of production of hipericins by manman in *Hipericum perforatum* shoot cultures. **Phytochemistry**, v. 53, p. 345-348, 2000.

KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

KRAMER, P. J.; KOSLOWSKI, T. **Physiology of woods plants**. New York: Academic, 811 p., 1979.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.

LEITÃO, F. et al. Urban ethnobotany in Petrópolis and Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brazil). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 333-342, 2009.

LEONHARDT, C.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA F. A. Aspectos morfológicos e fisiológicos da germinação de tarumã-de-espinho, *Citharexylum montevidense* (Spreng) Mold. – Verbenaceae. **Lheringia**. Série Botânica, v. 57, n.1, p. 99-112, il. 2002.

LI, Y. et al. Verbenachalcone, a novel dimeric dihydrochalcone with potentiating activity on nerve growth factor-action from *Verbena littoralis*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 806-808, 2001a.

LI, Y. et al. Littoralisone a novel neuritogenic iridolactone having an unprecedented heptacyclic skeleton including four- and nine-membered rings consisting of glucose from *Verbena littoralis*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, p. 2165-2167, 2001b.

LI, Y. et al. A new iridoid glycoside with nerve growth factor-potentiating activity, gelsemiol 69-trans caffeoyl-1-glucoside, from *Verbena littoralis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 9, p. 1103-1105, 2003.

LI, Y. et al. Littorachalcone, a new enhancer of NGF-mediated neurite outgrowth, from *Verbena littoralis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 872-874, 2003a.

LIANG, Y. Z.; XIEP, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography, B**, v. 812, p. 53-70, 2004.

LICHTENTHALER, H. K. et al. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. **Photosynthetica**, v. 43, p. 355-369, 2005.



LIMA, E. O. et al. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.7, p. 251-258, 2003.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil:terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudosda flora. São Paulo: 3a ed., 807p, 2000.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustos, herbáceas etrepadeiras**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1118p.,1999.

MALDANER L., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**. vol. 32, No. 1, 214-222, 2009.

MANTOVANI, N. C; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louropardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida Ex Steudel). **Ciência Florestal**, v. 11, p. 93-101, 2001.

MARODIN, S.M. **Plantas utilizadas como medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Botânica, Dissertação de Mestrado. 413p. 2000.

MARIATH, I. R. et al. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 158-192, 2009.

MARINHO, M. J. M. et al. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.13, n. 2, p. 246-252, 2011.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Revisión: Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalar**., Madrid, v.17, n.6, pp.271-278, 2002.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 380-385, 2006.

MATSUMOTO, K. **Giberelinas**. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). Introdução aos hormônios vegetais. Brasília: Embrapa/Cenargen, p. 83-105, 2000.

MAYER, J. L. S.; BIASI, L. A.; BONA, C. Capacidade de enraizamento de estacas de quatro cultivares de *Vitis* L. (Vitaceae) relacionada com os aspectos anatômicos. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 563-568, 2006.

MENDONÇA, M. C. S. **Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)**. Tese mestrado, UFC/Fortaleza-CE, p. 43., 1997.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons 2**. Oxford: Clarendon Press. p. 1041-1053, 1972.

MICHIELIN, E. M. Z. **Obtenção de extrato de Erva-baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: Medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC, 235 p. 2009.

MOREIRA, F. M.; HARISCAIN-LAFITTE, P.; MARASCHIN, M.; LIMA-DA-SILVA, A. Teor de clorofila em porta-enxertos de videira *in vitro* e em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11(supl.), p. 30, 1999.

MOREIRA-DIAS, J. M. et al. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, v. 85, p.103-110, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n. 3, p. 473-97, 1962.

NAIKA, H. R., KRISHNA, V. Plant regeneration from callus culture of *Clematis gouriana* Roxb. – a rare medicinal plant. **Turkish Journal Biology**, v. 32, p. 99-103, 2008.

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

NICOLOSO, F. T.; CASSOL, L. F.; FORTUNATO, R. P. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 57-60, 2001.

OCAMPO, R. A.; MAFFIOLI, A. **El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica.** San José: Litografía e Imprenta Lil. San José: Costa Rica, v.1, 2 ed., p.79-81, 1987.

OLIVEIRA, A. L. F. et al. Contribuição à farmacognosia de Verbenaceae II-Indicação de bioatividade em extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, n. 4, p. 83-84, 1992.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 466-476, 2007.

OUZONIDOU, G; ILIAS, I. Hormone-induced protection of sunflower photosynthetic apparatus against copper toxicity. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 223-228, 2005.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações, meios de cultura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 74 p. 2001.

PASQUAL, M; RAMOS, J. D.; DUTRA, L. F. **Aplicações no melhoramento genético de plantas.** Monografia – (Especialização). Universidade Federal de Lavras, 79 f, 2001.

PELZER, E. L. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco.** v. 53, p. 421-424, 1998.

PÉREZ-ARBELÁEZ, E. **Plantas útiles de Colombia:** terceira redacción muy corregida y aumentada. Bogotá: Litografía Arco. Venezuela, 3 ed., 831 p. 1978.

POKORNY, F. A.; AUSTIN, M. E. Propagation of blueberry softwood terminal cuttings in pine bark and peat media. **Hortscience.** St.Joseph, v. 17, p. 640-642, 1982.

RAMBO, B. S. J. **Verbenaceae riograndenses.** São Leopoldo: Pesquisas, n. 31, p.1-62, 1965.

REIS, E. S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação de plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), 800 p. 1999.

- RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S. Das P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Adv.** v.18, p. 91-120, 2000.
- RUDDER, E. A. M. C. de. **Guia das plantas medicinais**. São Paulo: Ridel. p. 609, 1997.
- RUSAK, G. et al. The determination of the content of polyphenols in the aerial parts of the species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). **Acta Pharmaceutica** v. 43, p. 121-125, 1993.
- SALIMENA, F. R. G. et al. Verbenaceae In: **Lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: março, 2013.
- SALIMENA-PIRES, F. R.; GIULIETTI, A. M. **Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae**. Bol Bot Univ São Paulo 17: 155–180. 1998.
- SANCHOTENE, M. C. C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: Feplam. p. 311, 1989.
- SEBOLD, F.D. **Levantamento etnobotânico de plantas de uso medicinal no município de Campo Bom, RS, Brasil**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Botânica, Dissertação de Mestrado. 107p. 2003.
- SCHAPOVAL, E. E. S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 53-59, 1998.
- SILVA, C. R. et al. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, 2008.
- SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya* (Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 62 f, 2003.
- SILVA, R. P. da. et al. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1153-1159, 2005.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2a ed. rev. 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ed., Ed.UFSC/UFRGS, 523p. 2004.

SKREBSKY, E. C. et al. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de gengibre brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p.1471-1477, 2004.

SKRZYPEK, Z. et al. Phenylpropanoid glycosides from *Penstemon serrulatus*. **Journal Natural Products**. AT PROD, v. 62, n. 1, p. 127-129, 1999.

SOUZA, G. S. et al. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Biotemas**, v. 24, n. 3, p. 1-11, 2011.

SOUZA, T. J. T. de. et al. Análise Morfo-Histológica e Fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 209 – 214, 2005.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3 ed. 722p., 2004.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4a ed. Artmed, Porto Alegre, 820p. 2009.

THORNE, R. F. Classification and geography of the flowering plants. **Botanical Review**, v. 58, n. 3, p. 225-348, 1992.

TONHL, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseados em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 20 p. 2001.

TRONCOSO, N. S. **Los géneros de verbenáceas de Sudamérica extratropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil)**. Darwiniana, v.18 n. 3-4 p. 295-412 il. 1974.

VANDRESEN, F. **Constituição química, atividades antibacteriana, antiedematogênica e toxicidade frente à Artemia salina da espécie vegetal *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (Verbenaceae)**. Dissertação (Química Aplicada)- Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 163p. 2005.

VEIERSKOV, B. **Relations between carbohydrates and adventitious root formation**. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides, p. 248-73, 1988.

VIEGAS, JR. C. et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIÑA, G. de la. et al. Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 7/8, p. 587-595, 1999.

WAGSTAFF, S. J.; OLMSTEAD, R. G. Phylogeny of Labiatae and Verbenaceae inferred from rbcL sequences. **Systematic Botany**, v. 22, p. 165-179, 1997.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S.; BERNAYS, E. A. **Insect-plant interactions**. CRS Press: Boca Raton, ed.1, vol. 1, cap.4, 1989.

WHATLEY, F. H.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vidadas plantas: temas de biologia**. São Paulo: EDUSP, v. 30, 101 p., 1982.

WILLIAMS, R. R. Factors determining mineral uptake *in vitro*. **Acta Horticulture**, v. 289, p. 165-169, 1993.

WOODWORD, F. Life at the edge: a 14-year study of a *Verbena officinalis* population's interactions with climate. **Journal of Ecology**, v. 85, p. 899-906, 1997.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant and Cell Physiology**, v.19, p.691-699, 1978.

YEO, P. F. **Kew Bull**, v. 45, p. 101-20, 1989.

YUCESAN B; TURKE, A. U.; GUREL, E. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 91: 243–250, 2007.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Breve análise histórica da química de plantas medicinais**: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. (org.) Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Santa Catarina: Chapecó, Argos, p. 18-44, 2001.

ZARONI, M. et al. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 14, n.1, p. 29-39, 2004.

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulture**, v. 393, n. 1, p. 25-38. 1995.