

# AS PLANTAS MEDICINAIS E A MICROPROPAGAÇÃO COMO FERRAMENTA PARA SUA EXPANSÃO E UTILIZAÇÃO

## MICROPROPAGATION OF MEDICINAL PLANTS AS AN EXPANSION AND USAGE TOOL

Lília Vieira da Silva Almeida<sup>1</sup>

Vânia Jesus dos Santos de Oliveira<sup>2</sup>

Claudia Cecilia Blaszkowski de Jacobi<sup>3</sup>

Weliton Antonio Bastos de Almeida<sup>4</sup>

Esta revisão tem como objetivo demonstrar como a cultura de tecidos, através da micropropagação, pode contribuir para a ampliação do cultivo de plantas medicinais, bem como incentivar a sua utilização. Assim, realizou-se uma revisão de literatura, abrangendo o período de 1986 a 2016, sobre a micropropagação de plantas medicinais. A utilização das técnicas de cultura de tecidos, principalmente a micropropagação de plantas medicinais poderá contribuir para a obtenção de germoplasma competitivo e adaptado a diversos métodos de cultivo, para a escolha de novas espécies que servirão como fonte de compostos biologicamente ativos, para o aprimoramento da produção de fitofármacos e para a disponibilidade de material vegetal para programas governamentais e/ou da iniciativa privada com plantas medicinais ou fitoterápicos. Nesse sentido, a micropropagação dispõe de alternativas para uma maior produção de biomassa e para garantir a perpetuação de espécies de interesse medicinal.

**Palavras chaves:** Biotecnologia. Cultura de tecidos. Cultivo *in vitro*. Ervas medicinais.

*The aim of this review is to show how tissue culture through micropropagation can contribute to increase medicinal plant culture and encourage their use. To attain our objective a literature review on medicinal plants and micropropagation comprising a 20-year period (1986 to 2016) was carried out. Tissue culture techniques, especially micropropagation of medicinal plants, allows the sourcing of competitive and well adapted germplasm to different culture methods, the selection of new species containing biological active components, the improvement of phytopharmaceutical production and the availability of vegetal material for governmental and/or private programs. Thus, micropropagation offers alternatives to increase biomass production and to ensure the perpetuation of species of medicinal relevance.*

**Keywords:** Biotechnology. Tissue culture. *In vitro* culture. Medicinal plants.

<sup>1</sup>FAMAM; Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente (FAMAM); Cruz das Almas- BA; <http://lattes.cnpq.br/0897757119293493>; [liliafamam@hotmail.com](mailto:liliafamam@hotmail.com).

<sup>2</sup>FAMAM; Doutora em Agronomia (UFRB); Cruz das Almas-BA <http://lattes.cnpq.br/2524742041569632>; [vania79br@yahoo.com.br](mailto:vania79br@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>FAMAM; Doutora em Ciências Biológicas (USP); Muritiba-BA; <http://lattes.cnpq.br/1091572485075655>; [cbjacobi@gmail.com](mailto:cbjacobi@gmail.com)

<sup>4</sup>UFRB/FAMAM; Dr. em Ciências Agrárias (USP); Cruz das Almas- BA; <http://lattes.cnpq.br/5997348120646367>; [weliton@famam.com.br](mailto:weliton@famam.com.br)

## INTRODUÇÃO

Durante longos períodos na história, o uso de plantas medicinais esteve presente, não só devido ao seu caráter alimentar, mas também às suas propriedades de cura, sejam elas reais ou ritualísticas. Entretanto, a partir da metade do século XX, o uso de medicamentos de origem sintética tornou-se mais amplo que o uso de plantas medicinais, principalmente na sociedade ocidental, com destaque para os países desenvolvidos, visto que os considerados países em desenvolvimento permaneceram fazendo uso das propriedades curativas das plantas, certamente devido às difíceis condições econômicas que impediam a aquisição dos medicamentos sintéticos (GUPTA et al., 2008).

Com o crescente desenvolvimento da Química, novas substâncias foram isoladas em laboratório e delas outros produtos de síntese surgiram, ocasionando a substituição do uso das plantas por medicamentos sintetizados em laboratório, quando se consolidou a indústria farmacêutica (BRUNING et al., 2012). Além disso, houve também intenso trabalho de desqualificação do saber popular sobre as plantas medicinais, como a proibição da sua indicação até mesmo por médicos (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL-JUNIOR, 2011). Esta ofensiva não se fundamentou apenas na suposta inferioridade da eficácia e da segurança da planta medicinal em comparação ao medicamento sintético, mas também a interesses mercantilistas, cada vez mais presentes no setor de saúde, que tiveram importante papel na desvalorização do uso da fitoterapia (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL-JUNIOR, 2014).

Não obstante, constata-se que a cultura do uso de plantas e de outras fontes naturais com propriedades terapêuticas vem sendo valorizada pela sociedade do mundo inteiro e retornou ao *status* de uma fonte de produtos medicinais devido à busca por hábitos mais saudáveis de vida e pelo difícil tratamento de certas doenças devido à resistência microbiana (BUGNO et al., 2005).

Apesar do aumento da demanda por espécies medicinais, ainda há carência de informações, principalmente para o produtor, podendo ser observado também nos demais setores: indústria, comércio e consumidores. O Brasil, ao contrário do que ocorre nos países europeus, asiáticos e nos Estados Unidos, não dispõe de estatísticas que expliquem o mercado, o consumo e os costumes de uso de plantas medicinais, apesar da tradição no uso. A falta de informação contribui para a produção

e obtenção de um produto vegetal de má qualidade (VEIGA JUNIOR, 2008). Como em qualquer sistema de produção agroindustrial, um ponto fundamental para o sucesso do empreendimento rural familiar é o acesso a mercados potenciais, o qual ocorre por meio do conhecimento da demanda e possibilita a definição de padrões de qualidade, quantidades dos produtos e planejamento da produção (SOUZA; PEREIRA; FONSECA, 2012).

A micropropagação pode ser uma alternativa viável no cultivo de plantas medicinais, pois permite a obtenção de um grande número de plantas com autenticidade varietal em qualquer época do ano (NICOLOSO et al., 2001). Além disso, quando se pretende explorar economicamente uma determinada espécie vegetal, o ponto de partida deve ser o estudo das formas de propagação e se elas apresentam viabilidade para o estabelecimento de um sistema produtivo (SCHEFFER, 1992).

Plantas medicinais têm sido multiplicadas *in vitro*, mas verifica-se, nesse novo século, um incremento nessa forma de cultivo. A proliferação *in vitro* de plantas medicinais é basicamente uma extensão da propagação vegetativa feita em muitas espécies. No entanto, este método pode ser usado não só para a produção de mudas sadias e de boa qualidade, mas também quando há escassez de material para o plantio (CUNHA et al., 1999). Ressalta-se que por meio da biotecnologia, utilizando-se a micropropagação como ferramenta, é possível aumentar a produção e diminuir o preço dos princípios ativos fitoquímicos (BAJAJ et al., 1988).

A cultura de tecidos de plantas é um método biotecnológico já consagrado pelos resultados alcançados em várias culturas, as quais foram beneficiadas pela produção de plantas uniformes e sadias, pela velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação, pela maior produção em menor tempo e espaço físico e, ainda, pela obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos através da cultura de meristemas (CRÓCOMO, 1986).

Portanto, a aplicação da micropropagação em plantas medicinais tem como perspectivas a obtenção de germoplasma competitivo e adaptado a diversos métodos de cultivo, a escolha de novas espécies que servirão como fonte de compostos biologicamente ativos e o aprimoramento da produção de fitofármacos. Nesse sentido, a micropropagação dispõe de alternativas para uma maior produção de biomassa e para garantir a perpetuação de espécies de interesse econômico (MORAIS et al., 2012).

## **PANORAMA ECONÔMICO E POLÍTICAS BRASILEIRAS DE PLANTAS MEDICINAIS**

As plantas medicinais e seus derivados têm apresentado contínuo crescimento de uso entre os recursos terapêuticos disponíveis, seja baseado na medicina tradicional ou em programas específicos de estímulo da prática da fitoterapia. A movimentação do mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de US\$ 44 bilhões, e no mercado brasileiro as estimativas variam entre US\$ 350 e US\$ 550 milhões (BRASIL, 2012). É estimado que cerca de 30% dos atuais medicamentos disponíveis no mercado são derivados direta ou indiretamente de princípios ativos vegetais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Portanto, ações que visem à preservação da biodiversidade são fundamentais, pois repercutem na produção de medicamentos (GOMES; ELPO, 2000).

No Brasil, a fitoterapia é uma opção medicamentosa que se adéqua às necessidades de vários municípios no atendimento primário à saúde. De forma geral, os fatores da expansão da fitoterapia devem-se aos efeitos adversos de fármacos sintéticos, à preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, à crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, ao desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade, ao desenvolvimento de novas formas de preparações e administração dos produtos e ao relativo baixo custo (MELO et al., 2007).

Visando estabelecer uma legislação específica, foi criada em 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que através do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006), estabelece como algumas de suas diretrizes: garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos; promover e reconhecer as práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros; promover a adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais e de manipulação e produção de fitoterápicos.

No Brasil, com a implantação da Política citada no parágrafo anterior, bem como da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde - SUS (BRASIL, 2012), que inseriu práticas de acupuntura, homeopatia, plantas medicinais, fitoterapia, termalismo e medicina antroposófica, e a Portaria n. 886 de 2010 do Ministério da Saúde - MS (BRASIL, 2010), que instituiu a Farmácia Viva no âmbito do SUS, o interesse nesse setor aumenta ainda mais, tanto por

parte da população, quanto das indústrias produtoras de medicamentos e do setor regulatório.

Além disso, as ações decorrentes dessas políticas são imprescindíveis para melhorar os seguintes aspectos: o acesso da população às plantas medicinais e fitoterápicos; a inclusão social e regional; o desenvolvimento agrícola, industrial e tecnológico; a promoção da segurança alimentar e nutricional; o uso sustentável da biodiversidade brasileira e a valorização/preservação do conhecimento tradicional das comunidades e povos tradicionais (SOUZA; PEREIRA; FONSECA, 2012).

Essas políticas, ainda segundo estes autores, vêm contribuindo para o incremento do uso de plantas medicinais, o que pode incentivar o cultivo por agricultores familiares, permitindo sua inserção na cadeia produtiva e o acesso aos mercados tradicionais ou potenciais. Conhecendo a demanda e os padrões de qualidade previamente estabelecidos, o produtor pode tomar decisões sobre o que, como, quanto e quando produzir. Entretanto, ainda há carência de informações e tecnologias nessa cadeia, o que desfavorece a obtenção de um produto final de qualidade.

A situação econômica e a busca de melhor qualidade de vida têm-se constituído nos principais fatores de incremento no uso de plantas medicinais, associados à grande divulgação desse uso para a cura de doenças. Entretanto, esse fato pode estar associado ao uso indiscriminado, que pode trazer riscos à saúde. Plantas cultivadas ou que surgem espontaneamente em locais onde foram ou são utilizados agrotóxicos, contaminação por microrganismos oriundos do solo ou da água, ao invés de curar, podem potencializar os sintomas ou serem responsáveis por novas doenças (RODRIGUES; GUEDES, 2006).

Portanto, os estudos científicos tornam-se fundamentais para maior conscientização do uso das plantas medicinais. A crescente utilização das plantas medicinais justifica a necessidade de medidas que minimizem o impacto de sua exploração nas reservas naturais, bem como a produção de plantas de alta qualidade.

## **AS PLANTAS MEDICINAIS: AVANÇOS, PERSPECTIVAS E LIMITAÇÕES**

Segundo Veiga-Junior (2008), apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, as plantas medicinais ainda desempenham importante papel na saúde mundial. No entanto, alguns fatores podem comprometer o uso das

plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, como a heterogeneidade dos indivíduos, devido a variabilidades genética e bioquímica e a dificuldade de multiplicação (PEREIRA, 2014).

Nas últimas décadas tem-se constatado um grande aumento no interesse pelo potencial terapêutico das plantas medicinais e aromáticas, sendo tal fato demonstrado pelos dados citados anteriormente. Além disso, cerca de 50% das drogas desenvolvidas entre 1981 e 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais ou análogos semissintéticos ou, ainda, compostos sintéticos baseados em produtos naturais (FRANCO et al., 2007).

Não obstante essa importância das plantas medicinais, Berg (1993) afirma que muitas espécies, utilizadas por populações locais, ainda não foram estudadas e não têm identificados os seus princípios ativos, não sendo validadas como fitoterápicos. Com a divulgação da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), realizada pelo Ministério da Saúde, contendo 71 espécies vegetais medicinais (BRASIL, 2009), esse quadro pode ser modificado, considerando que a finalidade da relação é orientar estudos e pesquisas com essas espécies para subsidiar a elaboração da lista de plantas medicinais disponibilizadas para a população (FILTER; FREITAS; PÉRICO, 2014).

Levando em consideração o valor das plantas medicinais não apenas como recurso terapêutico, mas também como fonte de renda para a agricultura familiar, torna-se importante estabelecer linhas de ação voltadas ao desenvolvimento de técnicas de manejo sustentável ou cultivo, visando à utilização destas espécies, aliada à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas tropicais. Deve ser considerado, ainda, que a produção agrícola está sujeita a restrições devido às variações das condições edafoclimáticas e que o teor de princípios ativos, e portanto, as propriedades terapêuticas e condimentares, podem ser alteradas devido a diversos fatores, como o método de secagem e beneficiamento pós-colheita, época do ano e local de cultivo (FONSECA et al., 2006), o que reflete o efeito do meio ambiente sobre a produção dos princípios fármaco-ativos.

Os aspectos mais críticos na produção de plantas medicinais para a utilização terapêutica são a quantidade e a qualidade da matéria-prima vegetal. Vários fatores climáticos afetam diretamente a qualidade, a eficácia e a segurança do produto final. Para evitar tais problemas e o extrativismo descontrolado, as indústrias vêm atuando no sentido

de aumentar a quantidade e melhorar a qualidade dessa matéria-prima, através do cultivo de plantas medicinais em larga escala. A produção massal de plantas permite selecionar espécies com maior teor de princípios ativos, controlar pragas, ou ainda o que é fundamental, evitar a contaminação por metais pesados, inseticidas e outros fatores que podem influenciar a eficácia, qualidade e segurança clínica dos medicamentos fitoterápicos (SIANI, 2003).

Portanto, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônômico para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies. Além disso, segundo Lima e Gomes (2014), o esclarecimento da população dos produtores e do setor regulatório, quanto às nuances referentes aos fitoterápicos e alimentos baseados em espécies vegetais, é de extrema importância para a saúde pública.

## **A MICROPROPAGAÇÃO: IMPORTÂNCIA E FATORES A SEREM SUPERADOS NAS FASES DO CULTIVO *IN VITRO***

As aplicações da biotecnologia na área agrícola e de plantas medicinais têm sido bastante difundidas. A cultura de células e tecidos pode resolver ou minimizar limitações na multiplicação sistematizada de plantas elites pelo processo de micropropagação. Além disso, pode ser empregada na produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que, por algum tipo de impedimento, não são sintetizados (PEREIRA et al., 2007). Nesta mesma linha de pensamento, Sales (2015) afirma que, com o incremento da procura de produtos naturais por parte da sociedade, é de vital importância o desenvolvimento e aplicação da biotecnologia no melhoramento das plantas medicinais. Assim, a otimização de várias técnicas de micropropagação e o desenvolvimento de protocolos de melhoramento das espécies com relevância tornam-se fundamentais.

Dentre as técnicas biotecnológicas, a micropropagação de plantas tem sido aquela de maior utilização prática. Ela representa uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido. Embora esta técnica ainda tenha um custo relativamente elevado, a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de

metabólitos secundários potencializada, por meio do melhoramento genético, justificam a sua utilização (LIMA et al., 2007). Além disso, Rescarolli e Zaffari (2009) consideram que a produção massal de plantas medicinais pode ser obtida através da micropropagação de mudas com alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo.

Vários estudos de micropropagação têm sido realizados com diversas espécies. A técnica da micropropagação vem sendo muito utilizada em espécies florestais, frutíferas, ornamentais e agrícolas. Já a utilização em plantas medicinais pode auxiliar no aumento de metabólitos secundários úteis aos seres vivos de modo que as espécies possam ser mais exploradas economicamente (RODRIGUES; ALMEIDA, 2010). Dentre as espécies medicinais já estudadas, visando estabelecer protocolo de micropropagação, pode-se citar como exemplo: espinheira santa (*Maytenus* sp.) (PEREIRA et al., 1995); curcuma (*Curcuma zedoaria* Roscoe) (MELLO; AMARAL; MELO, 2000); babosa [*Aloe vera* (L.) Burm.] (ARAÚJO et al., 2002; BRITO, 2007); *Lychnophora pinaster* (SOUZA et al., 2003); ginseng brasileiro [*Pffafia glomerata* (Spreng.) Pedersen.] (SKREBSKY et al., 2004; PASSOS, 2015); vassourinha-branca (*Polygala paniculata* L.) (NOGUEIRA et al., 2005); cipó-caatinga (*Mikania glomerata* Sprengel) (TALEB-CONTINI et al., 2006); *Jatropha elliptica* (CAMPOS et al., 2007); barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Mart.) (NICOLI et al., 2008); erva cidreira (*Melissa officinalis* L.) (REIS et al., 2008; PASSOS, 2015); alumã (*Vernonia condensata* Beker) (VICENTE; ALMEIDA; CARVALHO, 2009); aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) (PAIVA; ALOUFA, 2009); bastão do imperador [*Etlíngera elatior* (Jack) R.M. Sm.] (RESCAROLLI; ZAFFARI, 2009); poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes] (GOMES et al., 2009); boldo (*Plectranthus neochilus* Schltr.) (MOTA et al., 2010); gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (GIRARDI; PESCADOR, 2010); hyssopus (*Hyssopus officinalis* L.) (DRAGOEVA; NANOVA; KALCHEVA, 2010); jurubeba (*Solanum torvum* Sw.) (MOREIRA et al., 2010); quebra-pedra (*Phyllanthus tenellus* Roxb.) (VICTÓRIO, et al., 2010); alcãfora (*Croton antisiphiliticus* Mart.) (OLIVEIRA et al., 2011); cará (*Dioscorea multiflora* Grised) (SOUZA, A. 2011); gerânio (*Pelargonium graveolens* L.) (ARRIGONI-BLANK et al., 2011); erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) (HORBACH et al., 2011); hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.) (ASMAR et al., 2011); lavanda (*Lavandula angustifolia*) (MACHADO et al., 2011); menta (*Mentha x gracilis* Sole) (GARLET; FLORES;

MESSCHMIDT, 2011); pata-de-vaca (*Bauhinia cheilantha*) (GUTIÉRREZ, et al., 2011); velame [*Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg.] (MARTINS et al., 2011); atroveran (*Ocimum selloi* Benth.) (MONFORT et al., 2012); maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.) (SOARES et al., 2012); verbena (*Verbena litoralis* Kunth) (BRAGA et al., 2012); malva (*Malva sylvestris* L.) (FILTER; FREITAS; PÉRICO, 2014); sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) (BEZERRA, et al., 2014); segurelha (*Satureja hortensis* L.) (NAVROSKY et al., 2014); lippia (*Lippia rotundifolia* Cham) (RESENDE et al., 2015); nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) (HOULLOU, et al., 2015) e quitoco [*Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera] (ROSSATO, CANTO-DOROW; NICOLOSO, 2015). Entretanto, o sucesso da micropropagação pode ser influenciado por diversos fatores. O genótipo, o tipo e o tamanho do explante, o meio de cultura e as doses de fitorreguladores são os principais controladores da morfogênese *in vitro* (MOREIRA-DIAS et al., 2001).

### Estabelecimento *in vitro*

No desenvolvimento de protocolos de micropropagação de uma dada espécie, é necessário primeiro estabelecê-la *in vitro*. Porém, algumas limitações específicas restringem o uso extensivo do cultivo de tecidos vegetais *in vitro*. Um dos maiores entraves está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminação, principalmente por bactérias, pois nem sempre se pode eliminá-las com o uso de antibióticos (PEREIRA; BOLIANI; FURLANI JUNIOR, 2014). O uso de diferentes agentes germicidas é fundamental para redução da contaminação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro*, sendo que alguns produtos, tais como etanol, peróxido de hidrogênio, cloreto de mercúrio, nitrato de prata e diversos antibióticos têm sido utilizados com esta finalidade (RIBEIRO; TEIXEIRA 2008). Entretanto, o hipoclorito de sódio é aquele de maior utilização e tem apresentado alta eficiência na descontaminação de superfícies de explantes, com relação à combinação de bactérias e fungos (EMMANUEL et al., 2004). A atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio (NaOCl) tem sido principalmente atribuída ao ácido hipocloroso (HOCl), cujo baixo peso molecular permite a penetração na parede das células dos microorganismos, provocando a morte destas (LEN et al., 2002).

Algumas espécies apresentam outras dificuldades, além da contaminação, no estabelecimento *in vitro*, tais como a oxidação (SATO

et al., 2001). Neste sentido, várias substâncias com ação germicida, antibiótica e antioxidante têm sido utilizadas. Flores et al. (1998), em trabalho com espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.), obtiveram baixo índice de oxidação mediante desinfestação dos explantes em solução contendo álcool 70% durante 15 segundos e solução de hipoclorito de sódio 1% com duas gotas de detergente durante 15 minutos. Em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) a contaminação e oxidação dos explantes foi reduzida com a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,8% durante 12 e 16 minutos, 200 mg L<sup>-1</sup> de cefotaxima sódica e 3,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado ou 0,5 g L<sup>-1</sup> de PVP (polivinilpirrolidona) (COSTA et al., 2007). Utilizando segmentos nodais de urucum (*Bixa orellana* L.) e ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), Mantovani (2007) conseguiu eliminar contaminantes fúngicos dos explantes ao desinfestá-los com soluções de hipoclorito de sódio (10 minutos a 1,25%) e PPMTM (Plant Preservative Mixture) (20 minutos a 20%).

O tipo de explante utilizado para estabelecimento *in vitro* e a rápida regeneração das plantas medicinais, tem sido fundamental no sucesso da micropropagação. Diversas partes da planta já foram utilizadas com sucesso em espécies medicinais, tais como segmentos nodais (CAMPOS et al., 2007), hipocótilos (MURCH et al., 2000), ápices caulinares (SONIYA; DAS, 2002), discos foliares (KOROCH et al., 2002) e embriões (GALLO-MEAGHER; GREEN, 2002). Vale ressaltar que o sucesso da micropropagação, independentemente do explante utilizado, está sujeito ao efeito do genótipo da planta-matriz na resposta aos estímulos *in vitro* (STEIN et al., 2009).

Caldas et al. (1998) reportam que os meios de cultura mais usados no cultivo *in vitro* da maioria das espécies são o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968). Para Teixeira e Torres (1998), algumas modificações genótipo-específicas devem ser feitas, no chamado meio básico, com a intenção de otimizar metodologias para o melhor desenvolvimento da espécie estudada. Além disso, o adionamento de reguladores de crescimento, especialmente as auxinas e citocininas, desempenham um papel muito importante. As auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular (formação de calo), a formação de raízes e a embriogênese somática. As citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (GEORGE, 1993). A combinação auxina x citocinina e o uso

isolado de citocinina têm sido muito importantes na multiplicação de brotos *in vitro*.

### **Multiplicação *in vitro***

A indução de brotações *in vitro* é estimulada pela ação de reguladores vegetais, específicos ou combinados, adicionados ao meio de cultura. As citocininas têm se mostrado muito favorável na fase de multiplicação *in vitro*. Dentre estas, a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto, as exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições *in vitro* variam de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta, necessitando-se otimizar os meios de cultura (NAGAO et al., 1994).

Na micropropagação de ginseng brasileiro [*Pffafia glomerata* (Spreng.) Pedersen.], Flores et al. (2009) utilizando as citocininas BAP e Thidiazuron (TDZ), desenvolveram um protocolo para a multiplicação desta espécie onde obtiveram, a partir de um único segmento nodal, 15.000 plantas dentro de um período de seis meses. Já Passos (2015) estimou em 57.000 a obtenção de plantas a partir de um segmento nodal, nesta mesma espécie, utilizando apenas o BAP e realizando três subcultivos na fase de multiplicação *in vitro*.

Um fenômeno que tem ocorrido e dificultado a multiplicação *in vitro* de algumas plantas é a vitrificação. A vitrificação, segundo Torres, Caldas e Buso (1999), refere-se a um propágulo quebradiço, provavelmente pela absorção excessiva de água, também denominado de hiperhidricidade. A vitrificação é uma importante anomalia que tem ocorrido no cultivo *in vitro* de plantas e vem recebendo atenção especial nos estudos com cultura de tecidos vegetais. Já foi observado que existe uma interação simultânea de diversos fatores que provocam a hiperhidricidade, interferindo nas principais vias metabólicas como fotossíntese, respiração e transpiração. Uma relação entre vitrificação e a atividade de determinadas enzimas já foi diagnosticada. Em material vitrificado observa-se diminuição na atividade das enzimas peroxidase e CoA-ligase em relação à planta normal (CUZZUOL et al., 1995).

Diversos fatores têm sido atribuídos como influenciadores da vitrificação, tais como o potencial osmótico do meio de cultura (PASQUALETO et al.,

1988), concentração dos reguladores de crescimento, especialmente a citocinina (LESHEM *et al.*, 1988), umidade e a concentração salina do meio de cultura (DAGUIN; LETOUZÉ, 1986) e, recentemente, demonstrou-se também que o agente geleificante no meio de cultura pode influenciar na vitrificação (BARBOSA *et al.*, 2013). Evitar essa vitrificação ou hiperhidricidade das brotações é de fundamental importância para assegurar o enraizamento e posterior aclimação das brotações.

### **Enraizamento *in vitro***

A fase de enraizamento *in vitro* da espécie medicinal de interesse é fundamental para posterior aclimatização, conservação *in vitro* ou comercialização das mudas produzidas. Trata-se de uma das etapas que pode dificultar o estabelecimento de um protocolo de micropropagação. O desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente *in vitro* ou *in vivo*, é um processo de grande complexidade envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados (SOUZA; PEREIRA, 2007). Visando induzir a formação de raízes adventícias em plantas medicinais, reguladores de crescimento, especialmente auxinas, já foram testados em diversos trabalhos. Dentre esses, destacam-se o ácido clorogênico (LAMEIRA *et al.*, 1997), o ácido naftalenoacético - ANA (SOUZA *et al.*, 2004) e o ácido indolacético - AIA (DINIZ *et al.*, 2006). Entretanto, outros estudos têm demonstrado que o uso de reguladores de crescimento não se faz necessário (BERTOLUCCI *et al.*, 2000).

A concentração dos sais minerais no meio de cultura tem sido outro fator com importante papel no enraizamento *in vitro*. Diluições das formulações básicas dos meios de cultura têm sido muito utilizadas para favorecer ao enraizamento. De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento *in vitro* (LIMA, 2004). Para Mccown (1988), a alta concentração de sais, que compõem o meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), mesmo em presença de auxinas, pode inibir o enraizamento *in vitro*. Embora sejam muitas as variações, de acordo com a espécie e o sistema de enraizamento, as diluições de 1/2 até 1/4 do meio de cultura MS são frequentemente utilizadas, possibilitando melhores resultados para muitas espécies de plantas (CENTELLAS *et al.*, 1999; PASSOS, 2015).

### **Conservação *in vitro***

Existem poucos relatos na literatura com relação à conservação *in vitro* de plantas medicinais. Camilo *et al.* (2009), estudando a conservação *in vitro* de algodão-do-campo (*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.), concluíram que a temperatura de 20°C associada ao meio de cultura ½ WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) é uma condição eficiente para a manutenção e conservação de plantas de *C. regium* sob regime de crescimento mínimo *in vitro*. É importante salientar que as técnicas de cultura de tecidos em plantas, em alguns casos, podem representar a única estratégia para conservar estas espécies fora do seu habitat, como no caso de plantas com sementes recalcitrantes e de difícil propagação vegetativa por métodos convencionais (ROCA *et al.*, 1991; FERREIRA, 1998).

### **Aclimação**

A etapa de aclimação das plantas é aquela que possibilita a adaptação das plantas às condições ambientais após remoção das condições *in vitro*, antes do transplante para o local definitivo. Este processo, em alguns casos, acarreta baixo índice de sobrevivência das mudas devido à baixa taxa fotossintética, deixando o vegetal não completamente autotrófico (HOFFMANN, 2002). Portanto, a baixa luminosidade e alta umidade relativa nos frascos de cultura *in vitro* são fatores que dificultam o estabelecimento de condições autotróficas normais para algumas espécies, quando transferidas para aclimatização (PEDROTTI, 2001). Para que as mudas tenham uma alta taxa de sobrevivência na aclimatização, é necessário que estas produzam novas raízes em substratos, e que estes possuam condições físicas e nutricionais adequadas. Além do mais, a planta deverá desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática (DÍAZ-PEREZ *et al.*, 1995), ativar o controle de perda de água pelas células (SUTTER, 1988) e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO<sub>2</sub> (VANTALGEN *et al.*, 1992). Neste sentido, também o substrato usado na etapa de aclimatização tem influência no processo de enraizamento adventício e qualidade destas, além de ser fundamental na nutrição e posterior crescimento e desenvolvimento da nova planta (SILVA; DEBIASI; PESCADOR, 2007).

Durante a etapa de aclimação, o armazenamento de carboidratos se torna necessário

já que participam de uma série de processos vitais, como desenvolvimento de plântulas, diferenciação radicular e foliar, e senescência. Os carboidratos também estão envolvidos no processo que antecede a divisão celular, possivelmente servindo como fonte de energia para as células, ou fornecendo esqueletos de carbono para a síntese de outros compostos necessários para a célula (TAIZ; ZEIGER, 2004). Neste sentido, Skrebsky et al. (2004) observaram um maior crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) obtido pelo aumento da disponibilidade de sacarose *in vitro* (concentrações entre 45 e 60 g L<sup>-1</sup>) e que, independentemente do período de retirada das plantas do cultivo *in vitro*, as mudas obtiveram adequada aclimatização após 30 dias. Na aclimatização de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), segundo Girardi e Pescador (2010), diante do alto índice de sobrevivência para as plantas aclimatadas e os teores mais elevados de açúcares solúveis totais e de reserva nas primeiras fases de cultivo, recomenda-se a necessidade de um período de aclimatização das plantas (visto que a manutenção das mudas em casa de vegetação por período maior proporcionou 100% de sobrevivência), para garantir que realizem melhor alocação de reservas.

A aclimatização de *Lippia rotundifolia* Cham, conforme Resende et al. (2015), foi realizada em bandejas com substrato, revestidas com plástico translúcido e mantidas à sombra. As plantas foram transferidas para casa de vegetação após 15 dias e transplantadas para canteiros após 30 dias. Esses autores avaliaram as plantas, em condições de campo, e constataram que os procedimentos do cultivo *in vitro* não afetaram o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas, o que confirma o potencial da micropropagação para redução dos riscos de extinção dessa espécie.

## CONSIDERAÇÃO FINAL

Diante das ponderações apresentadas fica evidente a importância da cultura de tecidos, especialmente através da micropropagação, para contribuir no desenvolvimento de programas de produção de mudas de plantas medicinais, bem como para possibilitar estudos farmacológicos que contribuam para a identificação, o aumento e o aprimoramento de utilização de princípios ativos. Não obstante, o desenvolvimento de protocolos de micropropagação tem como requisito básico a superação de limitações nas diversas fases do cultivo *in vitro*, que são dependentes de diversos fatores e necessitam de investigações específicas

para superá-los em cada espécie vegetal em estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, P.S.; SILVA, J.M.O.D.; NECKEL, C.A.; IANSEN, C.; OLTRAMARI, A.C.; PASSOS, R.; TIEPO, E.; BACH, D.B.; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa *Aloe vera* L. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.54-7, 2002.

ARRIGONI-BLANK, M.F.; ALMEIDA, S.A.; OLIVEIRA, A.C.L.; BLANK, A.F. Micropropagação e aclimatização de gerânio (*Pelargonium graveolens* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.3, p.271-275, 2011.

ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n. esp., p.533-538, 2011.

BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSK, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. **Biotechnology in agriculture and forestry**, v. 4, p. 60-103, 1988.

BARBOSA, L.M.P.; PAIVA NETO, V.B.; CARNEVALLI DIAS, L.L.C.; FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; ALEXANDRE, R.S.; IAREMA, L.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Biochemical and morpho-anatomical analyses of strawberry vitroplants hyperhydric tissues affected by BA and gelling agents. *Revista Ceres*, v. 60, n.2, p. 152-160, mar/abr, 2013.

BERG, M. E. **Plantas Medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**, Pará. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993. 206p.

BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; GAVILANES, M.L.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A. Micropropagação de *Tournefortia cf. paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3, n.1, p.43-9, 2000.

BEZERRA, R.M.F.; ALOUFA, M.A.I.; FREIRE, F.A.M.; SANTOS, D.D. Efeito de 6-Benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, v.38, n.5, p.771-778, 2014.

- BRAGA, V.F.; MENDES, G.C.; OLIVEIRA, R.T.R.; SOARES, C.Q.G.; RESENDE, C.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; RAPOSO, N.R.B.; PEIXOTO, P.H.P. Micropropagation, antinociceptive and antioxidant activities of extracts of *Verbena littoralis* Kunth (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n.1, p.139-147, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde, 2012. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31). Disponível em: <http://bvms.saude.gov.br>. Acesso em: 30 Out. jul. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n. 886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 abr. 2010.
- BRASIL. **Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos**, Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME, 6.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- BRASIL. Presidência da República. Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jun. 2006.
- BRITO, C. F. de. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2007
- BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANNA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.
- BUGNO, A; BUZZO, A.A; NAKAMURA, C.T; PEREIRA, T.C; MATOS, D; PINTO, T.J.A. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**. v. 41, p. 491-497. 2005.
- CALDAS, L.S.; HARIDSON, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.87-132.
- CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; VIEIRA, R.F.; PEIXOTO, J.R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.2, p.184-189, 2009.
- CAMPOS, R.A.S.; AÑEZ, L.M.M.; DOMBROSKI, J.L.D.; DIGNART, S.L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.3, p. 30-36, 2007.
- CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; ROSETE GOTTINARI, R.A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.2, p.181-6, 1999.
- COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; MENDONÇA, A.B.; AMANCIO, V.F.; LEDO, A.S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.1, p.68-72, 2007.
- CRÓCOMO, O. J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brazil. In: SIMPÓSIO ANNUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DE SÃO PAULO, 11., **Anais**, São Paulo, p. 53-71, 1986.
- CUNHA, G. AP.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S. **O abacaxizeiro**: cultivo, agroindústria e economia. Brasília: EMBRAPA, 1999, 480 p.
- CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L.A.; ALMEIDA, M. de; CROCOMO, O.J. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Sciencia Agricola**, v.52, n.3, p.604-614, set./dez. 1995.
- DAGUIN, F.; LETOUZÉ, R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.66, p.94-98, 1986.
- DÍAZ- PEREZ, J.C.; SUTTER, E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil.

**Physiologia Plantarum**, v.95, p.225-32, 1995.

DINIZ, J.D.N.; MAGALHÃES, J.R.; INNECCO, R.; ALMEIDA, J.L.; PINHO, J.L.N. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciência Agrônômica**, v.37, n.1, p.59-64, 2006.

DRAGOEVA, A. P.; NANOVA, Z. D.; KALCHEVA, V. P. Allelopathic activity of micropropagated *Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae, water infusions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.513-518, Ago/Set. 2010.

EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, v.30, n.7, p.891-900, 2004.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA - SPI/EMBRAPA - CNPH, 1998. 509p.

FIGUEREDO, C.A.; GURGEL, I.D.G.; GURGEL JUNIOR, G.D. A implantação da Fitoterapia no SUS: uma avaliação à luz do arcabouço normativo. In: OLIVEIRA, M.H.B. et al. (Orgs.). **Direito e saúde : cidadania e ética na construção de sujeitos sanitários**. Maceió: EdUFAL, 2011. 309p.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, G. D.; GURGEL-JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p.381-400, 2014.

FILTER, M.; FREITAS, E.M.de; PÉRICO, E. Influência de diferentes concentrações dos fitorreguladores ácido 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na propagação vegetativa de *Malva sylvestris* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.1, p.47-53, 2014.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.3, p.201-5, 1998.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J1; GARLET, T.M.B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.3, p.292-299, 2009.

FONSECA, M.C.M.; CASALI, V.W.D.; STROZI, R.M.M. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Revista Planta Daninha**, v.24, n.4, p.707-13, 2006.

FRANCO, A.L.P.; OLIVEIRA, T.B.; FERRI, P.H.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. de. Evaluation of the chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc., *Ocimum gratissimum* L. and *Curcuma longa* L. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol.4, p.208-220, 2007.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.

GALLO-MEAGHER, M.; GREEN, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, n.3, p.253-6, 2002.

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

GEORGE, F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Dordrecht: Springer, 1993. 574p.

GIRARDI, C.G.; PESCADOR, R. Aclimação de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.1, p.62-72, 2010.

GOMES, E. C.; ELPO, E.R. Biodiversidade ameaçada compromete a produção de medicamentos. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v.2, p. 61-64, 2000.

GOMES, R.S.D.L.; OLIVEIRA, V.D.C.; RIBEIRO, R.L.; JÁCOME, P.; PINTO, J.E.B.P.; LAMEIRA, O.A.; BARROS, A.M.D. Estudo morfoanatômico

- comparativo entre a poaia (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes - Rubiaceae) obtida da região Amazônica (habitat original) e proveniente de processo biotecnológico submetida a diferentes tratamentos de interceptação da radiação solar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p.276-283, Jan./Mar. 2009
- 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**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1998. 509 p.
- GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **J. Ethnopharmacol.** v. 115, p. 361-380. 2008.
- GUTIÉRREZ, I.E.M.; NEPOMUCENO, C.F.; LEDO, C.A. da S.; SANTANA, J.R.F. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v.41, n.2, p.260-265, fev, 2011.
- HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, v.23, n.216, p.21-4, 2002.
- HORBACH, M.A.; BISOGNIN, D.A.; KIELSE, P.; QUADROS, K.M.; FICK, T.A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, v.41, n.1, p.113-119, jan, 2011.
- HOULLOU, L.M.; SOUZA, R.A.; SANTOS, E.C.P.; SILVA, J.J.P.; BARBOSA, M.R.; SAUVÉ, J.P.G.; HARAND, W. Clonal propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) via direct and indirect *in vitro* regeneration. **Revista Árvore**, v.39, n.3, p.439-445, 2015.
- KOROCH, A.; JULIANI, H.R.; KAPTEYN, J.; SIMON, J.E. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, n.1, p.79-83, 2002.
- LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; CARDOSO, M.G. Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. **Ciência Rural**, v.27, n.2, p.189-92, 1997.
- LEN, S-V.; HUNG, Y-C.; CHUNG, D.; ANDERSON, J.L.; ERICKSON, M.C.; MORITA, K. Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.1, p.209-212, 2002.
- LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v.62, p.271-276, 1988.
- LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; BENITEZ, L.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.669-71, 2007.
- LIMA, E.C. **Indução e enraizamento in vitro de brotações em segmentos nodais de sangra d'água**. 2004. 71p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- LIMA, L.O.; GOMES, E.C. Alimento ou medicamento? Espécies vegetais frente à legislação brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.3, supl. I, p.771-782, 2014.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially: feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, v.30, p.421-7, 1980.
- MACHADO, M.P.; SANTOS, G.D.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L.A. Enraizamento de microestacas de *Lavandula angustifolia*. **Ciência Rural**, v.41, n.5, p.767-772, mai, 2011.
- MANTOVANI, N.C. **Propagação vegetativa e cultivo in vitro de *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L.** 2007. 135p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MARTINS, L.M.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; BERTONI, B.W. Micropropagação e conservação de *Macrosiphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Ciência Rural**, v.41, n.3, p.454-458, mar, 2011.

McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue

- cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, Portland:Dioscorides Press, 1988. v.2, p.289-302.
- MELLO, M.O.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Quantificação da micropropagação de *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agricola**, v.57, n.4, p.703-7, 2000.
- MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculushippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**. v. 2, p. 27-36. 2007.
- MONFORT, L.E.F.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ROSSI, Z.T.T.; SANTOS, F.M. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.458-463, 2012.
- MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.
- MOREIRA, C.B.; LIMA, S.S.; ESQUIBEL, M.A.; SATO, A. Solasodine accumulation in regenerated plants of *Solanum torvum* Sw. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.1, p.73-79, 2010.
- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCIA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of *Troyer citrange*. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.275-290, 2001.
- MOTA, M.S.; BANDEIRA, J.M.; BRAGA, E.J.B.; BIANCHI, V.J.; PETERS, J.A. *In vitro* shoot regeneration of boldo from leaf explants. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p.2210-2213, out, 2010
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURCH, S.J.; CHOFFE, K.L.; VICTOR, J.M.R.; SLIMMON, T.Y.; KRISHNARAJ, R.; SAXENA, P.K. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*. cv 'Anthos'). **Plant Cell Reports**, v.19, n.6, p.576-81, 2000.
- NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação "in vitro" de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, v.53, n.1, p.25-31, 1994.
- NAVROSKI, M.C.I.; WALDOW, D.A.G.; REINIGER, L.R.S.; GOLLE, D.P.; CURTI, A.R.; PEREIRA, M.O. Multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p.117-121, 2014.
- NICOLI, P.M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; SANTANA, J.R.F.; SILVA, L.C.; SILVA, D.P.C.; PORTO, J.M.P. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.685-9, 2008.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro. [*Paffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.2, p. 11-18, 2001.
- NOGUEIRA, F.L.P.; FERNANDES, S.B.O.; REIS, G.M.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D.; LAGE, C.L.S.; MENEZES, F.S. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 4, p. 310-315, Out./Dez. 2005
- OLIVEIRA, T.G.; PINA, P.S.S.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart. **Ciência Rural**, v.41, n.10, p.1712-1718, out, 2011.
- PAIVA, A.M.S.; ALOUFA, M.A.I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.300-304, 2009.
- PASQUALETO, P.L.; ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivare *in vitro*. **Plant Cell and Organ Culture**, The Hague, v.14, p.31-40, 1988.

- PASSOS, M. S. **Multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Melissa officinalis* L.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade Maria Milza. 2015.
- PEDROTTI, E.L.; VOLTOLINI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.234-9, 2001.
- PEREIRA, A.M.S.; MORO, J.R.; CERDEIRA, R.M.M.; FRANÇA, S.C. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, n.3, p.295-7, 1995.
- PEREIRA, R.C.A.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; CORRÊA, R.M.; BERTOLLUCI, S.K.V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J.F. GMEL. (unha de gato). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.3, n.2, p.69-77, 2007.
- PEREIRA, A. M. S. **Cultura de Tecidos de plantas medicinais**. Disponível em: <http://www.ufmt.br/culturadetecidosdeplantasmedicinas>. Acesso em: 14 jun. 2014.
- RESCAROLLI, C.L.S.; ZAFFARI, G.R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.11, n.2, p.190-195, 2009.
- REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CORRÊA, R.M. 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.160-7, 2008.
- RESENDE, C.F.; BIANCHETTI, R.E.; OLIVEIRA, A.M.S., BRAGA, V.F.; PEIXOTO, P.H.P. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, na endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 582-589, jul-set, 2015.
- RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, S.L. Potassium nitrate substitution for potassic saltpetre on preparation of plant tissue culture nutritive media esterilized with sodium hypochlorite. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.4, p.1209-1213, 2008.
- ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. 923p.
- RODRIGUES, A.C.C.; GUEDES, M.L.S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.8, n.2, p.1-7, 2006.
- RODRIGUES, F.R.; ALMEIDA, W.A.B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.12, n.3, p.333-340, 2010.
- ROSSATO, L.V.; CANTO-DOROW, T.S.; NICOLOSO, F.T. Micropropagation of *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.2, p.239-245, 2015.
- SALES, H.J.S.P. *Lavandula* L. - aplicação da cultura *in vitro* à produção de óleos essenciais e seu potencial económico em Portugal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.17, n.4, supl. II, p.992-999, 2015.
- SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; SOUZA, V.C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, n.2, p.117-23, 2001.
- SCHEFFER, M. C. Roteiro para estudos de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUSPR/ CEMEPR. **Sob Informa**, v. 10, n. 2, p. 29-31, 1992.
- SIANI, A.C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. Rio de Janeiro: Scriptorio Comunicação, 2003. 99p.
- SILVA, C.G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.1, p.29-35, 2007.
- SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1471-7, 2004.

SOARES, W.S.; RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BARROSO, P.A.; NASCIMENTO, K.S.; FERREIRA, K.T. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.esp., p.138-142, 2012.

SONIYA, E.V.; DAS, M.R. *In vitro* micropropagation of *Piper longum* – an important medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, n.3, p.325-7, 2002.

SOUZA, A.V. de.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; CASTRO, E.M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538, dez., 2003.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; TEIXEIRA, R.N. Enraizamento *in vitro* de plântulas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.1, p.86-91, 2004.

SOUZA, A.V. de; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

SOUZA, A.V. de; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 92-98, jan./fev. 2011.

SOUZA, M.R.M.; PEREIRA, R.G.F.; FONSECA, M.C.M. Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n. esp., p.242-245, 2012.

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

SUTTER E. Stomatal and Cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.113, n.2, p.234-8, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamim/Cummings, 2004. 556p.

TALEB-CONTINI, S.H.; SANTOS, P.A.; VENEZIANI, R.C.S.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; LOPES, N.P.; OLIVEIRA, D.C.R. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. supl., p. 596-598, Dez. 2006

TEIXEIRA, S.L.; TORRES, A.C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1998. v.1, 71-86.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1999. v.2, p.859.

VANTELGEN, H.J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botânica Neerlandica**, v.41, n.4, p.453-9, 1992.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VICENTE, M.A.A.; ALMEIDA, W.A.B.; CARVALHO, Z.S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.176-183, 2009.

VICTORIO, C.P.; HENRIQUES, A.B.; TAVARES, E.S.; ESQUIBEL, M.A.; LAGE, C.L.S. Standardized production of *Phyllanthus tenellus* Roxb. by plant tissue culture. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 272-278, abr-jun, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world medicines situation 2011**: Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO Press, 2011.