

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Vagner Roberto Abilel da Silva

**Micropropagação e análise de compostos terpênicos voláteis em
Stachytarpheta odorata P.H.Cardoso & Salimena (Verbenaceae)**

Juiz de Fora
2023

Vagner Roberto Abilel da Silva

**Micropropagação e análise de compostos terpênicos voláteis em
Stachytarpheta odorata P.H.Cardoso & Salimena (Verbenaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Juiz de Fora como requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Profº Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto

Juiz de Fora
2023

Abilel da Silva, Vagner Roberto.
Micropropagação e análise de compostos terpênicos voláteis em
Stachytarpheta odorata P.H.Cardoso & Salimena (Verbenaceae) /
Vagner Roberto Abilel da Silva. -- 2023.
41 p.

Orientador: Paulo Henrique Pereira Peixoto
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2023.

1. *Stachytarpheta odorata*. 2. Micropropagação. 3. Análise de
terpenos. 4. Cultura de tecidos vegetais. 5. Conservação. I. Pereira
Peixoto, Paulo Henrique, orient. II. Título.

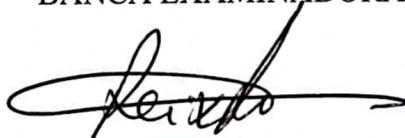
Vagner Roberto Abilel da Silva

**Micropropagação e análise de compostos terpênicos voláteis em
Stachytarpheta odorata P.H.Cardoso & Salimena (Verbenaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Juiz de Fora como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas. Área de
concentração: Botânica.

Aprovada em 08 de Dezembro de 2023

BANCA EXAMINADORA



Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Cristiano Ferrara de Resende
Universidade Federal de Juiz de Fora



MSc. Pedro Henrique Cardoso
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho a todos que, durante a vida, buscam compreender as coisas do mundo que até então eram somente apreciadas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho marca o final de minha jornada acadêmica na graduação, como última etapa, antes de me tornar um Bacharel em Ciências Biológicas. Não por profissão, mas por formação, se tornando parte de quem sou.

Foi um caminho longo e árduo, onde me esforcei nas batalhas pelo meu objetivo. Porém, não podemos ter a falsa ilusão de que nosso esforço, por maior que seja, é suficiente para alcançar nossos objetivos. Ao longo de uma jornada, somos amparados por pessoas à nossa volta, mesmo que não nos demos conta, onde mesmo um simples cumprimento pela manhã pode nos dar o pontapé que precisamos para começar mais um dia de trabalho.

Dito isto, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos os quais, mesmo sem perceber, tornaram possível a minha chegada até aqui.

Não sou convicto sobre a existência de um grande criador, porém, caso este exista, agradeço a ele em primeiro lugar, por arquitetar este universo cheio de possibilidades, às quais dedico minha vida a explorar.

Agradeço à minha família pelo amparo incondicional, que me foi ofertado desde antes de eu nascer, e que perdura até hoje, mesmo nos momentos mais infortúnios. Em especial à minha vó Rute, por me apoiar durante toda a graduação.

Também sou grato a todas as pessoas com quem tive contato ao longo da vida, e que, mesmo que nem sempre bem intencionadas, contribuíram com o meu aprendizado sobre a vida e o mundo, onde mesmo as lições mais simples ainda são importantes. Mas em especial aos meus amigos, que, me acolhendo como um irmão, fizeram desse caminho mais suave, para que, mesmo com a dureza da vida, eu pudesse apreciar cada momento.

No âmbito acadêmico, agradeço aos meus professores, que foram os degraus na escadaria do conhecimento que me permitem sempre ir além. E também a minha curiosidade, que, quase como uma entidade, me provoca e conduz para os caminhos mais fantásticos que eu, como estudante, poderia trilhar.

Agradeço a Universidade Federal de Juiz de Fora, como instituição, que me ofertou a possibilidade de cursar a graduação com o máximo de amparo possível para que eu pudesse concluir o curso, mesmo com os contratempos enfrentados. Mas agradeço também a UFJF como coletivo, já que uma universidade sem funcionários

é só um cercado com prédios, e todos os professores e TAEs com os quais tive contato de alguma forma, somente contribuíram com o meu percurso.

Ao professor Paulo Henrique, eu agradeço especialmente, não só por me acolher e orientar no LFV-UFJF, mas também por, ao longo do meu período como estagiário e monitor da disciplina de Fisiologia Vegetal, ter confiado a mim responsabilidades do laboratório que eu mesmo não deixaria nas mãos de um outro alguém com as minhas qualidades. Pela oportunidade de me envolver, não só nas questões relacionadas às linhas de pesquisa do laboratório, mas também na parte burocrática do funcionamento dele, bem como nos trâmites para criação de um novo laboratório de cultura de tecidos, uma oportunidade que poucos alunos deste curso tiveram. Também agradeço a ele, juntamente com Wandinho, Flávia, e outros professores do Departamento de Botânica, pelos momentos de descontração que tivemos durante o período em que estagiei lá, que fizeram de minha pesada volta à universidade após pandemia, uma época também de boas lembranças.

Também sou imensamente grato a todos os envolvidos neste estudo. Pessoas citadas mais a frente neste trabalho que propuseram o projeto, coletaram os espécimes, iniciaram o cultivo *in vitro* e *ex vitro*, realizaram os experimentos, coletaram os dados, e fizeram o tratamento estatístico, para que assim, dezessete anos depois, com a descrição da espécie, eu pudesse analisar esses dados e apresentar os resultados neste momento tão oportuno. Além, claro, da FAPEMIG, que fomentou este projeto.

E, por fim, mas não menos importante, agradeço também a todos os leitores desta monografia ou do artigo que (espero que em breve) seja publicado com base neste trabalho, pois sem vocês meu esforço para com a redação deste não teria nenhum sentido além do burocrático, como trabalho de conclusão de curso. Pois um trabalho não apreciado, é um trabalho sem propósito.

RESUMO

As Verbenaceae ocorrem em uma grande diversidade de ecossistemas terrestres, não sendo encontradas apenas na zona Antártica. Atualmente, essa família possui cerca de 800 integrantes, e esse número aumenta à medida que novas espécies são descobertas, como é o caso da recém descrita *Stachytarpheta odorata* P.H.Cardoso & Salimena. Embora a literatura apresente muitos trabalhos sobre cultivo *in vitro* de Verbenaceae, existem apenas dois estudos com o gênero *Stachytarpheta*. Levando em consideração que a única população conhecida de *S. odorata* se encontra estabelecida *ex situ* na estação experimental da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde são cultivados poucos indivíduos, a criação de um protocolo de micropropagação para a espécie, bem como a análise de compostos químicos desta, são de grande relevância para a conservação e potenciais usos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi estabelecer e multiplicar *in vitro* culturas de *S. odorata*, avaliando os efeitos de diferentes concentrações de reguladores de crescimento na multiplicação e no enraizamento, finalizando com a aclimatização das plantas em condições *ex vitro*. Além disso, realizou-se a análise dos compostos terpênicos voláteis majoritários, a fim de identificar os componentes que dão à espécie certo odor, condição incomum para plantas do gênero *Stachytarpheta*. Para a fase de multiplicação *in vitro*, o meio suplementado com 3 µM de BAP e isento de ANA se mostrou o mais prolífico, por proporcionar o maior número de segmentos nodais em resposta aos tratamentos. Para o enraizamento, o meio com 0,1 µM de ANA foi o mais adequado, apresentando microestacas com maior número de raízes e sem a formação indesejável de calos. A sobrevivência das plântulas no processo de aclimatização *ex vitro* foi de aproximadamente 80%. Os resultados obtidos contribuem para a propagação em larga escala e demonstram as vantagens e o potencial do protocolo sugerido para a conservação da espécie que, apesar de recém descrita, já se encontra em estado crítico de conservação. A análise dos terpenóides voláteis revelou a presença do Timol como componente majoritário, molécula com ação antibacteriana amplamente utilizada pela indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Campos Rupestres, espécies endêmicas, conservação da biodiversidade, cultura de tecidos vegetais, aclimatização, potencial farmacológico.

ABSTRACT

Verbenaceae occur in a great diversity of terrestrial ecosystems, not only being found in the Antarctic zone. Currently, this family has around 800 members, and this number increases as new species are discovered, as is the case of the recently described *Stachytarpheta odorata* P.H.Cardoso & Salimena. Although the literature presents many studies on *in vitro* cultivation of Verbenaceae, there are only two studies with the genus *Stachytarpheta*. Taking into account that the only known population of *S. odorata* is established *ex situ* at the experimental station of the Federal University of Juiz de Fora, where few individuals are cultivated, the creation of a micropropagation protocol for the species, as well as the analysis of its chemical compounds are of great relevance for conservation and potential uses. Therefore, the objective of the present study was to establish and multiply *in vitro* cultures of *S. odorata*, evaluating the effect of different concentrations of growth regulators on multiplication and rooting, ending with the acclimatization of the plants in *ex vitro* conditions. Furthermore, an analysis of the main volatile terpene compounds was carried out in order to identify the components that give the species a certain odor, an unusual condition for plants of the *Stachytarpheta* genus. For the *in vitro* multiplication phase, the medium supplemented with 3 μM BAP and free of ANA proved to be the most prolific, as it provided the greatest number of nodal segments in response to treatments. For rooting, the medium with 0.1 μM NAA was the most suitable, presenting microcuttings with a greater number of roots and without the undesirable formation of callus. Survival of plantlets in the *ex vitro* acclimatization process was approximately 80%. The results obtained contribute to the propagation and demonstrate the advantages and potential of the suggested protocol for the conservation of the species which, despite being recently described, is already in a critical state of conservation. The analysis of volatile terpenoids revealed the presence of Thymol as the majority component, a substance with antibacterial action widely used by the pharmaceutical industry.

Keywords: Campos Rupestres, endemic species, biodiversity conservation, plant tissue culture, acclimatization, pharmacological potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Indivíduo de <i>Stachytarpheta odorata</i> em cultivo na estação experimental da UFJF.....	18
Figura 2	– Frutos de <i>S. odorata</i> composto por duas clusas.....	19
Figura 3	– Explantes de <i>S. odorata</i> na sala de crescimento.....	20
Figura 4	– Explantes de <i>S. odorata</i> inoculados em meio de enraizamento.....	22
Figura 5	– Indivíduo aclimatizado de <i>S. odorata</i> mantida em vaso.....	23
Figura 6	– Explantes de <i>S. odorata</i> em meio de multiplicação, na presença de diferentes concentrações de BAP e ANA, após 45 dias de inoculação.....	26
Figura 7	– Explantes de <i>S. odorata</i> em meio de enraizamento, na presença de diferentes concentrações de auxinas, após 40 dias de inoculação.....	32
Figura 8	– Porcentagem dos compostos majoritários encontrados em <i>S. odorata</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Número médio de brotações em explantes de <i>S. odorata</i> cultivados <i>in vitro</i> em resposta a diferentes concentrações de BAP e ANA, 45 dias após o início do experimento.....	27
Tabela 2	– Número de internódios em explantes de <i>S. odorata</i> cultivados <i>in vitro</i> em resposta a diferentes combinações de BAP e de ANA, 45 dias após o início do experimento.....	28
Tabela 3	– Altura média (cm) das brotações em explantes de <i>S. odorata</i> cultivados <i>in vitro</i> em resposta a diferentes combinações de BAP e de ANA, 45 dias após o início do experimento.....	29
Tabela 4	– Presença de calos em explantes de <i>S. odorata</i> cultivados <i>in vitro</i> em resposta a diferentes concentrações de ANA e BAP, 45 dias após o início do experimento.....	30
Tabela 5	– Número médio de raízes em explantes de <i>S. odorata</i> cultivados <i>in vitro</i> em resposta a diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB, 40 dias após o início do experimento.....	32
Tabela 6	– Altura média das brotações (cm) em explantes de <i>S. odorata</i> cultivados <i>in vitro</i> em resposta a diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB, 40 dias após o início do experimento.....	33
Tabela 7	– Presença de calos dos explantes de <i>S. odorata</i> cultivados <i>in vitro</i> em resposta a diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB, 40 dias após o início do experimento.....	34
Tabela 8	– Compostos orgânicos majoritários da <i>Stachytarpheta odorata</i> comparados com os encontrados nas três espécies do Gênero <i>Stachytarpheta</i> com uso medicinal.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Cadeia do Espinhaço, uma região em risco.....	14
1.2	A Serra do Cipó e os Campos Rupestres.....	14
1.3	A família Verbenaceae.....	14
1.4	O gênero <i>Stachytarpheta</i> e a espécie <i>S. odorata</i>	15
1.5	A cultura de tecidos no contexto da preservação das espécies.....	15
1.6	Os Terpenóides.....	16
1.7	Objetivos do estudo.....	17
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> dos explantes de <i>S. odorata</i>	18
2.2	Multiplicação <i>in vitro</i> dos explantes de <i>S. odorata</i>	20
2.3	Enraizamento <i>in vitro</i> dos explantes de <i>S. odorata</i>	21
2.4	Aclimatização <i>ex vitro</i> dos explantes de <i>S. odorata</i>	22
2.5	Extração e análise dos compostos terpênicos de <i>S. odorata</i>	23
2.6	Tratamento dos dados coletados.....	24
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	25
3.2	Multiplicação <i>in vitro</i>	25
3.3	Enraizamento <i>in vitro</i>	31
3.4	Aclimatização <i>ex vitro</i>	34
3.5	Compostos terpênicos voláteis encontrados em <i>S. odorata</i>	35
4	CONCLUSÕES.....	37
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

A Cadeia do Espinhaço é uma região ameaçada pela ação do turismo desenfreado e de garimpo na região, que ocorre desde a época do Brasil colônia, e mais recentemente, pela mineração, muito mais degradante, sendo um cenário de risco para diversas espécies da região, que devido a essas ações antrópicas, têm seu habitat ameaçado (Mucida *et al.*, 2019). Porém, a região também é alvo de diversos projetos de conservação, que visam manter ou recuperar populações em risco, sendo o presente estudo, fruto de um desses projetos (“Citogenética, Propagação e fitoquímica de Verbenaceae da Serra do Cipó, MG. Edital Universal Fapemig: CRA 995/03”), que contou com a participação dos professores e pesquisadores Paulo Henrique Pereira Peixoto, Fátima Regina Gonçalves Salimena, Lyderson Facio Viccini, Celso do Lago Paiva (ICM-Bio-Serra do Cipó), e teve por objetivo, coletar espécies de Verbenaceae da região, bem como realizar análises citogenéticas e manter bancos de germoplasma das mesmas, visando compreender melhor esse grupo taxonômico e possibilitar projetos futuros de reintrodução, caso necessário. Dois exemplares coletados na sub região da Serra do Cipó foram trazidos ao Departamento de Botânica da UFJF e identificados apenas como “*Stachytarpheta* sp.”, pois apresentavam sinapomorfias do grupo, porém não foram reconhecidos como sendo de nenhuma espécie de *Stachytarpheta* conhecida, sendo então descrita em 2023 por um grupo de pesquisadores da UFJF e UFRJ como uma nova espécie, *Stachytarpheta odorata* P.H.Cardoso & Salimena. Há diversos trabalhos na literatura que tratam do cultivo *in vitro* de Verbenaceae, porém, cada espécie mostra respostas distintas aos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura (Peixoto *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2015; Rajender *et al.*, 2012, 2017), tornando necessário a criação de protocolos de micropropagação específicos. A cultura de tecidos vegetais oferece a possibilidade de se obter plantas saudáveis em número superior ao que seria conseguido por outros meios (Alves *et al.*, 2008), sendo uma alternativa tentadora para projetos de reintrodução de espécies vegetais na natureza.

A análise dos compostos terpênicos da espécie também foi realizada, pois, por meio da relação desses compostos, é possível elucidar questões taxonômicas dentro do grupo a qual ela pertence, um ponto interessante para uma espécie recém descrita. As análises fitoquímicas também podem ser estratégicas para plantas em risco de extinção, visto que, se encontradas substâncias de interesse para os seres humanos - em especial com uso medicinal -, os argumentos para a preservação da espécie tornam-se mais fortes.

Um ponto importante a ser exposto, é o de que, apesar de a análise dos resultados dos experimentos aqui apresentados terem sido feitas em 2023, tais

experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal das UFJF ainda em 2006 pela equipe do laboratório, composta pelo professor e Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto e os alunos de iniciação científica Leonardo da Silva Garcia, Steveen Ribeiro Leal, Maiana Reis Pimenta e Uanderson de Jesus Pereira. Os resultados desses experimentos se mantiveram no banco de dados do laboratório até o presente momento devido a falta de identificação apropriada para o material, problema agora superado pela recente descrição da espécie estudada.

1.1 Cadeia do Espinhaço, uma região em risco

Com altitudes médias de 1.000 m, a Cadeia do Espinhaço é uma província geológica que se estende pelos estados de Minas Gerais e Bahia por mais de 1.000 km, tendo seu limite sul no Quadrilátero Ferrífero, MG e limite norte na Serra da Jacobina, BA (Gontijo, 2008). É uma região de grande diversidade florística, com destaque para espécies com distribuição restrita (Rapini *et al.*, 2008). Infelizmente, a expansão de atividades antrópicas predatórias nessa região, somente contribui para sua degradação (Mucida *et al.*, 2019), algo que poderia ser atenuado ou até revertido através de projetos de conservação mais efetivos (Rapini *et al.*, 2008).

1.2 A Serra do Cipó e os Campos Rupestres

Campos rupestres são campos de vegetação rasteira e arbustiva típicos do alto de formações rochosas de origem pré-cambriana com altitude moderada (acima de 900m em relação ao nível do mar), onde o substrato é um solo raso acomodado entre afloramentos rochosos, sendo, no Brasil, uma vegetação típica dos topos de serras do Leste do país (Vasconcelos *et al.*, 2011). Os campos rupestres brasileiros são reconhecidos como sendo centros de endemismo da flora neotropical (Giulietti & Pirani, 1987). Um dos pontos no território brasileiro onde pode-se encontrar esse tipo de vegetação é na Serra do Cipó, uma sub-região da Cadeia do Espinhaço considerada um *hotspot* biológico (Drummond *et al.*, 2005). Porém, assim como em outras regiões da Cadeia do Espinhaço, o turismo desordenado se tornou um problema na região.

1.3 A família Verbenaceae

Verbenaceae J.St.-Hil., composta por 32 gêneros e cerca de 800 espécies, é encontrada em várias regiões do mundo, com exceção ao continente Antártico

(Atkins 2004, Marx *et al.* 2010, Cardoso *et al.* 2021). No entanto, sua maior diversidade se encontra no Brasil (15 gêneros e 294 espécies), tornando-a uma família de grande importância na flora do país (Salimena *et al.*, 2023). Essa família exibe um alto grau de endemismo no Brasil (187 spp.) (Salimena *et al.* 2015). São plantas arbustivas/subarbustivas, arbóreas, herbáceas, lianescentes; com folhas simples, margem inteira ou não, geralmente pilosas; sendo aromáticas ou não; as flores são tubulares, gamossépalas e gamopétalas, com verticilos protetores podendo apresentar cores diversas (Salimena *et al.* 2023).

1.4 O gênero *Stachytarpheta* e a espécie *S. odorata*

Stachytarpheta compreende cerca de 120 espécies distribuídas principalmente nas Américas, com poucos representantes no Velho Mundo (Atkins 2005, Cardoso *et al.* 2021). O Brasil é o principal centro de riqueza do gênero, apresentando muitas espécies endêmicas que exibem padrão de distribuição restrito.

O que difere a *S. odorata* das outras espécie de *Stachytarpheta* é a presença de tricomas glandulares abundantes e pedicelados distribuídos por toda a superfície do caule e folhas, o que confere à esses órgãos uma textura pegajosa e aroma distintos, além de características morfológicas das flores, como o comprimento e cor (Cardoso *et al.* 2021)

O caminho até a descrição da espécie começou com a coleta de dois espécimes, próximo à sede do Ibama-Parna da Serra do Cipó, em Santana do Riacho - MG, em 2006, com as seguintes identificações no Herbário CESJ: F.R.G. Salimena *et al.* 1272 e F.R.G. Salimena 3722. Esses espécimes permaneceram sem identificação definitiva até 2023, quando sua descrição como uma nova espécie foi publicada.

A partir dos espécimes coletados, foram estabelecidos cultivos *in vitro* e *ex vitro*, no banco de germoplasma do Laboratório de Fisiologia Vegetal - UFJF (apresentada neste trabalho), e na estação experimental da UFJF, respectivamente. Em visitas realizadas ao local de coleta dos espécimes nos anos de 2022 e 2023, não foram encontrados remanescentes da população observada em 2006, o que classifica a espécie como “criticamente ameaçada” (AOO<10 km² B2ab (i, ii, iii, iv)), sendo a única população conhecida da espécie, até o momento, correspondente às plantas sob cultivo na estação experimental da UFJF.

1.5 A cultura de tecidos no contexto da preservação das espécies

Apesar de a literatura conter numerosos estudos sobre o cultivo *in vitro* de Verbenaceae, há uma carência de pesquisas relacionadas ao gênero *Stachytarpheta* (Rajender *et al.*, 2012, 2017). Com o desenvolvimento da biotecnologia, a micropropagação surgiu como uma técnica de grande eficiência na produção em larga escala de plantas sendo desenvolvidos numerosos protocolos para a produção comercial de mudas, bem como para a preservação de espécies vegetais em risco de extinção (Sousa *et al.*, 2007).

A micropropagação oferece muitas vantagens em relação às outras formas de propagação mais tradicionais, como a estaquia ou a alporquia, principalmente no que diz respeito à quantidade de clones obtidos a cada repicagem, bem como na otimização do uso de espaço para o cultivo dessas plantas (Schuch & Erig, 2005). Por conta da possibilidade de se cultivar um número relativamente grande de plantas em pequenos espaços e em locais fechados e com iluminação artificial de baixa intensidade, a micropropagação se torna uma alternativa muito mais acessível à criação e manutenção de bancos de germoplasma, principalmente em locais com pouca disponibilidade de áreas livres para plantio e com incidência solar mínima para o cultivo tradicional dessas plantas. Os meios de cultura mais utilizados para essa finalidade são o MS (Murashige & Skoog, 1962), o B5 (Gamborg *et al.*, 1968) e o de White (White, 1963), podendo ser modificados quanto a sua composição ou concentração final de acordo com as necessidades e limitações da espécie a ser cultivada. A definição do meio de cultura adequado a cada espécie é imprescindível para o sucesso da propagação de culturas *in vitro* (Schuch & Erig, 2005). Os elementos essenciais presentes em um meio de cultura incluem macro e micronutrientes, sacarose, vitaminas e o mio-inositol (Fortes & Pereira, 2003).

A depender da forma de cultivo, pode ser utilizado também um agente gelificante (ágar ou Phytigel), que farão o papel de estabilizar espacialmente a planta, aqui chamada de explante, na posição desejada, para que seu crescimento aconteça de forma mais eficiente (Rezende *et al.*, 2018).

Um recurso que otimiza todo o processo de micropropagação é a utilização de reguladores de crescimento (RCs), substâncias análogas aos fitohormônios, moléculas essenciais em todo o processo de desenvolvimento e manutenção fisiológica das plantas. Com a definição de quais RCs atuarão em determinada quantidade e em qual etapa do desenvolvimento das culturas, podemos induzir a morfogênese de forma conveniente para o objetivo desejado (Hartmann *et al.* 2002). Os RCs mais utilizados na micropropagação são das classes das auxinas, atuando na rizogênese e alongamento celular, com destaque para o ácido indol-3-acético (AIA), o ácido indol-3-butírico (AIB) e o ácido α -naftaleno acético (ANA); e as citocininas, atuando diretamente na divisão celular, sendo a mais utilizada a 6-benzilaminopurina (BAP) (Pierik, 1990; Einsert, 1991; George, 1993).

1.6 Os terpenóides

Os terpenóides são uma classe de metabólitos secundários vegetais com estruturas diversas, desempenhando papéis fundamentais no crescimento e desenvolvimento das plantas, na resposta ao meio ambiente e nos processos fisiológicos (Ringuelet & Viña, 2013). Também são amplamente utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, pois podem possuir efeitos antitumorais, anti-inflamatórios, antibacterianos, antivirais, antimaláricos, hipoglicemiantes, entre outros (Toscan, 2010; Montenegro *et al.*, 2006). Além disso, estudos também descobriram que os terpenóides têm muitas aplicações potenciais, como resistência a insetos, imunorregulação, antioxidante, antienvelhecimento e neuroproteção (Yang *et al.*, 2020). Além de sua função na saúde, os terpenóides apresentam alto potencial para serem utilizados como conservantes naturais de alimentos industrializados, podendo ser uma alternativa mais saudável às opções atualmente utilizadas (Masyita *et al.*, 2022).

As espécies de Verbenaceae são amplamente utilizadas pela medicina tradicional e na indústria farmacêutica por conta da grande variedade de terpenóides com ação medicinal encontrados em seus óleos essenciais, com destaque para os gêneros *Lippia* L. (Singulani *et al.*, 2012), e *Stachytarpheta*, em especial para *S. gesnerioides* Cham. (Silva *et al.*, 2012), *S. cayennensis* (Rich.) Vahl (Aparecida *et al.*, 2023) e *S. jamaicensis* (L.) Vahl (Onyedikachi *et al.*, 2022), por serem espécies já utilizadas na medicina tradicional.

1.7 Objetivos do estudo

Levando em consideração o exposto, o objetivo do presente estudo foi estabelecer e multiplicar *in vitro* culturas de *Stachytarpheta odorata*, avaliando diferentes concentrações de reguladores de crescimento na multiplicação e no enraizamento, finalizando com a aclimatização das plantas em condições *ex vitro*, além de realizar a análise dos compostos terpênicos voláteis majoritários de amostras dessa espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento *in vitro* dos explantes de *S. odorata*

Inicialmente foram conduzidos os procedimentos para o estabelecimento *in vitro* de culturas assépticas de *Stachytarpheta odorata*. Para tal, foram utilizados frutos coletados dos espécimes F.R.G. Salimena *et al.* 1272 e F.R.G. Salimena 3722. Nas Figuras 1 e 2 é possível observar, respectivamente, um indivíduo de *S. odorata* em estado vegetativo sob cultivo na estação experimental da UFJF, e seus frutos já despidos de seus cálice persistente.

Figura 1 - Indivíduo de *Stachytarpheta odorata* em cultivo na estação experimental da UFJF



Fonte: Vagner R. A. Silva (2023).

Ainda em campo, os frutos foram coletados dos espécimes já citados e levados ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFJF, onde a desinfestação dos mesmos foi realizada. Esses foram imersos em solução de água sanitária comercial (com 2% de cloro ativo), na concentração de 30% por 20 min. Optou-se pela inoculação das valvas dos frutos ao invés de somente as sementes, em vista à dificuldade de extraí-las sem que fossem danificadas no processo.

Figura 2 - Frutos de *Stachytarpheta odorata* composto por duas clusas.



Fonte: Vagner R. A. Silva (2023).

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os frutos foram lavados em água destilada e autoclavada por, no mínimo, cinco vezes e inoculados em meio “MS” (Murashige e Skoog, 1962), na metade da força dos sais, adicionado de 7 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose, sem adição de reguladores de crescimento (RC). O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,7±0,1, antes da autoclavagem.

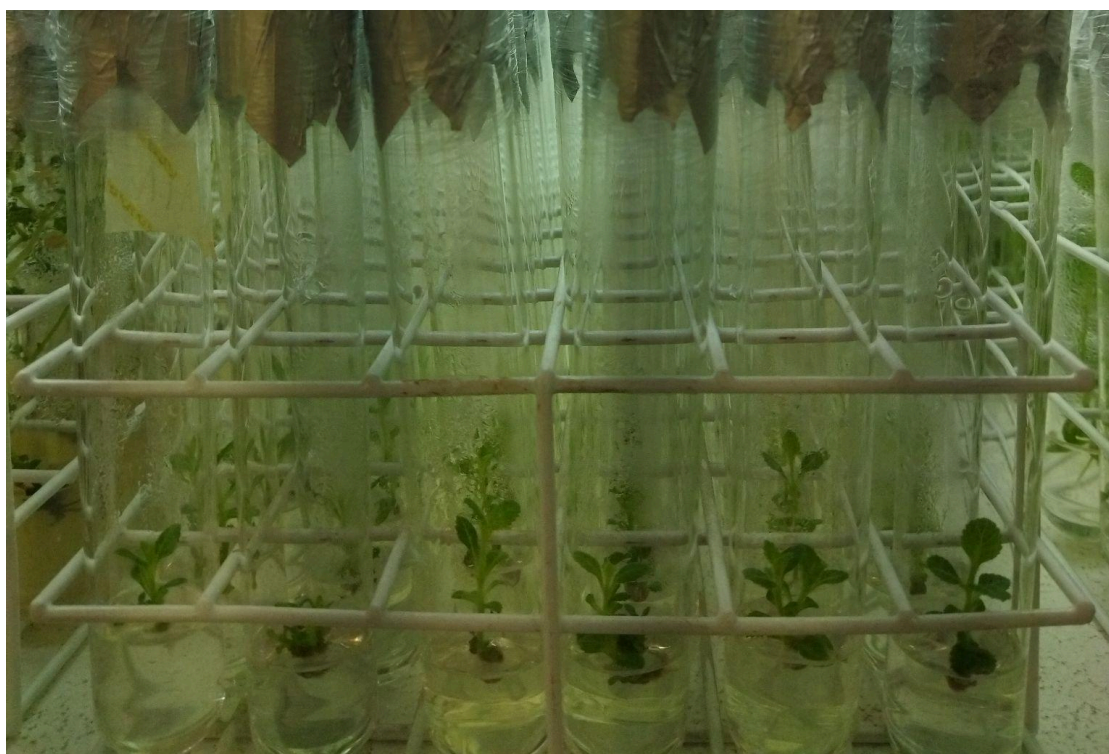
Os frutos foram inoculados assepticamente em câmara de fluxo laminar horizontal Veco™, em tubos de ensaio de 2,5 x 15 cm. Posteriormente, os tubos de ensaio foram fechados com tampas de papel alumínio e vedados com fitas de filme de PVC (15 µm de espessura). Em seguida, eles foram transferidos para sala de crescimento, permanecendo à temperatura de ~26°C, sob iluminação de lâmpadas fluorescentes de 40W, com intensidade de 45 µmoles de fótons m⁻² s⁻¹ em fotoperíodo de 16-8 horas claro/escuro. A ocorrência de contaminações por fungos e bactérias foi acompanhada diariamente.

Após o estabelecimento e crescimento inicial, as plântulas foram repicadas, e os explantes mantidos em meio de cultura MS na força total dos sais e vitaminas e sem RCs até que, após sucessivas repicagens, fosse obtido o número necessário de explantes a serem utilizados nos experimentos subsequentes.

2.2 Multiplicação *in vitro* dos explantes de *S. odorata*

No experimento de multiplicação foram utilizados explantes de *S. odorata*, constituídos de segmentos nodais retirados de plântulas já estabelecidas e cultivadas assepticamente *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS, na força total dos sais, suplementados com 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, e acrescidos dos seguintes RCs: BAP (benzilaminopurina ou benziladenina - BA) nas concentrações de 0; 1,5; 3,0 e 4,5 µM, e ANA (ácido naftaleno acético), nas concentrações de 0; 5,4; 54 e 540 nM. Os reguladores de crescimento foram combinados, totalizando 16 tratamentos, com 10 repetições cada. Os explantes foram inoculados assepticamente em câmara de fluxo laminar e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições relatadas anteriormente.

Figura 3 - Explantes de *S. odorata* mantidos *in vitro* em sala de crescimento



Autor: Vagner R. A. Silva (2023).

Após um período de 45 dias de crescimento *in vitro*, as culturas foram avaliadas quanto às seguintes características: número de brotações, número de segmentos nodais, altura das brotações e desenvolvimento de calos. Os dados obtidos para as duas primeiras características (dados numéricos discretos) foram transformados para raiz quadrada de $\sqrt{X+0,5}$, a altura das brotações (dato numérico contínuo) foi transformada para $\log \sqrt{X+1}$.

2.3 Enraizamento *in vitro* dos explantes de *S. odorata*

No experimento de enraizamento foram utilizados explantes de *S. odorata* oriundos de cultivos *in vitro* em meio MS sem adição de RCs. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS com força total dos sais, suplementados com as seguintes auxinas: ANA (ácido naftaleno acético), ou AIA (ácido indolacético) ou AIB (ácido indolbutírico) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 μM , além do controle (meio sem adição de hormônios), totalizando 13 tratamentos, com 10 repetições cada.

Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento, nas mesmas condições ambientais relatadas anteriormente. Após um período de 40 dias de permanência na sala de crescimento, foram avaliadas as seguintes características: número de raízes, altura das brotações e presença de calos. Os dados obtidos para o número de raízes (dados discretos) foram transformados para raiz quadrada de $\sqrt{X+0,5}$, e os dados da altura das brotações (dados contínuos) foram transformados para $\log \sqrt{X+1}$.

Figura 4 - Explantes de *S. odorata* inoculados em meio de enraizamento



Autor: Vagner R. A. Silva (2023).

2.4 Aclimatização *ex vitro* dos explantes de *S. odorata*

Após o experimento de enraizamento, foi feita a repicagem dos explantes de *S. odorata* para meio de cultura com a adição da auxina mais efetiva para o enraizamento, na concentração mais adequada ($0,1 \mu\text{M}$ de ANA), visando à obtenção de microestacas enraizadas em número suficiente para o experimento de aclimatização. Após 40 dias de cultivo na sala de crescimento, os explantes enraizados foram retirados dos tubos de ensaio e suas raízes foram lavadas em água corrente para remover o meio de cultura residual. Em seguida, as plântulas foram transplantadas para bandejas de isopor com 128 células, preenchidas com substrato vegetal Plantmax HT (Hortaliças), composto por vermiculita, casca de arroz carbonizado e fibra de coco, e cobertas com plástico transparente para criar condições de alta umidade, permanecendo à sombra por 15 dias, com pulverização e irrigação diárias. Após esse período, as bandejas foram transferidas para casa de vegetação, onde ficaram sob um sistema automatizado de irrigação por

microaspersão e sombrite a 70% de sombra por 30 dias, antes de serem transplantadas para vasos preenchidos com o mesmo substrato da bandeja e expostas à luz solar direta (como ilustrado na figura 5). Após esse processo, a porcentagem de sobrevivência das plântulas foi contabilizada.

Figura 5 - Indivíduo aclimatizado de *S. odorata* mantida em vaso



Autor: Vagner R. A. Silva (2023).

2.5 Extração e análise dos compostos terpênicos voláteis de *S. odorata*

Foram analisados os principais constituintes terpênicos voláteis (CTVs) presentes nos tecidos de *S. odorata*. Para tal, utilizou-se a técnica de microextração de CTVs e, posteriormente, análises por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (CG-MS).

Para a microextração dos CTVs, foram utilizadas três amostras frescas

(aproximadamente 300 mg) de plântulas mantidas *in vitro* em meio MS, na força total dos sais e vitaminas, sem a adição de reguladores de crescimento vegetal. As amostras foram extraídas por 1h, à temperatura ambiente, em banho ultrassônico (Thornton - Inpec Eletrônica, Vinhedo, Brasil) a 70 kHz, na presença de 1,0 mL de hexano e 0,5 mL de metanol. Após esse procedimento, o solvente foi filtrado em pavoio de algodão estéril (Castro *et al.*, 2019). Os filtrados resultantes (1 µL de solução límpida) contendo os CTVs foram analisados por CG-MS.

A análise dos CTVs foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (GC–MS-QP2010 Plus; Shimadzu, Kyoto, Japão) usando coluna Ttx Wax® (Restek, Bellefonte, PA, EUA) de 30 m × 0,25 mm. A temperatura inicial do forno foi ajustada para 100°C e mantida por 3 min, seguida de um aumento de 7°C min⁻¹ para 190°C. O injetor foi operado em modo split (1:20) a 220°C, e a interface e o detector de massa foram operados a 220°C. Hélio foi usado como gás de arraste, com vazão de 1,53 mL min⁻¹. Uma mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C₉H₂₀, C₁₀H₂₂:... C₂₅H₅₂ e C₂₆H₅₄) foi injetada nas mesmas condições das amostras. Os constituintes majoritários presentes no extrato foram identificados pela comparação dos espectros de massa obtidos no banco de dados NIST 9.0 (correlação >97%) e foram confirmados pelo índice de retenção correspondente (Índice de Kováts) comparado com dados da literatura (Adams, 1997).

2.6 Tratamento dos dados coletados

Os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas por testes específicos antes da realização da Análise de Variância (ANOVA). Para dados de interação (BAP x ANA) foi realizada ANOVA bidimensional (two-way) e para os dados de enraizamento e dos teores de constituintes terpênicos voláteis (CTVs) empregou-se ANOVA unidirecional (one-way). Após esta etapa, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas usando o programa SAEG (Sistema para Análise Estatística, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV, Brasil).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento *in vitro*

O método adotado para a desinfestação se mostrou eficaz, com um índice de contaminação de 75%, permitindo o estabelecimento de culturas completamente isentas de contaminação em quantidade suficiente para o cultivo *in vitro*. Os explantes inoculados apresentaram crescimento saudável e foram transferidos para meio MS sem RCs, não mostrando sinais de oxidação fenólica até a realização do experimento de multiplicação. Esses resultados são consistentes com observações anteriores em estudos semelhantes com outras espécies de Verbenaceae cultivadas *in vitro* (Peixoto *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2015).

3.2 Multiplicação *in vitro*

Culturas de *S. odorata*, após um período de 45 dias de multiplicação *in vitro*, podem ser observadas na Figura 6, que ilustra os 16 tratamentos do experimento. Os tratamentos com BAP 3 μM x ANA 5,4 nM; BAP 3 μM x ANA 540 nM; BAP 4,5 μM x ANA 54 nM; e BAP 4,5 μM x ANA 540 nM apresentaram mortalidade das culturas na avaliação realizada 45 dias após a repicagem (embora as culturas tenham se desenvolvido e apresentado multiplicação antes desse momento). Tal fato pode ser atribuído a fatores alheios aos efeitos dos reguladores de crescimento, como falha nos ajustes dos pHs dos meios de cultura ou nas concentrações dos RCs utilizados, uma vez que nenhuma das 10 repetições apresentou explantes vivos no momento da análise e essa ocorrência não foi percebida somente nos tratamentos contendo as concentrações mais elevadas dos RCs.

Figura 6 - Explantes de *S. odorata* em meios de multiplicação, na presença de diferentes concentrações de BAP e ANA, após 45 dias de inoculação.



1) BAP 0 μM x ANA 0 nM (controle); 2) BAP 0 μM x ANA 5,4 nM; 3) BAP 0 μM x ANA 54 nM; 4) BAP 0 μM x ANA 540 nM; 5) BAP 1,5 μM x ANA 0 nM; 6) BAP 1,5 μM x ANA 5,4 nM; 7) BAP 1,5 μM x ANA 54 nM; 8) BAP 1,5 μM x ANA 540 nM; 9) BAP 3 μM x ANA 0 nM; 10) BAP 3 μM x ANA 5,4 nM; 11) BAP 3 μM x ANA 54 nM; 12) BAP 3 μM x ANA 540 nM; 13) BAP 4,5 μM x ANA 0 nM; 14) BAP 4,5 μM x ANA 4,4 nM; 15) BAP 4,5 μM x ANA 54 nM; 16) BAP 4,5 μM x ANA 540 nM.

Autor: Paulo H. P. Peixoto (2006).

O número médio de brotações por explante de *S. odorata* pode ser observado na Tabela 1. Os resultados das análises demonstraram efeitos significativos ($p < 0,05$) para a interação entre as concentrações de BAP e ANA. Todavia, a adição dessa auxina mostrou efeitos negativos sobre a multiplicação das brotações.

Tabela 1 – Número médio de brotações em explantes de *S. odorata* cultivados *in vitro* em resposta a diferentes concentrações de BAP e ANA, 45 dias após o início do experimento.

ANA					
BAP	0	5,4 nM	54 nM	540 nM	Médias
0 μ M	1,1 b	1,8 a	1,9a	1,1 b	1,5 B
1,5 μ M	4,5 a	3,1 b	2,2 c	1,0 d	2,7 A
3,0 μ M	2,7 a	1,1 b	1,4 b	1,0 b	1,6 B
4,5 μ M	2,2 a	2,4 a	1,0 b	1,0 b	1,7 B

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (nas linhas de cada concentração de BAP) e maiúsculas (na coluna das médias) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

É evidente que a adição de BAP ao meio de cultura resultou em um aumento significativo no número médio de brotações, com os valores mais expressivos alcançados na concentração de 1,5 μ M, onde a média de brotações por explante atingiu 4,5. Todavia, na maior concentração desse RC (4,5 μ M), houve queda no número de brotações para menos da metade. Observou-se, no geral, que a concentração de 1,5 μ M foi a que proporcionou as maiores taxas de multiplicação/explante inoculado, tanto na média dos tratamentos com diferentes concentrações de ANA, quanto nos resultados isolados. Concentrações mais elevadas de BAP causaram redução no número de brotações, e apesar de a diferença não ser significativa, a fim de reduzir os custos de produção do meio de

cultivo e evitar uso desnecessário de RCs, esses tratamentos não são indicados para a multiplicação *in vitro* de *S. odorata*, quando a intenção for a obtenção de um maior número de brotações.

A adição de auxinas reduziu o número de brotações em todas as concentrações de BAP; sendo assim, nós consideramos como o tratamento mais adequado para indução de múltiplas brotações o suplementado com 1,5 μM de BAP, sem inclusão de ANA. Esse resultado era, de certo modo, esperado, uma vez que o BAP induz a multiplicação de brotações, enquanto ANA atua diretamente no alongamento celular e no enraizamento (Skoog & Miller, 1957). Os resultados referentes ao número de segmentos nodais produzidos por explante estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de segmentos nodais em explantes de *S. odorata* cultivados *in vitro* em resposta a diferentes combinações de BAP e de ANA, 45 dias após o início do experimento.

ANA					
BAP	0	5,4 nM	54 nM	540 nM	Média
0 μM	4,8 c	6,0 b	8,6 b	10,0 a	7,4 B
1,5 μM	11,2 a	10,7 a	12,5 a	8,1 b	10,6 A
3,0 μM	15,4 a	6,1 b	4,6 c	2,1 d	7,1 B
4,5 μM	6,2 b	12,3 a	2,4 c	3,1 c	6,0 B

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (nas linhas de cada concentração de BAP) e maiúsculas (na coluna das médias) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No geral, o tratamento com 1,5 μM de BAP foi o que proporcionou o maior número médio de segmentos nodais. Porém, esse resultado representa a média das médias dos tratamentos contendo BAP a 1,5 μM em resposta às diferentes concentrações de ANA. Todavia, a quantidade de segmentos nodais no tratamento

com 3,0 μM de BAP e sem adição de ANA (15,4 brotações) foi maior que o valor médio observado para o BAP a 1,5 μM (10,6 brotações). Portanto, 3,0 μM de BAP foi considerado o melhor tratamento para a proliferação de brotos de *S. odorata*.

Em relação ao alongamento das brotações, efeitos significativos também foram observados para a interação BAP x ANA. As médias obtidas para esse parâmetro podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Altura média (cm) das brotações em explantes de *S. odorata* cultivados *in vitro* em resposta a diferentes combinações de BAP e de ANA, 45 dias após o início do experimento.

ANA					
BAP	0	5,4 nM	54 nM	540 nM	Média
0 μM	8,4 b	9,2 b	12,4 a	13,3 a	10,8 A
1,5 μM	7,3 b	8,4 b	11,6 a	6,9 b	8,6 B
3,0 μM	6,6 a	3,1 b	4,2 b	1,0 c	3,7 C
4,5 μM	2,5 b	5,1 a	1,0 c	1,3 c	2,5 C

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (nas linhas de cada concentração de BAP) e maiúsculas (na coluna das médias) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pela tabela, é possível observar que, em todas as concentrações, o acréscimo de BAP levou a uma redução no tamanho dos explantes. Dessa forma, os melhores resultados para esse parâmetro foram observados na ausência do BAP. Nesse caso, brotos mais alongados foram obtidos em resposta ao ANA na concentração de 540 nM, cujas brotações apresentaram, em média, pouco mais de 13 cm.

Um maior alongamento dos explantes pela ação das auxinas poderia ser benéfico não só na fase de repicagem, onde permitiria um melhor aproveitamento dos fitômeros como microestacas, aumentando, assim, seu rendimento, mas, também, na fase de enraizamento *in vitro*, influenciando positivamente na

sobrevivência das culturas durante a aclimatização *ex vitro*.

Outro parâmetro avaliado neste estudo foi o desenvolvimento de calos. A formação de calos não-friáveis, com coloração esverdeada, foi observada em resposta à suplementação dos meios de cultura com BAP, independente da concentração de ANA, como pode ser observado na Tabela 4 e na Figura 6.

Tabela 4 – Formação de calos em explantes de *S. odorata* cultivados *in vitro* em resposta a diferentes concentrações de ANA e BAP, 45 dias após o início do experimento.

BAP	ANA			
	0	5,4 nM	54 nM	540 nM
0 μ M	-	-	-	-
1,5 μ M	-	-	Sim	-
3,0 μ M	Sim	Sim	Sim	Sim
4,5 μ M	Sim	Sim	Sim	Sim

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Pela análise da tabela é possível observar que, em concentrações mais elevadas de BAP (3 e 4,5 μ M) houve o desenvolvimento de calos, condição também observada em resposta ao tratamento suplementado com 1,5 μ M de BAP e 54 nM de ANA, aqui considerado um *outlier*.

A calogênese, nessas condições, já era esperada, visto que também foi observada em outras espécies da mesma família (Peixoto *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2015; Moreno *et al.*, 2015)

O alongamento dos explantes é importante para as repicagens subsequentes. Explantes com entrenós mais longos facilitam o manuseio durante a secção na câmara de fluxo laminar e também a sua inoculação no meio de cultura; porém, o parâmetro mais relevante na etapa de multiplicação é o número de

segmentos nodais, pois esse fator tem implicação direta na quantidade de propágulos gerados para as etapas de repicagem subsequentes. Em função disso, o número de segmentos nodais deve ser um fator preponderante na otimização e no estabelecimento de protocolos de multiplicação em larga escala. Porém, o alongamento dos explantes também é impactante no processo de repicagem, pois entrenós mais alongados permitem a utilização de apenas um fitômero por tubo no processo de repicagem, aumentando o rendimento geral.

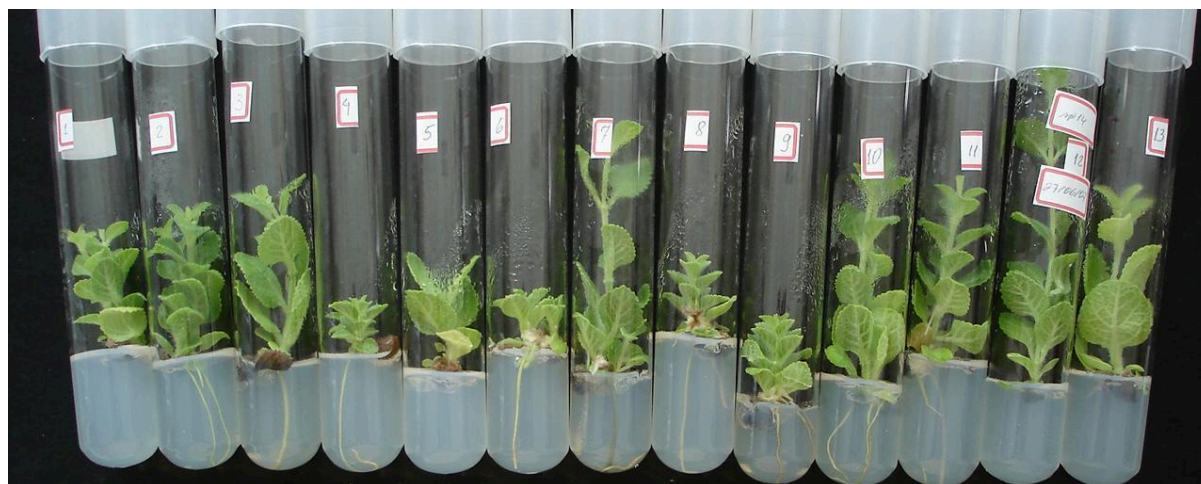
O tratamento que rendeu o maior número de segmentos nodais foi o suplementado com 3 μ M de BAP (sem a adição de ANA). Esse tratamento, apesar de não gerar explantes muito alongados, proporcionou um número considerável de brotações por explante (2,7 brotações), tendo médias de 15,4 segmentos nodais, com cerca de 1,2 cm de comprimento para cada fitômero. Analisando esses parâmetros em conjunto, é possível atribuir a esse tratamento destaque em termos de quantidade e qualidade dos explantes produzidos.

A suplementação de um meio de cultura apenas com BAP (sem a adição de outros RCs) para um cultivo *in vitro* de explantes com resultados mais prolíficos em um procedimento de repicagem não é uma tendência encontrada nos resultados de diversos estudos de estabelecimento de protocolos de cultivo para Verbenaceae (Braga *et al.*, 2012; Balaraju *et al.*, 2008; Peixoto *et al.*, 2006). Porém, também há relatos de espécies cujo meio de cultivo mais adequado para a fase de multiplicação eram suplementados somente de BAP (Resende *et al.*, 2014; Fentahun *et al.*, 2017). Esses resultados sugerem que, apesar de algumas espécies serem beneficiadas pela interação dos RCs, nesta fase do cultivo *in vitro*, outras alcançam seu maior rendimento somente com citocininas, o que reforça a necessidade de se experimentar tratamentos com somente um RC nesse tipo de estudo, não só como controle em relação aos tratamentos onde há a presença de outro RC, mas, também, como uma alternativa econômica e viável a ser considerada.

3.3 Enraizamento *in vitro*

Uma vez obtidos explantes suficientes na fase de multiplicação, diferentes concentrações de três auxinas foram avaliadas visando estimular a rizogênese. Culturas submetidas ao processo de enraizamento *in vitro* podem ser observadas na Figura 7, que ilustra os 13 tratamentos testados. O número médio de raízes obtidas em resposta a cada tratamento pode ser visualizado na Tabela 5. Neste ensaio, foram testadas quatro concentrações das auxinas ANA, AIA e AIB, mais o controle, em um período de 40 dias de desenvolvimento *in vitro*.

Figura 7 - Explantes de *Stachytarpheta odorata* em meio de enraizamento, na presença de diferentes concentrações de auxinas, após 40 dias de inoculação.



1) Meio sem auxinas (controle); 2) ANA 0,1 μM ; 3) ANA 0,2 μM ; 4) ANA 0,3 μM ; 5) ANA 0,4 μM ; 6) AIA 0,1 μM ; 7) AIA 0,2 μM ; 8) AIA 0,3 μM ; 9) AIA 0,4 μM ; 10) AIB 0,1 μM ; 11) AIB 0,2 μM ; 12) AIB 0,3 μM ; 13) AIB 0,4 μM .

Autor: Paulo H. P. Peixoto (2006)

O número médio de raízes obtido em explantes de *S. odorata* pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 5 – Número médio de raízes em explantes de *S. odorata* cultivados *in vitro* em resposta a diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB, 40 dias após o início do experimento.

	ANA	AIA	AIB
0	0 d	0 d	0 d
0,1 μM	3,2 a	0,9 c	2,2 b
0,2 μM	0,9 c	0,8 c	2,1 b
0,3 μM	1,1 c	1,2 c	0 d
0,4 μM	0 d	2,1 b	1,2 c

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras (nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

É possível observar que concentrações mais baixas, tanto de ANA quanto de AIB, promoveram o enraizamento dos explantes (microestacas), sendo que, conforme a concentração desses reguladores de crescimento aumentou, o efeito promotor da rizogênese diminuiu. O AIA, por sua vez, promoveu uma reação contrária, aumentando a rizogênese conforme a sua concentração se elevou. Sua maior média foi estatisticamente semelhante à observada na concentração de 0,1 μM de AIB, mas menor do que a observada em resposta ao ANA a 0,1 μM , que alcançou número de 3,2 raízes por explante.

Resultados semelhantes foram obtidos em *Lippia filifolia* (Peixoto *et al.*, 2006), onde a presença de auxinas em baixa concentração no meio de cultura promoveu uma rizogênese expressiva, porém, o aumento da concentração desses RCs diminuiu o número de raízes formadas. Braga *et al.* (2012) observaram que o incremento na concentração de auxinas no meio de cultura aumentou o número de raízes por explante em *Verbena litoralis*. Por sua vez, Resende *et al.* (2014) relataram que, nas concentrações testadas de AIA, ANA e AIB, diferenças significativas na indução da rizogênese em culturas de *Bouchea fluminensis* não foram encontradas. Esses resultados indicam a inexistência de um padrão universal para a ação das auxinas na rizogênese *in vitro* de Verbenaceae, enfatizando a importância de se determinar um protocolo de micropropagação adequado para cada espécie estudada.

Tabela 6 – Altura média das brotações (cm) em explantes de *S. odorata* cultivados *in vitro* em resposta a diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB, 40 dias após o início do experimento.

	ANA	AIA	AIB
0	3,5 c	3,5 c	3,5 c
0,1 μM	4,6 b	1,2 e	5,5 b
0,2 μM	4,5 b	7,2 a	4,5 b
0,3 μM	1,5 e	2,3 d	1,3 e
0,4 μM	2,2 d	2,3 d	5,5 b

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

De forma geral, a suplementação do meio de cultivo com auxinas influenciou positivamente no alongamento das brotações, mas o aumento da concentração desses RCs causou um efeito contrário. No presente estudo, brotações mais alongadas foram observadas em resposta à concentração de 0,2 μM de AIA, com média de altura ligeiramente superior a 7,0 cm.

Tabela 7 – Presença de calos dos explantes de *S. odorata* cultivados *in vitro* em resposta a diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB, 40 dias após o início do experimento.

	ANA	AIA	AIB
0	-	-	-
0,1 μM	-	-	-
0,2 μM	-	Sim	-
0,3 μM	-	-	-
0,4 μM	Sim	Sim	Sim

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Devido ao fato de o número de raízes ser mais importante no processo de rizogênese, nós consideramos que, para um maior sucesso na etapa de enraizamento, o meio MS suplementado com 0,1 μM de ANA é o mais adequado. Essa escolha se justifica porque, nesse meio, além da produção de um maior número de raízes, também foram produzidos explantes de tamanho mais adequado, condição que contribui positivamente para a qualidade e sobrevivência das plântulas na etapa subsequente de aclimatização *ex vitro*.

3.4 Aclimatização *ex vitro*

Plântulas de *S. odorata* apresentaram aproximadamente 80% de sobrevivência ao transplântio, condição que se assemelha ao observado em cultivos

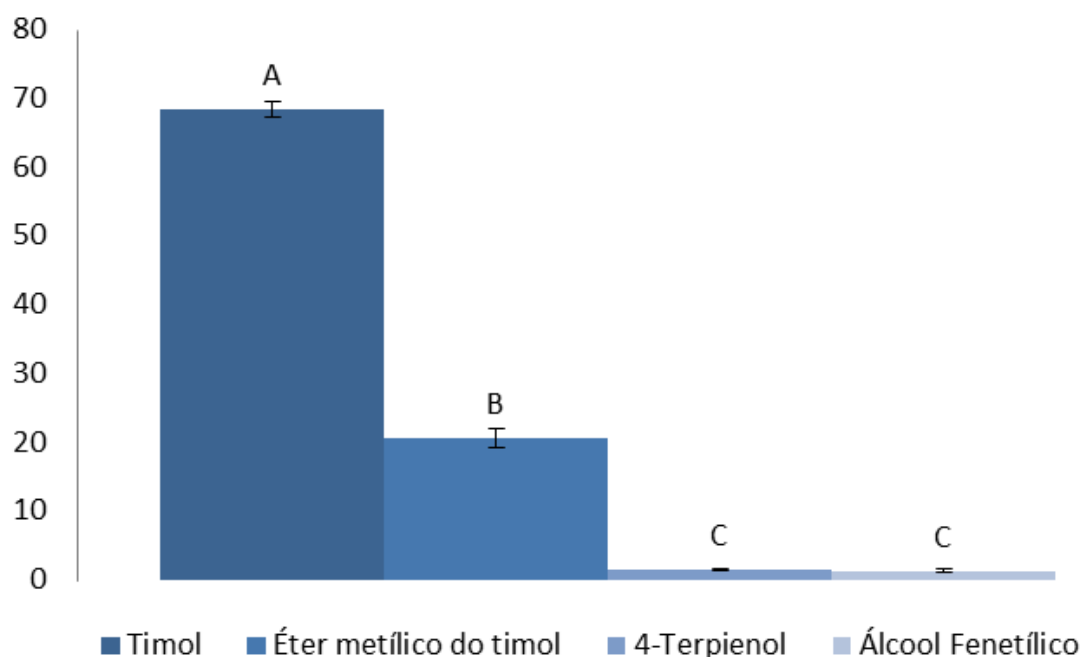
in vitro envolvendo outras espécies de Verbenaceae (Braga *et al.*, 2012; Resende *et al.*, 2014, Peixoto *et al.*, 2006).

3.5 Compostos terpênicos voláteis em *S. odorata*

Nas análises realizadas no presente estudo, quatro compostos terpênicos voláteis majoritários foram identificados (Figura 8), com destaque para o Timol (68,33%), substância cristalina e incolor encontrada em diversas espécies vegetais, e comumente presente no óleo essencial de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae). Porém, a presença de Timol não é relatada para espécies do gênero *Stachytarpheta* anteriormente descritas e analisadas quimicamente (Silva *et al.*, 2012; Bliss *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2023). O Timol é uma substância com diversas ações biológicas, com destaque para a ação antimicrobiana, afetando diretamente a membrana plasmática das bactérias testadas (Helander *et al.*, 1998). Essa ação antibiótica também parece se expressar nas plantas de *S. odorata* cultivadas *in vitro*. Algumas culturas dessa espécie exibem um início de contaminação bacteriana no meio de cultura. Porém, essa contaminação não avança para além de ~2 mm do explante, indicando uma provável ação bactericida (ou bacteriostática) de moléculas liberadas pelas culturas. Outro componente encontrado nos CTVs de *S. odorata* foi o Éter metílico do timol (20,66%), uma molécula que também apresenta ação antibiótica comprovada (Kaur *et al.*, 2013). O 4-Terpineol (1,5%) foi encontrado em níveis mais baixos. Esse terpenóide também apresenta ação bactericida/bacteriostática, com grande potencial para uso farmacológico (Su *et al.*, 2018). Por fim, o quarto constituinte encontrado foi o Álcool fenetílico (1,33%), um composto aromático amplamente utilizado pela indústria para dar aroma de rosas a cosméticos e a produtos de limpeza, que também apresenta relatos de ação antibacteriana e antifúngica (Scognamiglio *et al.*, 2012; Corre *et al.*, 1990).

Como pode ser observado na Figura 5, o Timol e o Éter metílico do timol (constituintes majoritários nos CTV nessa espécie) apresentaram diferenças significativas em suas percentagens, assim como para o 4-Terpineol e Álcool fenetílico, que, por sua vez, não diferiram entre si. Os dois principais CTVs (Timol e Éter metílico do timol) corresponderam a quase 90% do total de terpenos encontrados nas amostras de *S. odorata*. A tabela 8 apresenta a relação dos principais terpenos voláteis encontrados em outras espécies de *Stachytarpheta*.

Figura 8 - Porcentagem dos quatro compostos terpênicos voláteis majoritários encontrados em *Stachytarpheta odorata*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 8 – Compostos orgânicos majoritários da *Stachytarpheta odorata* comparados com os encontrados nas três espécies do Gênero *Stachytarpheta* com maior uso medicinal

Espécie	1º	2º	3º	4º	Referências
<i>S. odorata</i>	Timol	Éter metílico do timol	4-Terpineol	Álcool fenetílico	Presente estudo
<i>S. jamaicensis</i>	Cis-Verbenol	Limoneno	Acetato de Bornila	Eucalyptol	Bliss <i>et al.</i> (2022)
<i>S. cayennensis</i>	Oct-1-en-3-ol	2,6-di-tert-butyl-4-thyl phenol	(E)-phytol	Eugenol	Oliveira <i>et al.</i> (2023)
<i>S. gesnerioides</i>	Guaiol	α -pineno	Isocariofileno	β -pineno	Silva <i>et al.</i> (2012)

Fonte: elaborada pelo autor.

4 CONCLUSÕES

Em relação ao protocolo de micropropagação de *Stachytarpheta odorata* e da constituição de seus CTVs majoritários, os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- O método de desinfestação utilizado se mostrou eficaz para o controle da contaminação durante o estabelecimento *in vitro* dos frutos dessa espécie, não exigindo procedimentos mais elaborados.

- Para a multiplicação, o tratamento mais indicado foi o meio MS suplementado com 3 μ M de BAP, sem utilização de ANA, pois concentrações mais elevadas de BAP, assim como a presença de ANA, reduziram o número final de microestacas no procedimento de repicagem.

- Para o enraizamento, o meio MS suplementado com 0,1 μ M de ANA é o mais apropriado, induzindo a produção de um maior número de raízes com um alongamento adequado das culturas.

- Na fase de aclimatização, o restabelecimento *ex vitro* dessa espécie foi eficaz e não diferindo do observado para outras espécies de Verbenaceae.

- A propagação *in vitro* proporcionou ganhos importantes, tornando a micropropagação da espécie viável e útil para a sua conservação, assim como para a sua reintrodução em condições naturais, reduzindo o risco de sua extinção na natureza.

- Os compostos terpênicos identificados no extrato de *S. odorata* não são citados em espécies do mesmo gênero, condição que justifica a sua inclusão em estudos relacionados a efeitos farmacológicos e utilização nas indústrias química e alimentícia.

Sugere-se como passos futuros a utilização dos resultados do presente estudo como base para novas pesquisas envolvendo a análise do potencial produtivo dos compostos fitoquímicos encontrados pela indústria química e farmacêutica, assim como analisar a viabilidade de um projeto de reintrodução da espécie na sua região de origem. Adicionalmente, sugere-se a realização de estudos mais aprofundados em relação aos compostos químicos das espécies do gênero *Stachytarpheta*, a fim de elucidar a filogenia do grupo envolvendo *S. odorata*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Camilo *et al.* A cultura de tecidos na agricultura. I Jornada Científica e VI FIPA do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bambuí—CEFET-Bambuí, 2008.

ATKINS, S. Verbenaceae. In: KUBITZKI, K.; KADEREIT, J. W. (Eds.). The families and genera of vascular plants. Springer-Verlag, Germany, v. 3, p. 449-468, 2004.

ATKINS, S. The Genus *Stachytarpheta* (Verbenaceae) in Brazil. Kew Bulletin, p. 161-272, 2005.

BALARAJU, K. *et al.* Micropropagation of *Vitex agnus-castus*, (Verbenaceae)—a valuable medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 44, p. 436-441, 2008.

BLISS, O. *et al.* GC-MS Characterization, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of *Stachytarpheta jamaicensis*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, v. 66, n. 4, p. 433-443, 2022.

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, p. 139-148, 2012.

CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

CARDOSO, P. H.; MENINI NETO, L.; SALIMENA, F. R. G. Taxonomic notes on *Stachytarpheta* (Verbenaceae) from Brazil. Kew Bulletin, v. 75, p. 1-6, 2020.

CARDOSO, P. H. *et al.* An update of the Verbenaceae genera and species numbers. *Plant Ecology and Evolution*, v. 154, p. 80-86, 2021.

CARDOSO, P.H., Salimena, F.R.G., Somavilla, N. *et al.* Verbenaceae from the Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil: recognition of the new and rare *Stachytarpheta odorata* and an update of the species richness. *Tropical Plant Biology*, v. 16, p.123-134, 2023.

CORRE, J. J. *et al.* Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Research in Microbiology*, v. 141, p. 483-497, 1990.

DRUMMOND GM *et al.* Biodiversidade em Minas Gerais, um atlas para sua conservação, 2nd. Fundação Biodiversitas, 2005.

EINSERT, J. W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y. P. S. Biotechnology in agriculture and forestry 17: high-tech and micropropagation I. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 190-201.

FORTES, GR de L.; PEREIRA, Jonny Everson Scherwinski. Batata-semente pré-básica: cultura de tecidos. 2003.

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, 19

GEORGE, F. Plant propagation by tissue culture: the technology. England: Exegetics, 1993. 574 p.

GIULIETTI, Ana Maria *et al.* Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. *Boletim de Botânica da universidade de São Paulo*, p. 1-151, 1987.

GIULIETTI, Ana Maria e PIRANI, José Rubens. Patterns of geographic distribution of some plant species from the espinhaço range, Minas Gerais and Bahia. 1987, *Anais. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciencias*, 1987.

GONTIJO, Bernardo Machado. Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, v. 4, n. 1-2, p. 7-14, 2008.

FENTAHUN, Mengistu *et al.* *In vitro* protocol optimization for micropropagation of elite lemon verbena (*aloysia triphylla*). *African Journal of Plant Science*, v. 11, n. 10, p. 369-376, 2017.

HARTMANN, Hudson Thomas *et al.* Plant propagation: principles and practices. Prentice-Hall., 1975.

HELANDER, I. M. *et al.* Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 3590–3595, 1998.

KAUR, R. *et al.* Synthesis of halogenated derivatives of thymol and their antimicrobial activities. *Medicinal Chemistry Research*, v. 23, p. 2212-2217, 2014.

MARX, H. *et al.* A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. *American Journal of Botany*, v. 97, p. 1647-1663, 2010.

MASYITA, A. *et al.* Food chemistry: X, v. 13, p. 100217, 2022.

MONTENEGRO, Livya Holanda M. *et al.* Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 611-617, 2006.

MORENO, J. S. R. *et al.* *In vitro* propagation from nodal segments of *Lippia origanoides* (chemotype A). *Ciência Rural*, v. 52, 2021.

MUCIDA, D. P. *et al.* A degradação ambiental em narrativas de naturalistas do século XIX para a reserva da Biosfera da Serra do Espinhaço/Environmental

degradation in narratives of naturalists of the 19th century for the Espinhaço Range Biosphere Reserve. *Caderno de Geografia*, v. 29, p. 465-495, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, S., T. A., *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Stachytarpheta cayennensis* leaves grown in Brazil Southeast. *Journal of Essential Oil & Plant Composition*, v.1, 32-38, 2023.

ONYEDIKACHI, B. *et al.* GC-MS Characterization, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of *Stachytarpheta jamaicensis*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, v. 66, p. 433-443, 2022.

PEIXOTO, P. H. P. *et al.* *In vitro* propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. & Schauer ex Schauer. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 42, p. 558-561, 2006.

PIERIK, R. L. M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

RAJENDER, K. *et al.* Micropropagation of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl—A medicinally important plant. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 11, p 105-107, 2012.

RAJENDER, K. *et al.* *In vitro* micropropagation of *Stachytarpheta jamaicensis* L.vahl., an ethnomedicinal plant and confirmation of genetic fidelity of the plantlets using rapid markers. *International Journal of Advanced Research*, v. 5, p. 1494-1502, 2017.

RAPINI A., RIBEIRO P.L., LAMBERTt S., PIRANI JR. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, v.4, p. 15–23, 2008.

RESENDE, C. F. *et al.* An efficient system for *in vitro* propagation of *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae). *Acta Botanica Brasilica*, v. 28, p. 184-189, 2014.

RESENDE, C. F. *et al.* *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. *Revista Ciência Agronômica*, v. 46, p. 582-589, 2015.

REZENDE, J. C. *et al.* Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. *Scientia Agraria*, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.

RINGUELET, Jorge Abel; VIÑA, Sonia Zulma. Terpenoides. *Libros de Cátedra*, 2013.

Salimena, F.R.G. *et al.* 2015 *Verbenaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246>>

SALIMENA, F.R.G. *et al.* *Verbenaceae* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB76715>>. Acesso em: 21 nov. 2023.

SCOGNAMIGLIO, J. *et al.* Fragrance material review on phenylethyl alcohol. Food and Chemical Toxicology, v. 50, Suppl. 2, p. S224-S239, 2012.

SILVA, P. S. *et al.* (2012). *Stachytarpheta gesnerioides* Cham.: chemical composition of hexane fraction and essential oil, antioxidant and antimicrobial activities. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 11, p.542-548, 2012.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. FACHINELLO, J. C. *et al.* (Eds.). Propagação de plantas frutíferas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

SILVA, P. S. *et al.* *Stachytarpheta gesnerioides* Cham.: chemical composition of hexane fraction and essential oil, antioxidant and antimicrobial activities. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 11, p.542-548, 2012.

SINGULANI, J. L. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. Journal of Medicinal Plants Research, v. 6, p. 4416-4422, 2012.

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

SU, C. *et al.* Safety and efficacy of 4-terpineol against microorganisms associated with blepharitis and common ocular diseases. BMJ Open Ophthalmology, v. 3, e000094, 2018.

TOSCAN, Cristiane Menegotto. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides. 2010.

VASCONCELOS, Marcelo Ferreira de. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil?. Brazilian Journal of Botany, v. 34, p. 241-246, 2011.

WHITE, P. R. A Handbook of Plant Tissue Culture. Pennsylvania: Jacques Cottell, 1963.

YANG, W. *et al.* Advances in pharmacological activities of terpenoids. Natural Product Communications, v. 15, n. 3, 2020.