



Universidade do Estado do Rio De Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Cecília Azevedo de Souza

Culturas de raízes e análise fitoquímica de
Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.

Rio de Janeiro
2018

Cecília Azevedo de Souza

**Culturas de raízes e análise fitoquímica de
Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.**



Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Norma Albarello

Coorientadora: Prof.^a Dra. Claudia Simões-Gurgel

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S729 Souza, Cecília Azevedo de.
Culturas de raízes e análise fitoquímica de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers./ Cecília Azevedo de Souza - 2018.
88f.; il.

Orientadora: Norma Albarello.
Coorientadora: Claudia Simões-Gurgel
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

1. Crassulacea - Teses. 2. Fisiologia vegetal - Teses. 3. Plantas medicinais - Teses. 4. Matéria médica vegetal - Propagação in vitro - Teses. I. Albarello, Norma. II. Simões-Gurgel, Claudia. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 582.715

Patricia Bello Meijinhos **CRB7/5217**- Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Cecília Azevedo de Souza

Culturas de raízes e análise fitoquímica de

***Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de julho de 2018.

Orientadoras:

Prof.^a Dra. Norma Albarello

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Claudia Simões-Gurgel

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Lívia da Silva Cordeiro

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Norma Albarello, que há oito anos me ensina, inspira e me torna uma profissional melhor, pelas inúmeras oportunidades e por me manter seguindo no caminho da Biologia Vegetal;

À minha coorientadora Claudia Simões Gurgel, por tamanha dedicação ao trabalho, pela paciência, carinho e atenção, pelas inúmeras conversas, revisões e ideias;

À minha querida amiga Tatiana Carvalho de Castro, pelo apoio e carinho durante toda a realização desse trabalho;

À farmacêutica Nilda Calado, por me ajudar em todas as análises fitoquímicas e se empolgar tanto quanto eu a cada resultado interessante que conseguimos;

À melhor equipe de trabalho que alguém poderia ter, a família Labplan, pela ajuda, apoio e amizade: Adriana Lanzotti, Anna Flávia Vilardo, Danusia Santos, Débora Lage, Eduardo Nunes, Gustavo Dias, Lívia Cordeiro, Siomara Lemos, Thaís Athayde, Luciano Marques e Victor Pelliccione;

Ao aluno de graduação e ex-estagiário Lucas Lima, por ter me dado a oportunidade de ensinar-lhe um pouco sobre Biotecnologia Vegetal e pela imensa ajuda neste trabalho;

Ao biólogo Thiago Barboza, por ter aberto as portas para os estudos com a espécie *Kalanchoe pinnata* e me ensinado tudo que foi possível para que este trabalho acontecesse;

Aos amigos Aline Saavedra e Matheus Tirado pela pipoca, doce de leite, amizade, conversas, companhia, ajuda e brincadeiras, não poderia ser mais grata por essa parceria, sem vocês meus dias seriam muito sem graça;

Aos meus pais, família e amigos, por sempre terem me motivado a continuar e buscar um futuro melhor;

À Joanna por ser tão especial na minha vida, pelo apoio, compreensão, carinho e companheirismo;

À Atlética de Biologia, por todas as alegrias e estresses, pela oportunidade de conhecer tantas pessoas incríveis e me fazer descobrir um caminho paralelo à Biologia, o de Bacharel em Administração;

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade de realização deste trabalho.

A ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância
sem medo de admitir que não sabemos.

Não há nenhuma vergonha nisso.

A única vergonha é fingir que temos todas as respostas.

Neil de Grasse Tyson

RESUMO

SOUZA, C. A. **Culturas de raízes e análise fitoquímica de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.** 2018. 88f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Kalanchoe pinnata, popularmente conhecida como saião roxo, é amplamente distribuída em regiões tropicais devido à sua importância medicinal e ornamental. Possui expressiva capacidade de propagação vegetativa, sendo considerada uma espécie invasora em diversos locais, havendo necessidade de erradicação de ambientes naturais. As substâncias bioativas detectadas na espécie, principalmente flavonoides, possuem grande importância na medicina tradicional e diversos trabalhos comprovam sua ação medicinal, demandando mais estudos que visem à sua utilização, além de uma propagação controlada. Como alternativa, a cultura de tecidos vegetais possui técnicas que permitem a produção *in vitro* de material botânico, incluindo os que possuem propagação não controlada, minimizando os impactos da multiplicação da espécie no meio ambiente e possibilitando a sua exploração racional. Dentre essas técnicas destaca-se, para a produção *in vitro* de metabólitos de interesse, a cultura de raízes. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivos: (1) Determinar as melhores condições *in vitro* para a manutenção de plantas matrizes como fontes de explantes para indução de raízes; (2) Avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com a auxina AIB, assim como da presença e ausência de luz, sobre a multiplicação *in vitro* das raízes; (3) Analisar o efeito da adição do eliciador metil jasmonato (MeJa) na produção de metabólitos secundários pelas culturas de raízes; (4) Caracterizar preliminarmente o perfil fitoquímico de extratos obtidos das culturas de raízes e do seu meio de cultivo, comparando ao material cultivado *in vivo*, por cromatografia em camada delgada (CCD) e (5) Determinar o método de maior eficiência para produção de culturas de raízes em relação à produtividade e aos gastos com insumos. Para isso, foram avaliados: (1) três protocolos de descontaminação de folhas (Hipoclorito; Hipoclorito + Tween 80; Etanol + Hipoclorito) para o estabelecimento *in vitro* das culturas; (2) três sistemas de cultivo (meio sólido, líquido e sobre ponte de papel) e dois meios de cultura (MS0 e MS + 1 mg.L⁻¹ ANA), para propagação das plantas e produção de raízes; (3) as condições de cultivo para culturas de raízes (tamanho do frasco, condição luminosa, concentração de AIB, eliciação com MeJa, e (4) o método de secagem do material (estufa e liofilizador), para aferição de PS e preparo de extratos. Em relação à análise fitoquímica foram realizadas cromatografias em camada delgada comparando o material cultivado *in vivo* e *in vitro*, com ou sem eliciação. Os resultados mostraram que 15 minutos de Hipoclorito 2% foram eficientes para a descontaminação do material *in vivo*, garantindo as melhores taxas de regeneração. O sistema de ponte de papel sobre meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA foi a condição que acarretou a produção de plantas com maior capacidade de propagação, além de produzir raízes que, quando em cultura, apresentaram os maiores acúmulos de biomassa. O tamanho do Erlenmeyer não se mostrou um fator limitante para culturas de 30 dias, enquanto a manutenção das culturas no escuro levou ao maior acúmulo de biomassa de raiz em todos os tratamentos avaliados. A melhor concentração de AIB variou de acordo com o sistema de origem dos explantes. Para o sistema de ponte de papel sobre meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA, a melhor concentração do fitorregulador foi a de 5 mg.L⁻¹ de AIB. O método de secagem do material também não alterou o peso seco do material, mas optou-se pelo uso de liofilizador por permitir a posterior utilização do material para preparo de extratos. A eliciação não interferiu no acúmulo de biomassa das raízes, porém alterou o padrão de produção de metabólitos secundários. A CCD evidenciou a presença de substâncias das classes dos terpenos, flavonoides

e saponinas, tanto em extratos de material *in vivo* quanto *in vitro*, produzindo diferentes padrões de manchas, de acordo com os tratamentos avaliados. O estudo de diferentes etapas do cultivo *in vitro* de *K. pinnata* permitiu a determinação de condições que tornaram os métodos propostos mais eficientes para produção de raízes com vistas à síntese de substâncias de interesse medicinal.

Palavras-chave: Crassulaceae. Sistemas de cultivo *in vitro*. Cromatografia. Eliciação. Raízes adventícias.

ABSTRACT

SOUZA, C. A. **Root culture and phytochemical analysis of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.** 2018. 88f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Kalanchoe pinnata, popularly known as “saião roxo”, is widely spread in tropical regions of the world due to its medicinal and ornamental importance. It possesses an expressive capacity of vegetative propagation, being considered an Invasive Species in several places around the world, what highlights the need of eradicating it from natural environments. The bioactive compound already identified for the species, mainly flavonoids, presents major importance on traditional medicine and several studies corroborate its medicinal value, demanding more studies about its utilization, as well as its controlled use. As an alternative, plant tissue culture refers to techniques which allow *in vitro* production of botanic material, including the ones with uncontrolled propagation, minimizing the impacts of the species multiplication on the environment and enabling its rational exploitation. Of all techniques used to produce *in vitro* metabolites, root cultures are very promising. Therefore, the present work aimed to: (1) Determine the best *in vitro* conditions in order to maintain root explant donor plants; (2) Evaluate the effect of the medium supplementation with IBA, as well as of the presence or absence of light on the growth of adventitious root cultures; (3) Analyze the effect of the addition of Methyl Jasmonate (MeJa) on the production of secondary metabolites by root cultures; (4) Characterize a phytochemical profile by thin layer chromatography (TLC) of adventitious root cultures and their mediums, comparing it with the extracts of *in vivo* growth plants and (5) Determine the most efficient method of root culture production according to productivity and inputs. In order to do that, were evaluated: (1) three leaves decontamination protocols (Hypochlorite; Hypochlorite + Tween 80; Ethanol + Hypochlorite) for the establishment of *in vitro* cultures; (2) three culture systems (solid, liquid and over paper bridge mediums) and two culture mediums (MS0 e MS + 1 mg.L⁻¹ NAA) for the plant propagation and root production; (3) root culture conditions (Flask size, light condition, IBA concentration, MeJa elicitation), and (4) the roots drying method (laboratory oven or lyophilizer), for DW measurement and extract preparation. Phytochemicals analysis were performed with TLC technique, comparing *in vivo* and *in vitro* material, with or without elicitation. Results indicate that hypochlorite 2% for 15 minutes is enough for the *in vivo* decontamination, promoting better rates of regeneration. The paper bridge system over MS + 1 mg.L⁻¹ NAA medium led to the production of plants with leaves with higher propagation capacity, and roots that, once put on liquid medium, presented higher rates of biomass accumulation. Erlenmeyer size was not considered a limiting factor over the roots growth for a period of 30 days; on the other hand, the absence of light during the same period has shown to be significant to increase biomass accumulation in all treatments evaluated. The best IBA concentration varied according to the system roots originated from. For the paper bridge over MS + 1 mg.L⁻¹ NAA medium system, roots grew better when put on a 5 mg.L⁻¹ AIB concentration. The drying method did not affect the dry weight, so lyophilization was chosen, once it allowed the posterior use of the material for extract preparation. Elicitation did not interfere on the biomass accumulation, but it altered the secondary metabolites production. TLC evidenced the presence of terpenoids, flavonoids and saponines on *in vivo* and *in vitro* extracts. The study of different phases of *K. pinnata* adventitious root culture allowed determining conditions to enhance production and make the method more efficient.

Key words: Crassulaceae. *In vitro* culture system. Chromatography. Elicitation. Adventitious root.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Classificação taxonômica da família Crassulaceae proposta por Berger (1930) e posteriormente reorganizada por Ham & t'Hart (1998).....	19
Figura 2 -	Desenvolvimento a partir de meristema marginal foliar de <i>Kalanchoe pinnata</i> cultivada <i>in vivo</i>	20
Figura 3 -	Exemplar de <i>Kalanchoe pinnata</i> cultivado <i>in vivo</i>	22
Figura 4 -	Mapa de ocorrência da espécie <i>Kalanchoe pinnata</i>	22
Figura 5 -	Estrutura química de algumas substâncias da classe dos alcaloides com atividade biológica e que são utilizadas na indústria farmacêutica.....	25
Figura 6 -	Unidade de fenol, estrutura química presente em substâncias fenólicas.....	26
Figura 7 -	Estrutura química de alguns flavonoides presentes na espécie <i>K. pinnata</i>	26
Figura 8 -	Estrutura química da unidade básica dos terpenos e exemplos de substâncias deste grupo.....	27
Figura 9 -	Rotas de desenvolvimento <i>in vitro</i> empregando técnicas de culturas de tecidos vegetais.....	30
Figura 10 -	Etapas da descontaminação para inoculação <i>in vitro</i> de <i>K. pinnata</i>	38
Figura 11 -	Esquema do desenho experimental.....	40
Figura 12 -	Corrida de cromatografia em camada delgada (CCD) de extratos de material cultivado <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>Kalanchoe pinnata</i>	45
Figura 13 -	Plantas de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas em diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	49
Figura 14 -	Desenvolvimento de raízes em plantas de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas em diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	50
Figura 15 -	Biomassa de raízes de plantas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas em diferentes sistemas.....	51
Figura 16 -	Biomassa de culturas de raízes de <i>K. pinnata</i> mantidas em meio MS suplementado com 5 mg.L ⁻¹ de AIB, após 30 dias em cultivo no escuro.....	52
Figura 17 -	Relação entre Peso Seco e Peso Fresco de culturas de raízes após secagem em estufa e liofilizador.....	53

Figura 18 -	Biomassa de culturas de raízes de <i>Kalanchoe pinnata</i> mantidas em meio MS suplementado com AIB (1 e 5 mg.L ⁻¹), após 30 dias de cultivo na presença ou ausência de luz.....	54
Figura 19 -	Análise comparativa das culturas de raízes com maior acúmulo de biomassa, provenientes de plantas de <i>Kalanchoe pinnata</i> mantidas em diferentes sistemas <i>in vitro</i> , após 30 dias de cultivo no escuro em meio MS contendo AIB.....	55
Figura 20 -	Culturas de raízes de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas em meio sólido MS0, após 30 dias de cultivo.....	56
Figura 21 -	Culturas de raízes de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas em meio MS0 líquido, após 30 dias de cultivo.....	57
Figura 22 -	Culturas de raízes de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas sobre ponte de papel de filtro em meio MS0, após 30 dias de cultivo.....	58
Figura 23 -	Culturas de raízes de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas em meio sólido MS + 1 mg.L ⁻¹ ANA, após 30 dias de cultivo.....	59
Figura 24 -	Culturas de raízes de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas sobre ponte de papel de filtro em meio MS + 1 mg.L ⁻¹ ANA, após 30 dias de cultivo.....	60
Figura 25 -	Capacidade de multiplicação de culturas de raízes de <i>K. pinnata</i> ao longo de subculturas.....	61
Figura 26 -	Biomassa de culturas de raízes de <i>Kalanchoe pinnata</i> mantidas em meio MS + 5 mg.L ⁻¹ de AIB, eliciadas com 100µM de MeJa por diferentes tempos, após 30 dias de cultivo no escuro.....	62
Figura 27 -	Culturas de raízes de <i>Kalanchoe pinnata</i> estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas em ponte de papel sobre meio MS + 1 mg.L ⁻¹ ANA e eliciadas com 100µM de MeJa, após 30 dias de cultivo em meio MS + 5 mg.L ⁻¹ de AIB no escuro.....	62

Figura 28 - Cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciando a presença de terpenos nos extratos etanólicos de <i>Kalanchoe pinnata</i> cultivada <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em meio de cultura MS.....	64
Figura 29 - Cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciando a presença de saponinas nos extratos etanólicos de <i>Kalanchoe pinnata</i>	65
Figura 30 - Cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciando a presença de flavonoides nos extratos etanólicos de <i>Kalanchoe pinnata</i>	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Taxonomia de <i>Kalanchoe pinnata</i> e suas sinonímias.....	21
Quadro 2 -	Sistemas de fases móveis e reveladores empregados nas cromatografias em camada delgada (CCD) de <i>K. pinnata</i>	44
Tabela 1 -	Avaliação dos diferentes tratamentos de descontaminação de explantes foliares de <i>Kalanchoe pinnata</i> após 30 dias de cultivo em diferentes condições de cultivo.....	47
Tabela 2 -	Rendimento dos extratos etanólicos de material cultivado <i>in vivo</i> e produzido <i>in vitro</i> de <i>Kalanchoe pinnata</i>	63
Tabela 3 -	Avaliação da eficiência de diferentes sistemas de cultura para obtenção de 1g (PS) de cultura de raízes.....	67
Tabela 4 -	Capacidade produtiva disponível (CPD) de raízes e estimativa da CPD de extrato bruto e flavonoides isolados de <i>K. pinnata</i> por dia de trabalho (8h/dia) para cada sistema de produção empregado.....	68
Tabela 5 -	Produtividade dos diferentes sistemas de cultura.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB	Ácido indolilbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
CAM	<i>Crassulacean Acid Metabolism</i> (Metabolismo Ácido das Crassuláceas)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cultura de células em suspensão
CG	Cromatografia gasosa
CPD	Capacidade produtiva disponível
CTV	Cultura de tecidos vegetais
I	<i>Input</i> (Insumo)
MeJa	Metil Jasmonato
MS	Meio de cultura de Murashige e Skoog, 1962
MS0	Meio de cultura de Murashige e Skoog isento de reguladores de crescimento
NP/PEG	Revelador para cromatografia em camada delgada - solução de difenilboriloxietilamina adicionada à solução de polietilenoglicol 4000
O	<i>Output</i> (Produto)
P	Produtividade
PF	Peso de matéria fresca
Prod. máx.	Produção máxima
PS	Peso de matéria seca
rpm	Rotação por minuto
UV	Ultravioleta
$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Unidade de intensidade luminosa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	17
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1	Família Crassulaceae J. St.-Hil e gênero <i>Kalanchoe</i> Adans.....	18
1.2	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.....	21
1.3	Metabólitos secundários.....	24
1.4	Cultura de tecidos vegetais.....	28
1.4.1	<u>Culturas de raízes.....</u>	30
1.4.2	<u>Eliciação.....</u>	31
1.5	Capacidade produtiva, produtividade e eficiência de produção em CTV....	33
1.6	Justificativa.....	35
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Geral.....	36
2.2	Específicos.....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	Material botânico.....	37
3.2	Estabelecimento de plantas <i>in vitro</i>.....	37
3.3	Determinação de condições para manutenção de plantas matrizes <i>in vitro</i>.....	38
3.4	Estabelecimento de culturas de raízes adventícias.....	41
3.5	Eliciação das culturas de raízes.....	42
3.6	Análise estatística.....	42
3.7	Análises fitoquímicas.....	42
3.7.1	<u>Preparo dos extratos.....</u>	42
3.7.2	<u>Análises por cromatografia em camada delgada (CCD).....</u>	43
3.8	Avaliação da eficiência, capacidade produtiva e produtividade dos sistemas de produção de cultura de raízes.....	45
4	RESULTADOS.....	47
4.1	Estabelecimento de plantas <i>in vitro</i>.....	47
4.2	Determinação de condições para manutenção de plantas matrizes <i>in vitro</i>.....	48
4.3	Estabelecimento de culturas de raízes adventícias.....	51

4.4	Eliciação das culturas de raízes.....	61
4.5	Análises fitoquímicas.....	63
4.5.1	<u>Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)</u>	63
4.6	Avaliação da eficiência, capacidade produtiva e produtividade dos sistemas de produção de cultura de raízes.....	67
5	DISCUSSÃO.....	69
	CONCLUSÕES.....	78
	PERSPECTIVAS.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

INTRODUÇÃO

Kalanchoe pinnata, popularmente conhecida como saião roxo, é uma espécie da família Crassulaceae. Nativa de Madagascar e introduzida em diversas regiões do globo, principalmente nos trópicos, é amplamente utilizada na medicina popular, porém é uma espécie considerada invasora em diferentes localidades. Vários estudos com *K. pinnata* têm comprovado o seu potencial medicinal e o relacionam, principalmente, com a presença de flavonoides em suas folhas. Com base no seu potencial medicinal, e, também, considerando a necessidade de controle da espécie em ambientes naturais, o cultivo *in vitro* se torna a melhor alternativa para obtenção de metabólitos de interesse. Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan) da UERJ indicaram o potencial de produção de metabólitos secundários de interesse medicinal por culturas estabelecidas *in vitro* com a espécie. Desta forma, o presente estudo buscou otimizar a indução de culturas de raízes e avaliar a produção de metabólitos secundários, além de propor indicadores para determinar a eficiência de processo produtivo.

1 REVISÃO DA LITERATURA

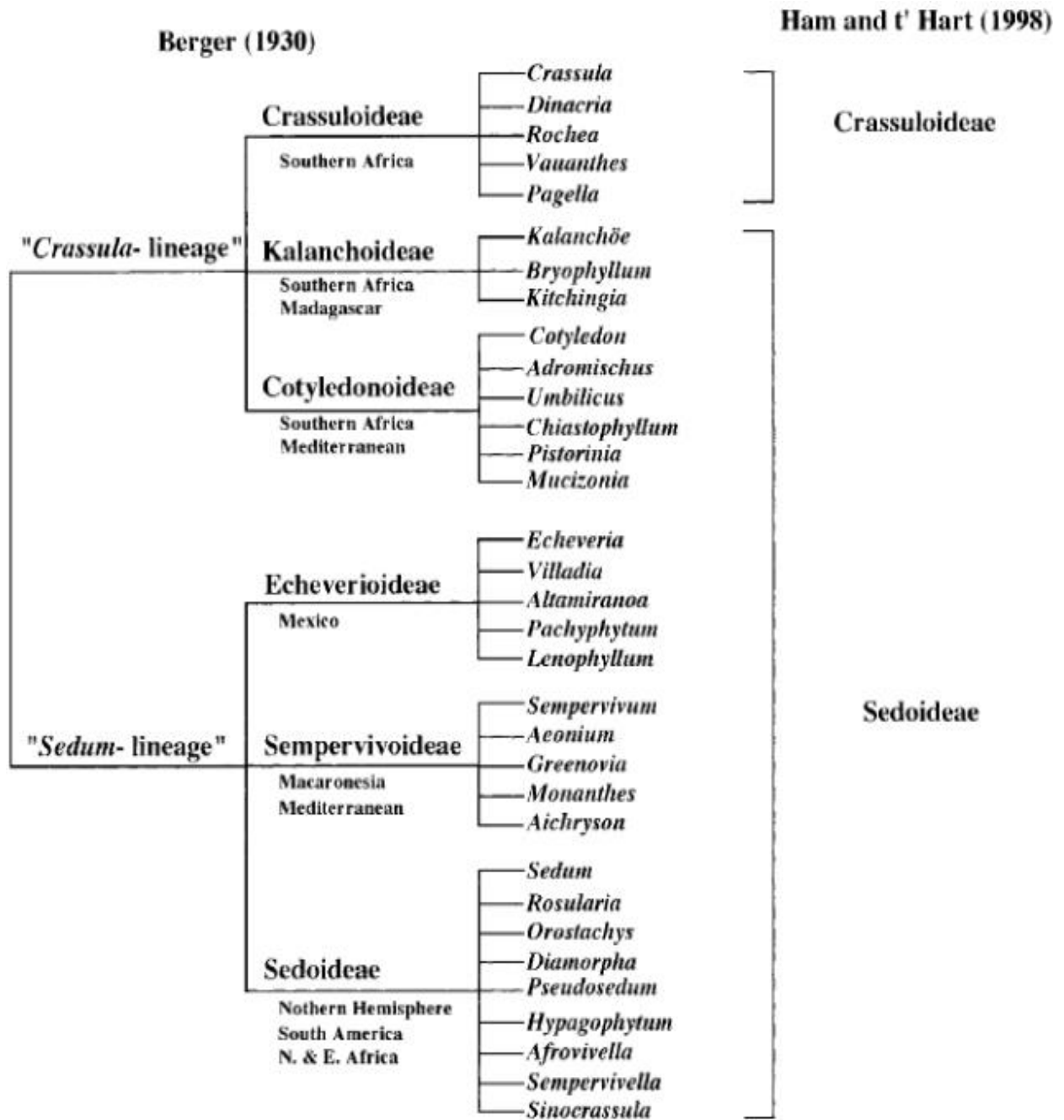
1.1 Família Crassulaceae J. St.-Hil e gênero *Kalanchoe* Adans.

A família Crassulaceae J. St.-Hil é composta por 35 gêneros e 1500 espécies, que habitam principalmente regiões áridas e secas (BERGER, 1930 apud MORT et al., 2001). Considerada cosmopolita, com centros de diversidade no México, sul da África, Macronésica e Himalaia, a família apresenta grande diversidade morfológica, citológica e de habitats, o que a torna complexa e difícil de ser classificada filogeneticamente. Há um consenso de que Crassulaceae é um grupo monofilético, porém a classificação das subfamílias apresenta divergência entre os autores. O estudo mais amplo foi realizado por Berger (1930), que utilizou como principal parâmetro a morfologia floral, propondo a divisão de Crassulaceae em seis subfamílias: Crassuloideae, Kalanchoideae, Cotyledonoideae, Echeverioideae, Sempervivoideae e Sedoideae. Posteriormente, Ham e 't Hart (1998) propuseram uma classificação baseada na análise filogenética de cpDNA (DNA de cloroplasto), dividindo a família em apenas duas subfamílias: Crassuloideae e Sedoideae (MORT et al., 2001) (Figura 1).

O gênero *Kalanchoe* Adans., que inclui os sinônimos botânicos *Bryophyllum* e *Cotyledon*, engloba centenas de espécies nativas de áreas tropicais, amplamente utilizadas na medicina popular e na ornamentação (MILAD et al., 2014), como, por exemplo, *K. pinnata* Lam., *K. brasiliensis* Larranaga, *K. diagremoniana* R. Hamet e *K. blossfeldiana* Poelln.

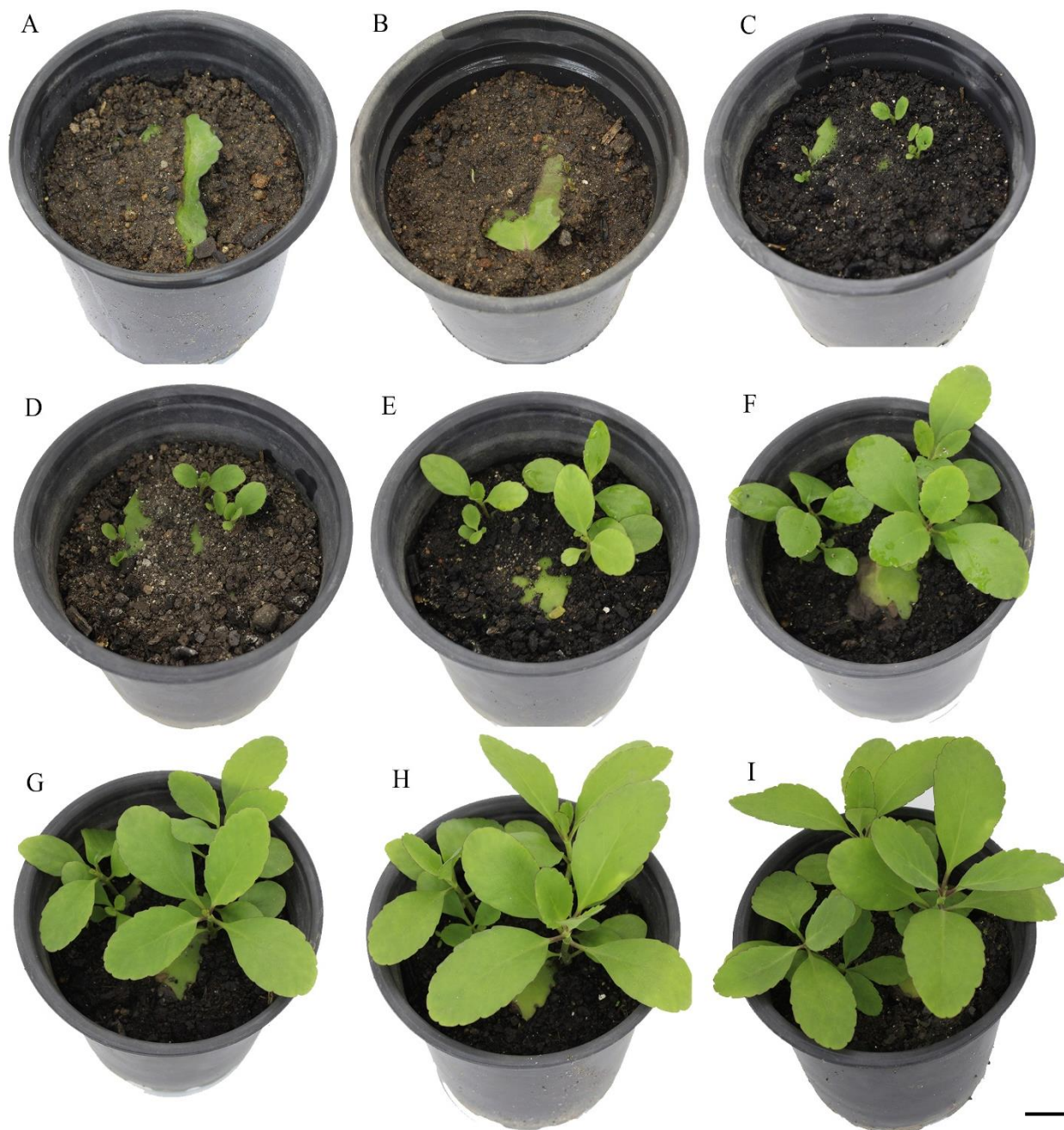
As espécies deste gênero apresentam uma grande capacidade de reprodução vegetativa, uma vez que pequenas regiões meristemáticas capazes de regenerar uma planta inteira podem ser encontradas em diversas partes do vegetal, como na base e margens das folhas, base dos pecíolos e nas inflorescências (ALLORGE-BOITEAU, 1996). O processo de propagação normalmente ocorre quando a folha se desprende da planta matriz, demorando de nove a doze dias para o aparecimento de raiz e do ápice caulinar do novo indivíduo (INVASIVE SPECIES COMPENDIUM, 2017) (Figura 2).

Figura 1: Classificação taxonômica da família Crassulaceae proposta por Berger (1930) e posteriormente reorganizada por Ham & t'Hart (1998).



Fonte: Mort et al., 2011.

Figura 2: Desenvolvimento a partir de meristema marginal foliar de *Kalanchoe pinnata* cultivada *in vivo*.



Legenda: Planta após 0 dia (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E), 5 (F), 6 (G), 7 (H) e 8 (I) semanas da propagação vegetativa. Barra = 4 cm.

1.2 *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

A espécie *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon, popularmente conhecida como saião, saião roxo ou folha-da-fortuna, possui diversas sinonímias (Quadro 1). É uma planta suculenta, de porte herbáceo, com cerca de 50 a 100 cm de altura, exibindo caule de coloração marrom e folhas elípticas verdes, com filotaxia oposta e bordo foliar crenado, podendo apresentar coloração avermelhada (Figura 3A). Possui reentrâncias no bordo foliar que são bem características e onde encontram-se gemas foliares, responsáveis pelo processo de propagação vegetativa. A espécie possui inflorescência do tipo paniculada, com flores pendentes em forma de sinos, de coloração amarelada e corola avermelhada (Figura 3B). Floresce entre os meses de novembro e março, com formação de frutos em abril (WHO, 2009). *K. pinnata* utiliza exclusivamente o metabolismo CAM (metabolismo ácido das crassuláceas) para fixação do CO₂ na fotossíntese, sendo possivelmente uma adaptação fisiológica a ambientes com baixa disponibilidade hídrica (PIKART; MIOTO, 2016). De acordo com Ranson e Thomas (1960), a espécie foi utilizada como modelo de estudos de fisiologia das crassuláceas, levando à descrição do metabolismo CAM.

Quadro 1: Taxonomia de *Kalanchoe pinnata* e suas sinonímias.

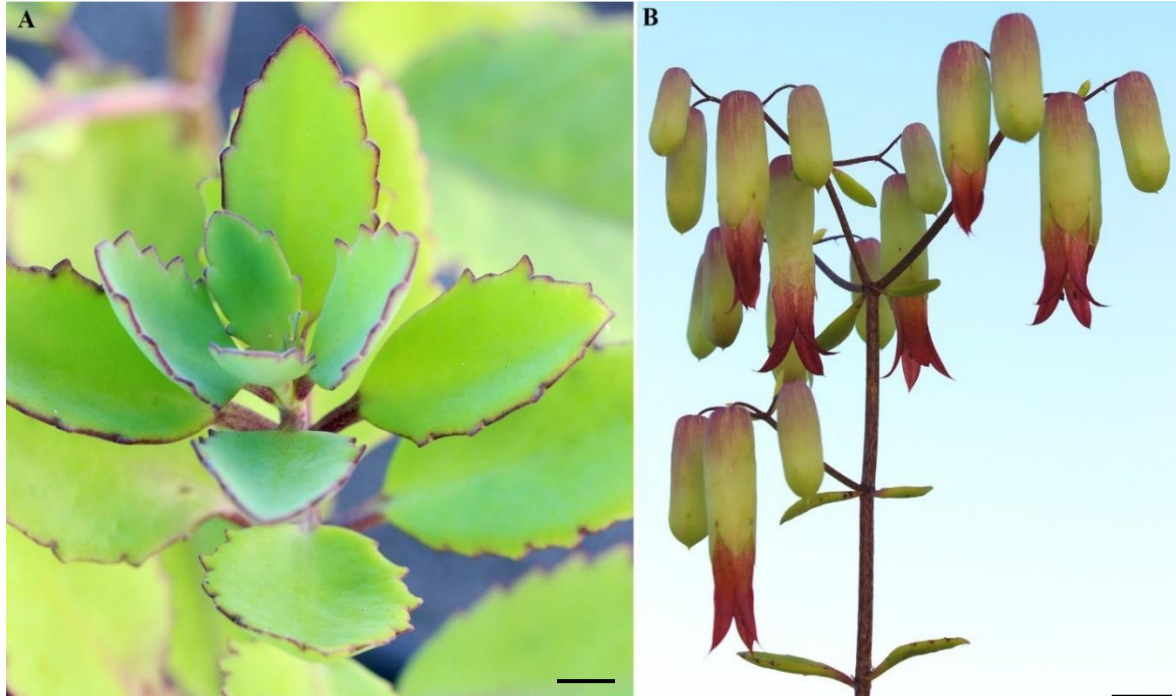
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermeae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotiledoneae)
Ordem	Saxifragales
Família	Crassulaceae
Gênero	<i>Kalanchoe</i>
Espécie	<i>Kalanchoe pinnata</i>
Sinonímias	<i>Bryophyllum calycinum</i> , <i>B. germinans</i> , <i>B. pinnatum</i> , <i>Cotyledon calycina</i> , <i>C. calyculata</i> , <i>C. pinnata</i> , <i>C. rhizophilla</i> , <i>Crassuvia floripendia</i> , <i>Crassula pinnata</i> , <i>Sedum madagascariense</i> , <i>Verea pinnata</i>

Fonte: MAJAZ et al., 2011; INVASIVE SPECIES COMPENDIUM, 2017.

Kalanchoe pinnata é nativa de Madagascar (África), porém já é considerada naturalizada em diversos locais ao redor do mundo, em países da África, Ásia, Oceania e nas Américas (U.S. NATIONAL PLANT GERMPLASM SYSTEM, 2017) (Figura 4). Devido à sua enorme capacidade de se instalar em novos ambientes e dominar o local, é considerada

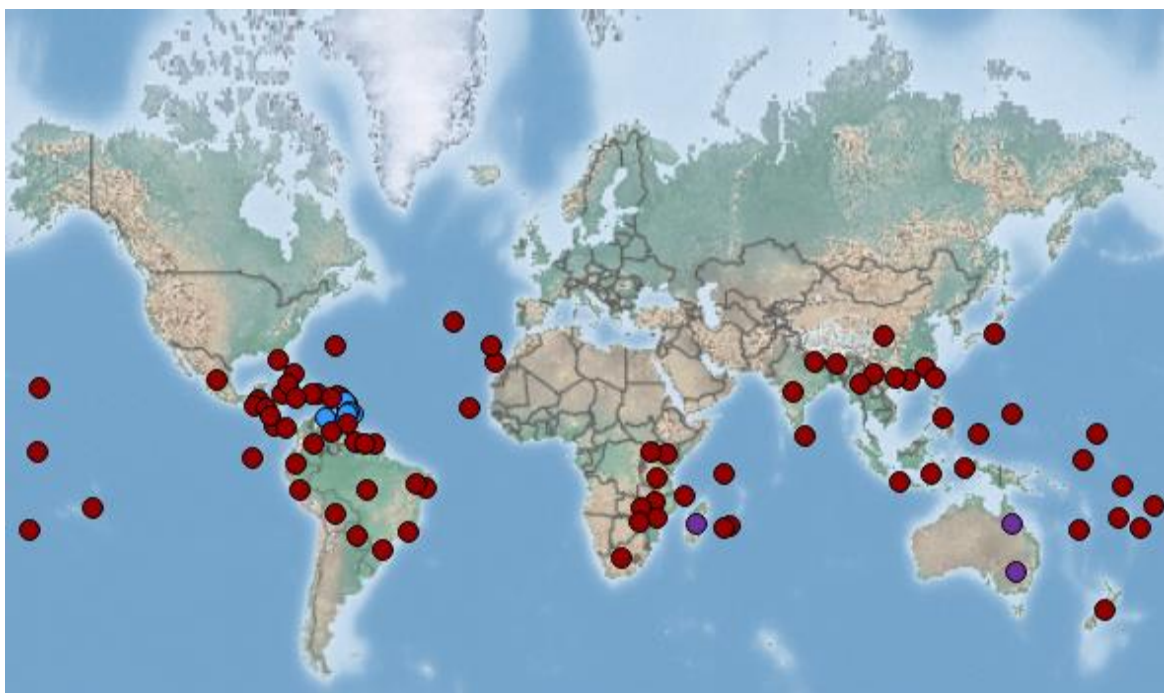
uma espécie invasora e em vários países é relatada a necessidade de seu controle nos espaços naturais (MEYER, 2000; BATIANOFF; BUTLER, 2002; PIER, 2004).

Figura 3: Exemplar de *Kalanchoe pinnata* cultivado *in vivo*.



Legenda: (A) Folhas revelando o detalhe do bordo foliar e (B) disposição da inflorescência. Barra = 1 cm.

Figura 4: Mapa de ocorrência da espécie *Kalanchoe pinnata*.



Legenda: Vermelho = presente no local; Azul = distribuição generalizada no local; Roxo = distribuição localizada.

Fonte: INVASIVE SPECIES COMPENDIUM (2017).

O potencial medicinal da espécie é, possivelmente, o responsável pela sua ampla distribuição pelo globo, tendo em vista a sua utilização durante as grandes navegações, na colonização de Madagascar e, posteriormente nas ilhas do Oceano Índico, na América Central e do Sul, o que pode ter relação com o tráfico de escravos vindos da África (INVASIVE SPECIES COMPENDIUM, 2017).

Na medicina popular africana, *K. pinnata* é utilizada na forma de extratos e sucos no tratamento de diversas enfermidades, como feridas, úlceras, abscessos, picadas de insetos, queimaduras, inflamações, erisipela, resfriado, conjuntivite e dor de ouvido, além de funcionar como diurético (MORTON, 1990; OKWU; NNAMDI, 2011). Além disso, é indicada no tratamento de diarreia, reumatismo, fungos cutâneos, febre, verminoses, bronquite crônica e aguda, pneumonia, asma e outras doenças respiratórias (BISWAS et al., 2011).

No Brasil, a espécie é popularmente utilizada no tratamento de furúnculos (FENNER et al., 2006), processos inflamatórios, gripe (LEITE; MARINHO, 2014), infecção (LIMA; SANTOS, 2006), tosse (OLIVEIRA, 2012), gastrite (BARROS, 2015; SILVA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016), inflamação no útero (SILVA et al., 2015) e úlcera crônica (BARROS, 2015). Devido ao seu importante valor na medicina popular, *K. pinnata* está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus) lançada em 2009 (FERNANDES et al., 2016), que indica a necessidade de mais estudos em relação às características e propriedades medicinais da espécie, definindo-a em relação a cultivo e indicações de uso (RENISUS, 2009).

Em uma revisão sobre a espécie, Majaz e colaboradores (2011) apresentam estudos *in vitro* que apontam relevantes propriedades medicinais, como os potenciais antinociceptivo, anti-inflamatório, anti-diabético (OJEWOLE, 2005), diurético (PATIL et al., 2008), hepatoprotetor (YADAV; DIXIT, 2003), anticonvulsivante (SALAHDEEN; YEMITAN, 2006) e leishmanicida (DA SILVA et al., 1995). Extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos de raízes de *K. pinnata* demonstraram significativa ação anti-helmíntica, enquanto extratos metanólicos apresentaram também atividade antibacteriana. As folhas mostraram atividades imunossupressora, cicatrizante, hepatoprotetora, anti-inflamatória, hipoglicêmica, nefroprotetora, antioxidante, analgésica e anticonvulsivante. Extratos aquosos de folha foram eficientes no tratamento de leishmaniose cutânea, havendo indicações de que a quercetina, metabólito da classe dos flavonoides presente nas folhas da espécie, seja a responsável por esta ação medicinal. À quercetina também foi atribuída a capacidade de reduzir em 75% a ocorrência de choques anafiláticos em respostas alérgicas extremas (BISWAS et al., 2011). Estudos com a espécie sob condições *in vivo* e *in vitro* descrevem a relação de seu potencial

medicinal às altas concentrações de flavonoides presentes em suas folhas (MAJAZ et al., 2011; PATTERWAR, 2012; NASCIMENTO et al., 2015). Extratos de material cultivado *in vivo* e o flavonoide rutina apresentaram atividade antibacteriana, enquanto a quercetina se mostrou eficiente como substância antibiofilme (BARBOZA, 2017).

1.3 Metabólitos secundários

Enquanto o metabolismo vegetal primário – ou básico – envolve reações químicas vitais, como a glicólise e o ciclo de Calvin, o metabolismo secundário – ou especial – inclui vias específicas que permitem uma interação diferenciada da planta com o ambiente (CARVALHO, 2005).

Segundo a definição proposta por Strassburger e colaboradores (1994), os metabólitos primários são substâncias fisiologicamente eficazes, enquanto os metabólitos secundários são ecologicamente eficazes (GARCIA, 2004). Estas substâncias são responsáveis pela interação da planta com o ambiente, como forma de defesa ou sobrevivência (FILOVÁ, 2014), podendo atuar, por exemplo, como agentes alelopáticos na competição entre espécies vegetais, na defesa contra fungos, bactérias e vírus, em relações de mutualismo na atração de polinizadores e dispersores de sementes, defesa contra herbivoria, causando toxicidade ou sabor impalatável e proteção contra radiação UV e dessecação (GARCIA, 2004).

Metabólitos secundários apresentam uma distribuição restrita no Reino Vegetal, frequentemente sendo limitados a um grupo taxonômico, e por isso, muitas vezes, sendo considerados como marcadores taxonômicos para famílias ou gêneros (GANHI, 2015). Estas substâncias são encontradas em diferentes concentrações em cada espécie, e podem variar em níveis: diários, sazonais, intraplanta, intra e interespecíficos. Desta forma, mesmo existindo um controle genético, a produção de alguns metabólitos pode ser alterada por fatores bioquímicos, fisiológicos, evolutivos e ecológicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

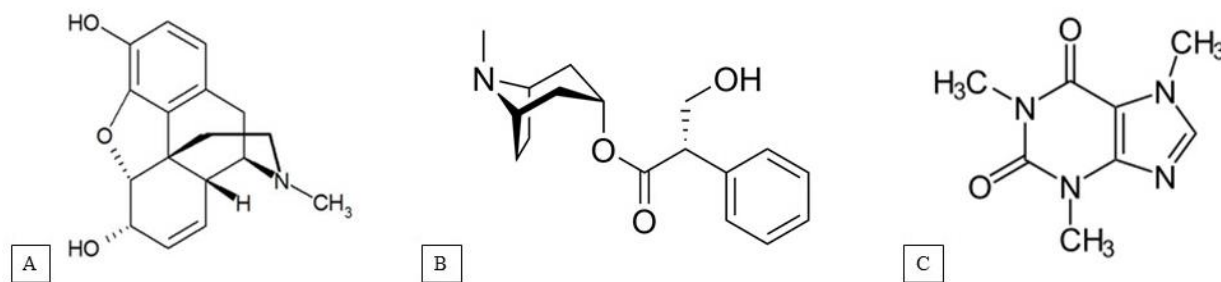
As rotas para produção dos metabólitos secundários são governadas por genes e influenciadas por fatores hereditários, ontogênicos e ambientais. Além disso, é dependente do metabolismo da glicose, a qual será o precursor dos dois principais intermediários dos metabólitos secundários: o ácido acético e o ácido chiquímico (SANTOS, 2010). Por se tratarem de substâncias com características muito diversas e provenientes de rotas metabólicas distintas, os metabólitos secundários podem ser classificados em diferentes grupos, como por

exemplo, substâncias nitrogenadas, substâncias fenólicas e terpenos (GIMENEZ-GARCIA, 2013).

Os compostos nitrogenados, que apresentam nitrogênio em sua estrutura, compreendem os alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos. As substâncias do grupo dos alcaloides possuem como características em comum a solubilidade em água e a presença de pelo menos um nitrogênio em sua composição (Figura 5).

A toxicidade e o gosto amargo de muitos alcaloides conferem a certas plantas a capacidade de repelir animais, evitando a herbivoria. Além disso, muitas substâncias pertencentes a este grupo possuem importantes ações contra micro-organismos e vírus. Aos alcaloides também é atribuída a função de proteção contra radiações UV devido a sua estrutura química (HENRIQUES et al., 2010).

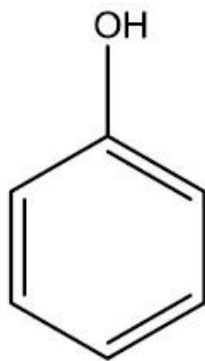
Figura 5: Estrutura química de algumas substâncias da classe dos alcaloides com atividade biológica e que são utilizadas na indústria farmacêutica.



Legenda: (A) Morfina; (B) Atropina; (C) Cafeína.

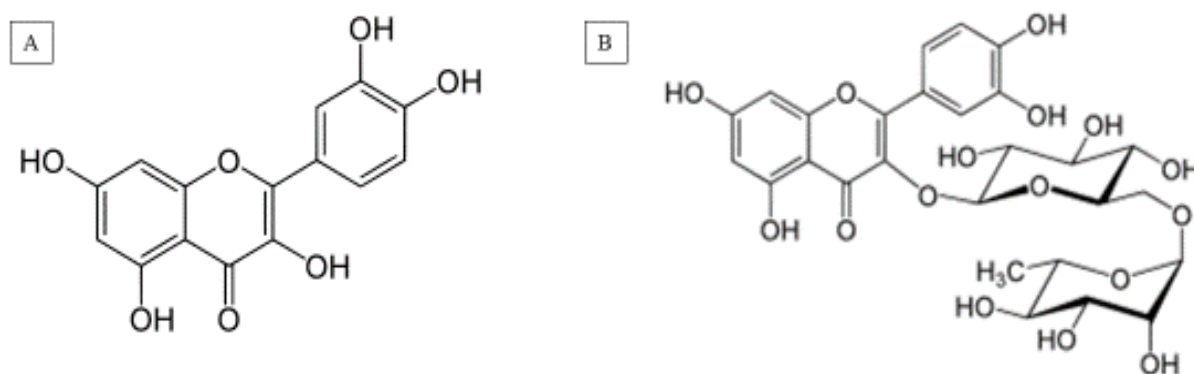
As substâncias fenólicas possuem grande diversidade, abrangendo desde estruturas simples até as mais complexas, que apresentam em sua composição pelo menos uma unidade de fenol, um anel aromático ligado a uma hidroxila (Figura 6) (CARVALHO et al., 2010). Podem ser classificados em alguns subgrupos de acordo com seu esqueleto básico, incluindo ácidos fenólicos, taninos, ligninas e flavonoides (NASCIMENTO et al., 2015).

Figura 6: Unidade de fenol, estrutura química presente em substâncias fenólicas.



Flavonoides são substâncias de 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos. Vão se diferenciar de acordo com o grau de oxidação desta ponte e podem ser divididos em quatro grupos principais: flavonas, flavonois, antocianinas e isoflavonas (Figura 7). As antocianinas são pigmentos responsáveis por grande parte da pigmentação de flores e frutos. As flavonas e flavonois não são visíveis ao olho humano, porém podem ser atrativos para insetos (GARCIA; CARRIL, 2009). Para a planta, os compostos fenólicos desempenham diversas funções, inclusive oferecer resistência e proteção. Já para os seres humanos, estas substâncias têm ações biológicas comprovadas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, antiúlcera (NASCIMENTO et al., 2015) e antioxidante (BOGUCA-KOCKA et al., 2016).

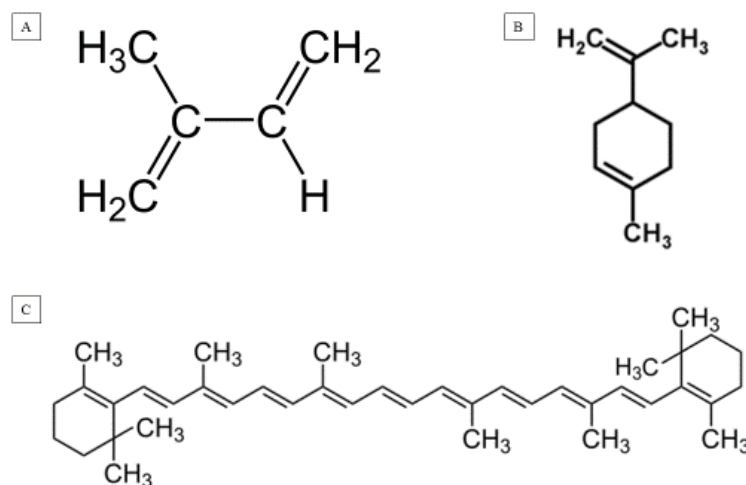
Figura 7: Estrutura química de alguns flavonoides presentes na espécie *K. pinnata*.



Legenda: (A) Quercetina; (B) Rutina.

Os terpenos constituem um grande grupo de metabólitos, que se diferenciam pelo número de subunidades de isopreno (5C) que os formam: monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), triterpenos (30C), tetraterpenos (40C) ou politerpenos quando possuem mais de oito subunidades isoprênicas (Figura 8).

Figura 8: Estrutura química da unidade básica dos terpenos e exemplos de substâncias deste grupo.



Legenda: (A) Isopreno; (B) Limoneno, um monoterpreno; (C) Beta-caroteno, um tetraterpreno.

Os terpenos são muito utilizados na indústria alimentícia e cosmética, e apresentam diversas propriedades medicinais, incluindo anticarcinogênica, antimicrobiana e inseticida (GARCIA; CARRIL, 2009). Este grupo inclui hormônios, carotenoides, óleos essenciais, esteroides e seus derivados (GARCIA; CARRIL, 2009). Além disso, inclui substâncias denominadas saponinas triterpênicas, que, juntamente com as saponinas esteroidais, formam uma classe de grande importância farmacêutica, podendo ser utilizadas como adjuvante ou componentes ativos em fármacos ou ainda como matéria-prima para síntese de esteroides. Devido às suas propriedades estruturais, as saponinas possuem capacidade de interação com a membrana plasmática e já foram relatadas atividades como hemolítica, espermicida e anti-helmíntica (SCHENKEL et al., 2010).

O uso medicinal de substâncias vegetais bioativas vem se tornando cada vez mais intensificado, dado o crescimento de estudos que comprovam suas ações farmacológicas (CARVALHO et al., 2014). Entretanto, a produção de metabólitos secundários pelo vegetal não se mostra uniforme e constante, podendo haver variações até mesmo de indivíduo para indivíduo, uma vez que depende não só de fatores genéticos, mas também ambientais (NASCIMENTO et al., 2015). Desta forma, são de grande interesse os estudos que permitam o desenvolvimento de protocolos para a obtenção e manutenção de culturas *in vitro* produtoras de altas concentrações desses metabólitos (HITMI et al., 2000). A cultura de tecidos vegetais (CTV) tem sido aplicada com êxito na produção de plantas e substâncias de interesse medicinal sob condições *in vitro*, disponibilizando matéria-prima para a exploração de metabólitos de forma contínua e homogênea (KARUPPUSAMY, 2009).

1.4 Cultura de tecidos vegetais

A CTV consiste em um conjunto de técnicas que permitem a manipulação de material vegetal de forma asséptica e controlada, viabilizando a produção de plantas e substâncias de interesse sob condições *in vitro*. Tem por base a totipotência celular, definida pelo botânico alemão Haberlandt, em 1902, como a capacidade de uma única célula vegetal regenerar uma nova planta completa (BHOITE; PALSHIKAR, 2014). Os protocolos estabelecidos *in vitro* aplicando as técnicas de CTV podem levar ao aumento da produção dos metabólitos em larga escala, assim como à redução no tempo de obtenção dessas substâncias de interesse (GEORGE et al., 2008).

Para se iniciarem as culturas sob condições *in vitro* é necessário o uso de fragmentos de tecido (explantes) obtidos de uma planta matriz. Os explantes podem se originar de um tecido adulto, oriundo de um órgão já diferenciado, como folhas ou raízes, ou meristemático, como aqueles presentes nos ápices caulinares e na extremidade de raízes. Uma vez isolado, o explante é inoculado em um meio de cultura, que fornecerá as substâncias necessárias ao crescimento vegetal, como água, uma fonte de carbono, que frequentemente é a sacarose, além de macro e micronutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento (ou fitorreguladores), substâncias que mimetizam a ação dos hormônios vegetais (HUSSAIN et al., 2012). Cada planta apresenta necessidades metabólicas diferentes, porém existem formulações de meio de cultura com grande aplicação, como o meio MS, proposto em 1962 por Murashige e Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio MS apresenta uma formulação bastante abrangente em termos de composição mineral, sendo eficiente na manutenção de um grande número de espécies *in vitro*.

Tanto o tipo de explante quanto a composição do meio de cultura possuem papel fundamental na resposta morfogênica, havendo destaque para a ação dos fitorreguladores. Na CTV, as substâncias mais utilizadas como fitorreguladores pertencem à classe das auxinas, como picloram (PIC), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA); às citocininas, como a cinetina (KIN) e a benzilaminopurina (BAP) e à classe das giberelinas, como o ácido giberélico (GA3) (TERMIGNONI, 2005; HUSSAIN et al., 2012).

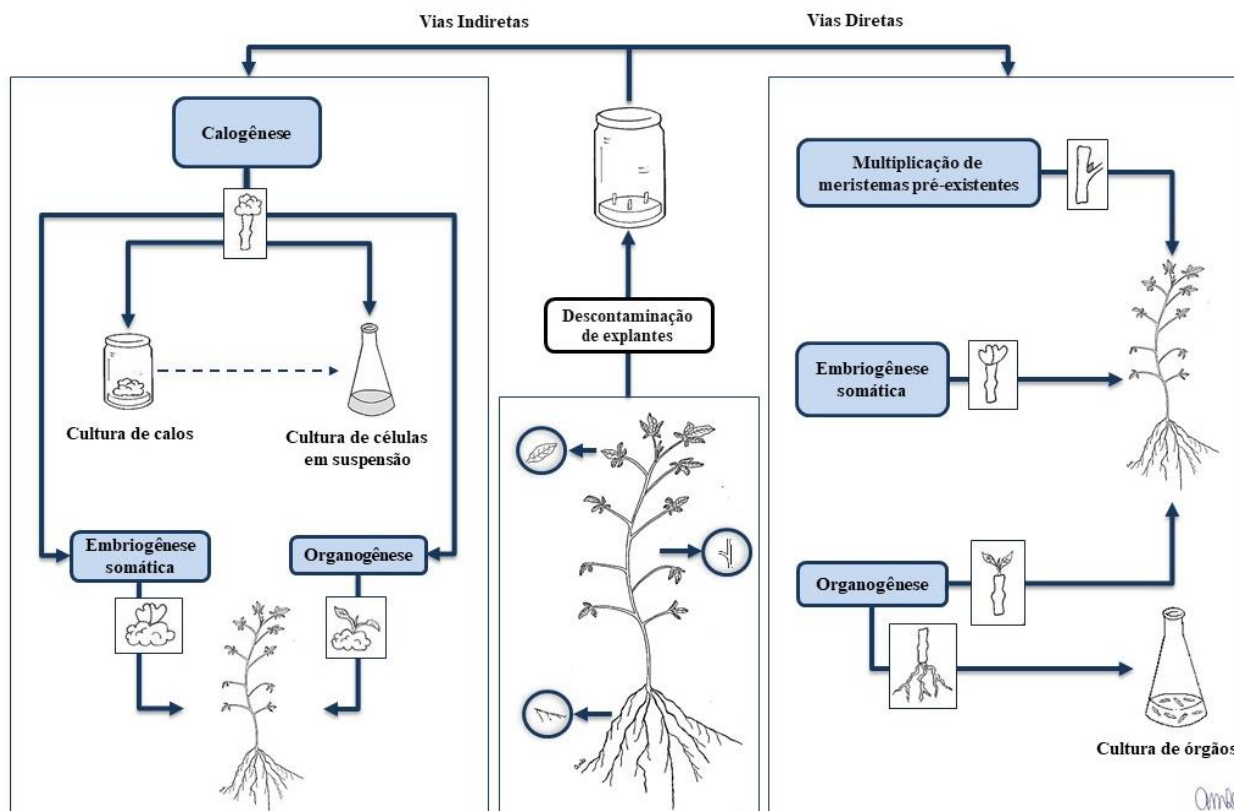
Entre as técnicas de CTV (Figura 9), a micropropagação é a mais frequentemente utilizada, consistindo na produção de clones da planta matriz de forma asséptica, rápida e contínua (TERMIGNONI, 2005). A micropropagação pode ser alcançada por três vias: proliferação de meristemas pré-existentes; embriogênese somática, caracterizada pelo desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, e a via da organogênese, que

consiste na indução de gemas adventícias a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênico (GEORGE et al., 2008).

A embriogênese e a organogênese podem ocorrer por via direta ou indireta. Na via direta, as células sofrem desdiferenciação e em seguida rediferenciação, dando origem a embriões somáticos ou brotos (plantas desprovidas de sistema radicular), respectivamente. No caso da via indireta, as células do explante passam por desdiferenciação e por uma fase com intensa proliferação celular, formando uma massa de células desorganizadas denominada de calo, a partir de um processo denominado calogênese. A rediferenciação a partir do calo caracteriza o processo de embriogênese ou organogênese indiretas. Entretanto, a massa de células pode permanecer em constante divisão sem diferenciação, dando origem a uma cultura de calos (RAVEN et al., 2014). A partir dos calos, pode-se estabelecer culturas de células em suspensão (CCS), que consistem em células individuais ou agregados celulares inoculados em meio líquido mantidos sob agitação (GUERRA; NODARI, 2006) (Figura 9). Contudo, CCS, por não apresentarem alto grau de diferenciação, não têm todas as vias metabólicas ativas, criando-se uma limitação para a variedade de substâncias que podem ser produzidas (GANHI, 2015).

Outra técnica *in vitro* muito aplicada aos estudos com plantas medicinais são as culturas de órgãos, que se caracterizam por preservarem a estrutura básica do explante inicial, com um crescimento organizado que pode ser continuamente mantido. São exemplos de culturas de órgãos, culturas de meristemas, culturas de embriões e culturas de raízes (GEORGE et al., 2008) (Figura 9).

Figura 9: Rotas de desenvolvimento *in vitro* empregando técnicas de culturas de tecidos vegetais.



Fonte: Desenhos elaborados por Adriana Maria Lanziotti.

1.4.1 Culturas de raízes

Por serem formadas por células diferenciadas e organizadas, as culturas de órgãos, com destaque para as culturas de raízes, têm se mostrado como sistemas eficientes para a produção de metabólitos *in vitro* (SIVAKUMAR, 2006). Ao contrário das culturas estabelecidas a partir de vias de desenvolvimento indiretas, as culturas de raízes obtidas por via direta podem apresentar maior estabilidade genética, sendo menos susceptíveis a variações somaclonais (ESPINOSA-LEAL et al., 2018). Raízes *in vivo* apresentam capacidade de produção de metabólitos bioativos variados, principalmente devido à sua localização no vegetal e aos estresses ambientais aos quais são expostas (ISAH et al., 2018). Por serem reconhecidas como importantes fontes de metabólitos com valor medicinal, as raízes têm sido muito utilizadas no cultivo *in vitro* visando à otimização da produção de metabólitos nestes órgãos (OTÁLVARO-ÁLVAREZ; VELÁSQUEZ-LOZANO, 2014).

Culturas de raízes podem ser obtidas através da transformação genética mediada pela bactéria *Agrobacterium rhizogenes*. Uma vez transformadas, as raízes são transferidas para um meio de cultura livre da bactéria e podem ser cultivadas por tempo indefinido. Por esta técnica são estabelecidas as chamadas *hairy roots*, ou raízes em cabeleira, que apresentam diversas vantagens, como rápido crescimento, independência de reguladores de crescimento e alta produção de metabólitos secundários (GANDHI et al., 2016).

Além das *hairy roots*, a cultura de raízes pode ser obtida pela proliferação de raízes adventícias em meio de cultura suplementado com fitorreguladores. Esta técnica apresenta como vantagens não utilizar DNA exógeno, a possibilidade de apresentar altas taxas de crescimento e ausência de substâncias da classe das opinas presentes nas *hairy roots*, que podem ser tóxicas para células de mamíferos (BAQUE et al., 2012).

Com um alto grau de diferenciação nos seus tecidos e alta produtividade, as culturas de raízes adventícias podem envolver uma série de etapas que envolvem (a) a indução de rizogênese em uma planta matriz; (b) o estabelecimento das culturas de raízes em meio líquido em frascos ou biorreatores; (c) o ajuste das condições de cultura e da composição do meio de cultivo visando ao aumento do acúmulo de biomassa e da produção de metabólitos; (d) o aumento da escala de produção visando alcançar um nível industrial e (e) a eficiência na extração dos metabólitos de interesse das culturas (ISAH et al., 2018).

Entretanto, a produção de metabólitos secundários frequentemente esbarra na dificuldade de tornar o processo economicamente viável, desde o estabelecimento *in vitro* até a recuperação das substâncias de interesse. Dessa forma, torna-se relevante o desenvolvimento de estratégias que estimulem o aumento da produção de metabólitos nas culturas *in vitro*, o que pode ser alcançado com o uso de técnicas como a engenharia genética, a adição de precursores e o uso de eliciadores (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013; GANHI et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015).

1.4.2 Eliciação

Elicidores são substâncias capazes de induzir mudanças fisiológicas na planta, ativando diversos mecanismos e vias metabólicas em resposta a determinado estresse físico, químico ou biológico, levando ao aumento da produção e acúmulo de determinadas moléculas de interesse (BAENAS et al., 2014).

Os eliciadores são classificados segundo sua origem em bióticos e abióticos. Os bióticos têm origem biológica como, por exemplo, extrato de leveduras, quitosana e celulase. Já os abióticos incluem agentes químicos, como sais inorgânicos e metais pesados, além de fatores físicos, como temperatura, estresse osmótico, luz UV, entre outros (BAENAS et al., 2014). Os fitormônios ácido jasmônico e ácido salicílico, assim como os seus sais derivados metil jasmonato (MeJa) e metil salicílico, têm sido utilizados com função eliciadora em diversos estudos. Estas substâncias são consideradas por alguns autores como eliciadores bióticos (AKASH et al., 2005; AIJAZ et al., 2011), uma vez que são substâncias encontradas nos vegetais, enquanto outros autores as classificam como abióticas (PRASAD et al., 2006).

Muitos trabalhos têm avaliado o efeito de eliciadores em culturas de raízes do tipo *hairy roots*. A adição de MeJa promoveu o aumento do acúmulo de compostos fenólicos em culturas de *Momordica charantia* (CHUNG et al., 2016), o mesmo ocorrendo em *Vitis rotundifolia* (NOPO-OLAZABAL et al., 2013). Em *Salvia miltiorrhiza*, a eliciação com radiação UV-B combinada com MeJa levou ao aumento da produção de diterpenos (WANG et al., 2016). Já em *Astragalus membranaceus*, a adição de MeJa induziu o acúmulo de isoflavonoides (GAI et al., 2016).

Em relação às culturas de raízes adventícias, a adição de MeJa também tem mostrado resultados expressivos no acúmulo de metabólitos, sendo a grande maioria dos trabalhos realizados em biorreatores, o que permite a síntese de substâncias em maior quantidade, alcançando, inclusive, a produção em nível industrial. Em culturas de raízes adventícias de *Eleutherococcus koreanum* a adição de MeJa se mostrou eficiente para o aumento de biomassa e da produção de compostos fenólicos. A produção de substâncias atingiu um nível considerado competitivo com a produção *in vivo* do material, que leva três anos, método atualmente utilizado na indústria (LEE et al., 2015). Também em biorreatores de escala comercial, a adição de MeJa foi capaz de estimular a produção de biofenóis em culturas de *Panax ginseng* (SIVAKUMAR; PAEK, 2005). Em culturas de *Hypericum perforatum*, o uso de MeJa promoveu a redução do acúmulo de biomassa das raízes, porém levou ao aumento da produção de metabólito de interesse medicinal (WU et al., 2014). Em culturas de *Oplopanax elatus*, uma espécie ameaçada, MeJa e ácido salicílico foram responsáveis pelo aumento da concentração de polissacarídeos, fenóis e flavonoides (JIANG et al., 2017).

Para o gênero *Kalanchoe*, até o momento só foram avaliados eliciadores para o cultivo de plantas *in vivo*. O uso de MeJa provocou o aumento do acúmulo de antocianinas nas raízes de *K. blossfeldiana* (GÓRAJ-KONIARSKA et al., 2015), enquanto radiação UV-B se mostrou

eficiente para estimular a produção de flavonoides em folhas de *K. pinnata* (NASCIMENTO et al., 2015).

1.5 Capacidade produtiva, produtividade e eficiência de produção em CTV

Na busca pela otimização de procedimentos visando um produto final, a análise apenas da quantidade de produto gerado para determinação das melhores condições se torna equivocada. Muitos fatores ao longo do processo podem influenciar na produção, como genótipo, composição do meio, reguladores de crescimento, condições físicas, e estes não atuam de forma independente e linear (ARAB et al., 2018). Desta forma, é necessário avaliar a produção como um todo, desde a manutenção das matrizes até o acúmulo de biomassa ou metabólitos das culturas, analisando indicadores relevantes para uma metodologia economicamente viável. Os gargalos da produção *in vitro* podem ser encontrados no tempo gasto com o crescimento das matrizes e culturas, a excisão de explantes e o número de subculturas que mantém altos níveis de produção. Por outro lado, os gastos com insumos para a descontaminação, preparo de meios, estrutura física e treinamento de pessoal para manutenção das culturas também podem ser considerados gargalos da produção em larga escala (GEORGE et al., 2008). A utilização de indicadores para análise de produtividade e eficiência são usuais na produção industrial (SANTOS, 2017), porém sua adaptação para avaliar protocolos de cultura *in vitro* é uma abordagem inédita.

Capacidade produtiva é o limite máximo de produção que uma unidade operacional pode suportar (STEVENSON, 2001), podendo ser subdividida em quatro categorias: instalada, disponível, efetiva e realizada. A capacidade disponível é o limite máximo de produção em uma jornada de trabalho, desconsiderando possíveis perdas ao longo do processo (ARNOLD, 1999).

A produtividade de um determinado sistema de produção é definida pela razão entre a quantidade de produtos (*output*) e insumos (*input*). No caso de um processo que envolva mais de um produto ou insumo é necessário incluir tais valores no numerador e denominador, determinando, assim, a produtividade total (TUPY; YAMAGUCHI, 1998). Pode ser vista como uma medida da eficiência do processo de produção, enfatizando aspectos operacionais tangíveis, como maquinário, instrumentos, quantidade de matéria-prima e de trabalho. Nesse sentido, a produtividade irá utilizar indicadores de natureza físico-operacional como quantidade de produto por unidade de tempo ou quantidade de produto por unidade de matéria-

prima, e será capaz de indicar possíveis gargalos de produtividade, ou seja, os fatores que limitam o aumento da produção (MACEDO, 2012).

A eficiência na produção pode ser subdividida em dois fatores: um componente físico, ligado à capacidade de reduzir as perdas durante o processo, ou produzir utilizando o mínimo de recursos possíveis (eficiência produtiva); e um componente econômico, relacionado à habilidade de se combinarem recursos e resultados na melhor proporção de acordo com preços vigentes (eficiência alocativa) (LOVELL, 1993). Para um método ser considerado eficiente ele deve demandar menos tempo, recursos financeiros, mão de obra e matéria-prima.

1.6 Justificativa

O reconhecido potencial medicinal de *K. pinnata*, que vem sendo utilizada há séculos na medicina popular em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil, demonstra a relevância do desenvolvimento de estudos biotecnológicos com a espécie. Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa com *K. pinnata* indicaram o potencial do cultivo de raízes *in vitro* para a produção de metabólitos de interesse medicinal. Os resultados obtidos mostraram que explantes de raiz (1 g) mantidos em meio contendo a auxina AIB (1 mg.L^{-1}) são capazes de proliferar *in vitro*, viabilizando o estabelecimento da cultura de raízes. Dessa forma, no presente estudo foram avaliadas condições para a otimização das culturas de raízes e do processo de produção de metabólitos para a espécie *K. pinnata*, além da comparação por análises fitoquímicas preliminares de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, os métodos propostos viabilizam a produção controlada da espécie, regulando sua dispersão nos ambientes naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Otimizar a produção de culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* visando à obtenção de metabólitos secundários de interesse medicinal.

2.2 Específicos

- Determinar as melhores condições *in vitro* para a manutenção de plantas matrizes como fontes de explantes para indução de raízes;
- Avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com a auxina AIB, assim como da presença e ausência de luz, sobre a multiplicação *in vitro* das raízes;
- Analisar o efeito da adição do eliciador metil jasmonato para a produção de biomassa e metabólitos secundários pelas culturas de raízes;
- Caracterizar preliminarmente o perfil fitoquímico de extratos obtidos das culturas de raízes e do seu meio de cultivo, comparando ao material cultivado *in vivo*, por cromatografia em camada delgada (CCD);
- Determinar o método de maior eficiência para produção de culturas de raízes em relação à capacidade produtiva, produtividade e gastos com insumos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

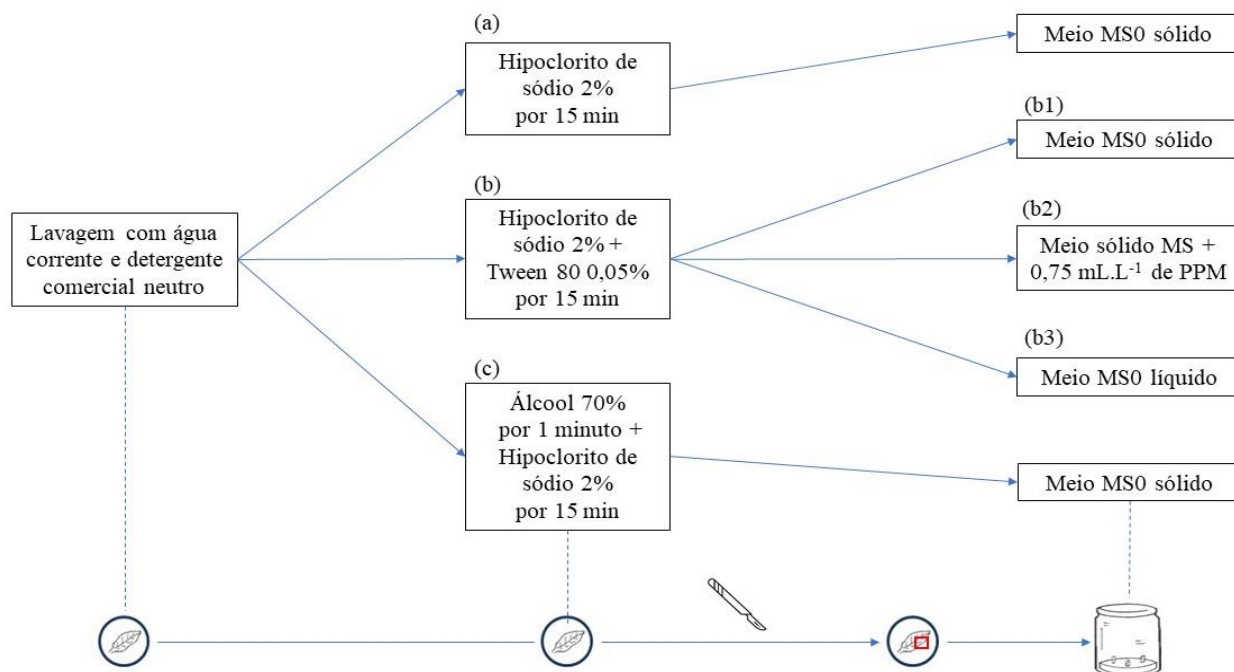
Como fonte de material botânico foram utilizados exemplares de *Kalanchoe pinnata* coletados no bairro de Jacarepaguá (município do Rio de Janeiro - 22°57'29.7"S, 43°21'13.3"W) e mantidos, desde 2013, em cultivo no telado do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da UERJ. Um exemplar representativo foi depositado no Herbário da UERJ sob número de registro HRJ 12515.

3.2 Estabelecimento de plantas *in vitro*

Folhas de plantas cultivadas *in vivo* foram submetidas a diferentes métodos de cultivo, visando determinar as condições ideais para o estabelecimento de culturas *in vitro* (Figura 10). Inicialmente as folhas foram lavadas com água corrente e detergente comercial neutro. Em seguida, em fluxo laminar, foram submetidas a três protocolos de descontaminação: (a) Hipoclorito de sódio a 2% durante 15 minutos sob agitação; (b) Hipoclorito de sódio a 2% acrescido de 0,05% de Tween 80[®] por 15 minutos sob agitação; (c) Etanol 70% por 1 minuto seguido de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos sob agitação. Foram utilizadas folhas inteiras de aproximadamente 7 cm de comprimento e os tratamentos foram realizados no escuro para minimizar os efeitos da oxidação. Após a etapa de descontaminação foram preparados explantes (1 cm²) a partir do bordo foliar, contendo um meristema marginal, que foram inoculados em frascos de cultura (4,0 cm x 4,5 cm) contendo 10 mL de meio MS sem suplementação hormonal (MS0) solidificado com 0,8 g.L⁻¹ de ágar. Para o tratamento "b", a inoculação dos explantes foi realizada em três sistemas: (b1) meio MS0 sólido, (b2) meio MS0 sólido suplementado com 0,75 mL.L⁻¹ de Plant Preservative Mixture (PPM[™]); (b3) meio MS0 líquido em frascos Erlenmeyer (50 mL) contendo 30 mL do meio de cultura. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 16h (45 μmol.m⁻².s⁻¹). No caso das culturas em meio líquido, os frascos foram mantidos em mesas giratórias (110 rpm). Os experimentos foram realizados com o cultivo de um explante por frasco (n = 20), com 3 repetições. Após 30 dias em cultura foram avaliadas a resposta morfogênica

(regeneração de plantas completas) e a ocorrência de oxidação após descarte de materiais comprometidos por contaminação.

Figura 10: Etapas da descontaminação para estabelecimento *in vitro* de *K. pinnata*.

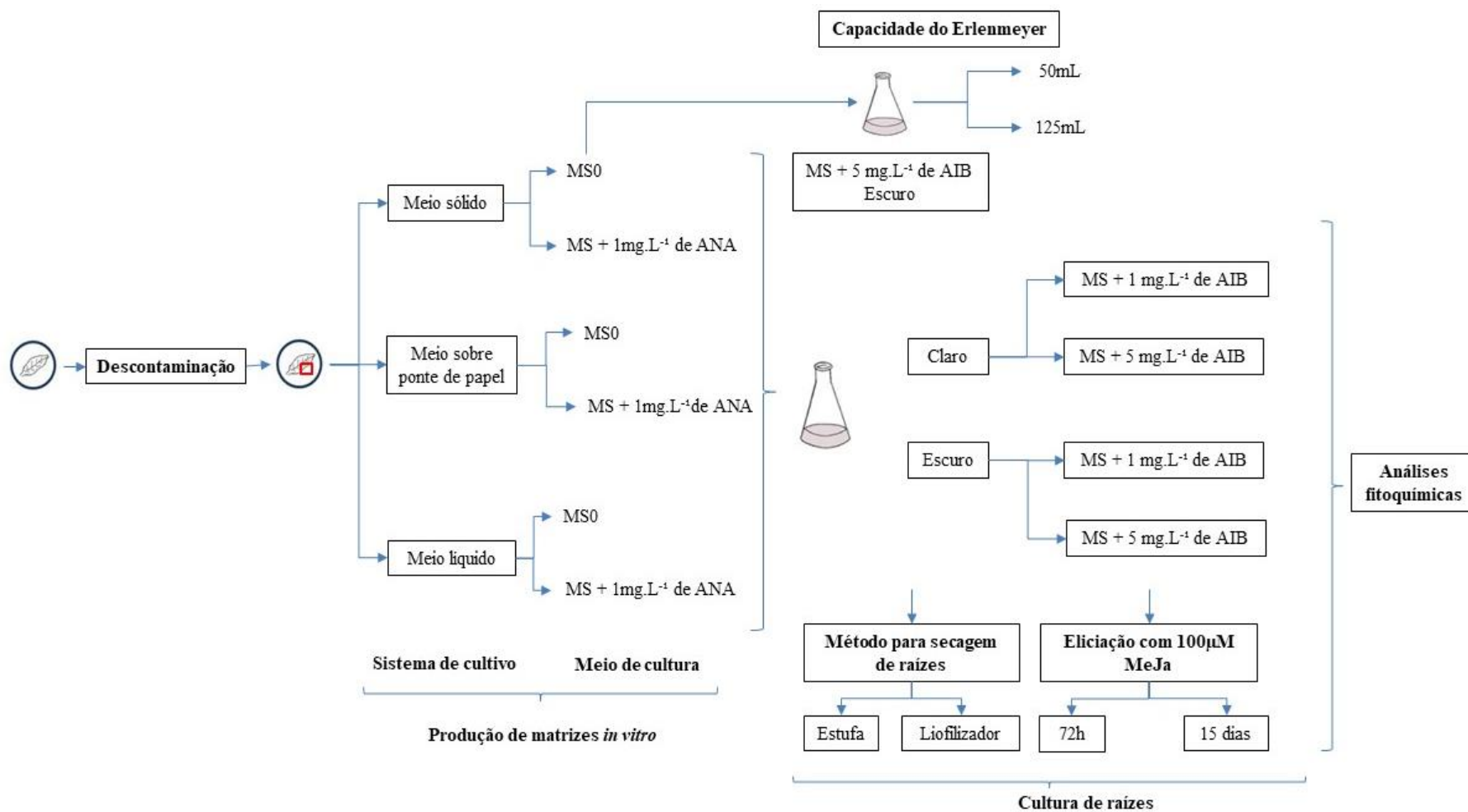


3.3 Determinação de condições para manutenção de plantas matrizes *in vitro*

Considerando resultados anteriores, em que a melhor resposta de regeneração *in vitro* de plantas completas foi alcançada a partir do cultivo de explantes do bordo foliar (BARBOZA, 2017), estes explantes foram selecionados para a produção de plantas completas mantidas por micropropagação visando à produção de raízes. Segmentos de bordo foliar (1 cm²) contendo um meristema marginal, oriundos de plantas desenvolvidas *in vivo*, descontaminadas conforme método mais eficiente selecionado no item anterior, foram inoculados em meio MS0 ou com suplementação de 1mg.L⁻¹ de ANA em diferentes sistemas de cultura: meio sólido, meio líquido sob agitação e pontes de papel de filtro sobre meio líquido, constituídas por discos de papel Whatman® nº1 apoiados sobre esferas de vidro (Figura 11). Os experimentos foram realizados com o cultivo de quatro explantes por frasco (6,5 cm x 8,5 cm), ou por Erlenmeyer com capacidade de 50 mL, com n = 20 por 3 repetições. As culturas foram mantidas nas mesmas condições físicas descritas anteriormente. Após 30 dias (culturas em meio líquido sob agitação), 45 dias (culturas em meio sólido e ponte de papel com suplementação de ANA) e 60

dias (culturas em meio sólido e ponte de papel em MS0) em cultivo, foram analisados o aspecto das partes aéreas e sua viabilidade para micropropagação. Além disso, as raízes produzidas foram isoladas e foi determinado o acúmulo de biomassa pela aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS). Para a determinação do PS, as raízes foram mantidas em estufa a 45 °C, até peso constante.

Figura 11: Esquema do desenho experimental



3.4 Estabelecimento de culturas de raízes adventícias

Estudos anteriores com *K. pinnata* demonstraram a capacidade de multiplicação de explantes radiculares de plantas propagadas *in vitro* quando cultivados em meio MS líquido suplementado com 1 mg.L⁻¹ de AIB (BARBOZA, 2017).

No presente estudo, foi avaliada a capacidade de multiplicação das raízes obtidas das plantas propagadas nos diferentes sistemas de cultivo, descritos no item 3.3. Inicialmente, para determinar as melhores condições a serem empregadas na cultura de raízes em meio líquido, foi realizado um ensaio experimental no qual a quantidade de meio de cultura e a capacidade dos frascos foram avaliadas. Para isso, explantes radiculares (0,5 g), oriundos de plantas propagadas *in vitro* em meio MS0 sólido, foram cultivados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 50 mL (30 mL de meio) e 125 mL (50 mL de meio), contendo meio MS com 5 mg.L⁻¹ de AIB (Figura 11). Os experimentos foram realizados em triplicata, totalizando n = 30, e as culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob agitação (110 rpm), à temperatura de 26 ± 2 °C e na ausência de luz. Após 30 dias de cultivo, foi determinado o acúmulo de biomassa pela aferição de PF e PS.

Para quantificação do peso seco foram avaliados dois métodos para secagem do material: em estufa a 45 °C, até peso constante, e liofilização por 5 dias. Para isso, foram utilizadas culturas de raízes (n = 10) com 30 dias, as quais foram secas em papel de filtro e em seguida colocadas em barcas de papel alumínio previamente pesadas. Foi aferido o peso fresco do material, que foi colocado na estufa nas condições citadas acima ou em frasco de vidro acondicionado no liofilizador. Uma vez seco, foi determinado o PS do material e calculada a relação entre peso seco e peso fresco (PS/PF*100) obtida em cada método.

Dando continuidade aos estudos, explantes radiculares (0,5 g) obtidos de plantas produzidas nos diferentes sistemas de cultivo (meio sólido, líquido e sobre ponte de papel), em meio MS0 e em meio contendo 1 mg.L⁻¹ de ANA, foram cultivados em frascos Erlenmeyer (50 mL) contendo 30 mL de meio MS líquido suplementado com AIB (1 mg.L⁻¹; 5 mg.L⁻¹). As culturas foram mantidas em mesas giratórias (110 rpm), na presença de luz (fotoperíodo de 16h) ou no escuro (Figura 11). Os experimentos foram realizados com n = 10, com 3 repetições. Após 30 dias em cultivo foi determinado o acúmulo de biomassa pela aferição de PF e PS.

Para avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* das raízes ao longo do tempo em cultivo, culturas estabelecidas nas condições que propiciaram maiores valores de acúmulo de biomassa

foram acompanhadas por subculturas realizadas a cada 30 dias em um total de três subculturas (120 dias). A cada subcultura, 0,5 g de raízes foi recultivada em meio fresco de igual composição.

3.5 Eliciação das culturas de raízes

As culturas de raízes estabelecidas nas condições de cultivo *in vitro* que resultaram em maior acúmulo de biomassa foram submetidas ao processo de eliciação utilizando como eliciador a substância MeJa na concentração de 100 μ M, conforme metodologia proposta por Chung e colaboradores (2016). O eliciador foi diluído com etanol e esterilizado por filtração, e então adicionado às culturas após 15 e 27 dias do início do cultivo, perfazendo dois períodos de tratamento na presença do eliciador, 15 e 3 dias, respectivamente (Figura 11). Ao final de 30 dias em cultivo, as raízes foram coletadas e foram aferidos PF e PS.

3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA *one way*) e ao teste de comparação múltipla de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$). Para comparação de apenas duas variáveis (item 3.4), foi utilizado teste t de Mann-Whitney bicaudal. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism[®].

3.7 Análises fitoquímicas

3.7.1 Preparo dos extratos

Foram utilizadas folhas, caules e raízes frescas de plantas cultivadas *in vivo*, partes aéreas de plantas cultivadas *in vitro* que serviram como fonte de explante de raízes, cultura de raízes eliciadas e não eliciadas e seus respectivos meios de cultura (Figura 11). Os materiais foram pesados e em seguida congelados. Após o congelamento, foram liofilizados por cinco dias e, em seguida, pulverizados em moinho IKA[®]WERKE (mod. MF10basic). Foram pesados 2 g de cada

amostra, que foram submetidos a extração com etanol 95% por 30 minutos com auxílio de banho de ultrassom. Em seguida, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório (Marconi[®]) a 35° C e, após a secagem, foi calculado o rendimento da extração.

3.7.2 Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a determinação do perfil fitoquímico preliminar por CCD, as análises seguiram a metodologia proposta por Wagner e Bladt (2001). Os extratos foram submetidos à prospecção fitoquímica com sistema de polaridade crescente em placas para CCD ALUGRAM[®] Xtra SIL G/UV 254 nm 10 x 10 cm, espessura de 0,20 mm (Macharey-Nagel[®]). As amostras dos extratos foram aplicadas nas placas em bandas com o auxílio de um tubo capilar, sendo a fase móvel específica para cada grupo químico (Quadro 2).

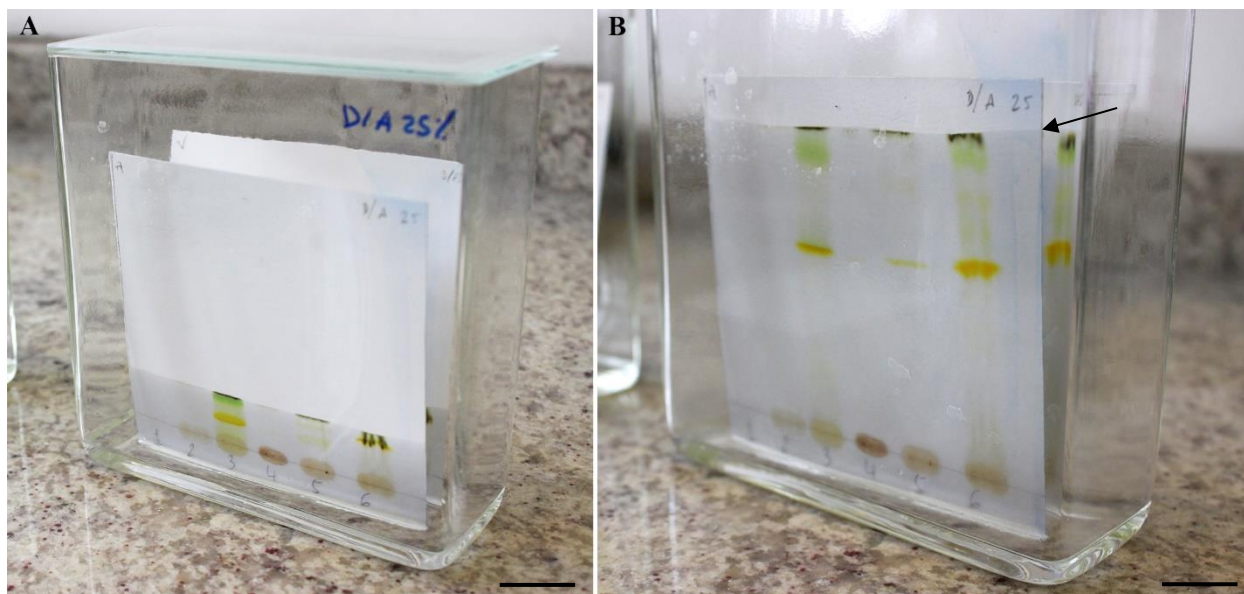
Quadro 2: Sistemas de fases móveis e reveladores empregados nas cromatografias em camada delgada (CCD) de *K. pinnata*.

Fase móvel (v:v)	Classe Química	Reveladores	Visualização
Hexano	Triagem	H ₂ SO ₄ 10% *	Luz visível e UV (254 nm e 365 nm)
Hexano : Diclorometano (75:25)			
Hexano : Diclorometano (50:50)			
Hexano : Diclorometano (25:75)			
Diclorometano		H ₂ SO ₄ 10% *; NP→PEG**; Vanilina	
Diclorometano : Acetato de Etila (75:25)			
Diclorometano : Acetato de Etila (50:50)			
Diclorometano : Acetato de Etila (25:75)			
Acetato de Etila			
Acetato de Etila : Metanol (75:25)		H ₂ SO ₄ 10% *, NP→PEG**	
Acetato de Etila : Metanol (50:50)			
Acetato de Etila : Metanol (25:75)			
Metanol			
Clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60:32:12:8)	Saponina	Anisaldeído sulfúrico***	
Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Flavonoide	NP→PEG**	

Legenda: *H₂SO₄ 10% = solução de ácido sulfúrico a 10% em etanol. **NP→PEG = solução de difenilboriloxietilamina a 1% em metanol seguido de solução de polietilenoglicol 4000 a 1% em metanol. ***Anisaldeído sulfúrico = solução de 0,5 mL de anisaldeído em 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico PA.

Todas as placas foram eluídas em cuba cromatográfica de vidro conforme exemplificado na Figura 12A, de acordo com as proporções anteriormente descritas. O sistema foi mantido fechado, para que ocorresse uma eficiente separação dos componentes da mistura. Após a eluição, quando a frente do solvente atingiu a distância de 1,5 cm da extremidade superior (Figura 12B), as placas foram retiradas da cuba com auxílio de pinça e transferidas para capela de exaustão a fim de evaporar o solvente residual. Os reveladores variaram conforme a classe química analisada (Quadro 2).

Figura 12: Corrida de cromatografia em camada delgada (CCD) de extratos de material cultivado *in vitro* e *in vivo* de *Kalanchoe pinnata*.



Legenda: (A) Sistema composto por cuba cromatográfica, fase móvel e placa de CCD; (B) Ponto máximo que o solvente atinge (seta), para posterior secagem, revelação e análise da placa. Barra = 3cm.

3.8 Avaliação da eficiência, capacidade produtiva e produtividade dos sistemas de produção de cultura de raízes

Para determinar a eficiência dos diferentes sistemas de cultivo utilizados no presente trabalho, foram avaliados sete parâmetros ao longo de todo o processo. Na etapa de manutenção das plantas matrizes, foram considerados: (1) a capacidade das plantas de desenvolverem novas plantas matrizes, (2) a presença ou não de ágar nos meios de cultura e (3) o tempo necessário para cada sistema gerar plantas doadoras de explantes radiculares. Na etapa de isolamento dos explantes radiculares foi avaliado (4) o tempo gasto no procedimento de excisão dos explantes. Nesta avaliação foi considerado um $n = 5$ de explantes em três repetições. Além disso, para maior padronização, o procedimento foi realizado sempre no mesmo fluxo laminar, em dias distintos e pelo mesmo manipulador. Finalmente, na etapa referente ao cultivo das raízes, foram avaliados: (5) a quantidade de explantes de raiz (PF) empregada para iniciar as culturas, (6) o número de frascos Erlenmeyer utilizado e (7) a quantidade de meio de cultura utilizada em todo o processo. Desta forma, para determinar a maior eficiência foi realizada apenas análise comparativa dos

parâmetros. O processo mais eficiente é aquele que demanda menos tempo, mão de obra e insumo, ou seja, com melhor relação custo/benefício.

Para determinação da capacidade produtiva disponível (CPD) de raízes foi considerado o parâmetro 4 “Tempo para isolamento de explantes” (T), sendo calculado o peso seco de raízes (Prod._{máx.}) produzido por dia de trabalho (8h/dia), de acordo com:

$$CPD = \text{Prod.}_{\text{máx.}}/\text{dia}$$

$$\text{Sendo Prod.}_{\text{máx.}} = 480/T$$

Para estimar a capacidade produtiva de extrato e de flavonoides isolados, também foi utilizado o rendimento dos extratos preparados com as culturas de raízes, assim como a concentração de flavonoides totais obtida a partir desses extratos. Essas análises foram realizadas considerando-se o rendimento médio obtido empregando o método de extração previamente descrito (item 3.7.1) e o protocolo estabelecido por Muzitano e colaboradores (2006), para o isolamento de flavonoides na espécie *K. pinnata*.

A fim de determinar a produtividade (P) de cada sistema de cultivo, foi usado o parâmetro 5 “Peso fresco (g) de explante necessário” (I = *input*) utilizado para produção de 1 g de peso seco de raízes (O = *output*), utilizando a fórmula:

$$P = O/I$$

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento de plantas *in vitro*

O uso de hipoclorito na concentração de 2% mostrou-se o tratamento mais eficiente para a descontaminação das folhas, resultando em baixas taxas de contaminação e oxidação, além de altos valores de regeneração de plantas. Por outro lado, o acréscimo de Tween 80[®] à solução aumentou significativamente o processo de oxidação. Este efeito negativo do Tween 80[®] foi observado tanto para o material cultivado em meio sólido como em meio líquido. A adição da solução PPM[™] ao meio de cultura após descontaminação com hipoclorito em associação com Tween 80[®] não foi capaz de reduzir a percentagem de oxidação significativamente, embora tenha resultado em um aumento da regeneração de plantas. Em contrapartida, o uso de etanol em associação ao hipoclorito reduziu significativamente a eficiência do processo de descontaminação (Tabela 1). Com base nos resultados alcançados, o tratamento de descontaminação apenas em solução de hipoclorito foi selecionado para a espécie.

Tabela 1: Avaliação dos diferentes tratamentos de descontaminação de explantes foliares de *Kalanchoe pinnata* após 30 dias de cultivo em meio MS em diferentes condições de cultivo.

Tratamento	Resposta morfogênica (%)	Oxidação (%)	Contaminação (%)
Hipoclorito (2%)	80 ± 2,9 a	13,3 ± 4,4 c	6,7 ± 6,7 b
Hipoclorito (2%) + Tween 80	53,3 ± 6,0 b	36,7 ± 4,4 ab	10 ± 5,8 b
Hipoclorito (2%) + Tween 80 + PPM [®]	61,7 ± 4,4 b	31,7 ± 1,7 b	6,7 ± 4,4 b
Hipoclorito (2%) + Tween 80 (meio líquido)	50 ± 1,0 b	48,3 ± 1,7 a	1,7 ± 1,7 b
Etanol (70%) + hipoclorito (2%)	13,3 ± 4,4 c	48,3 ± 4,4 a	38,3 ± 8,3 a

Legenda: Médias ± erro padrão com letras diferentes nas colunas significam diferença estatística ($p < 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

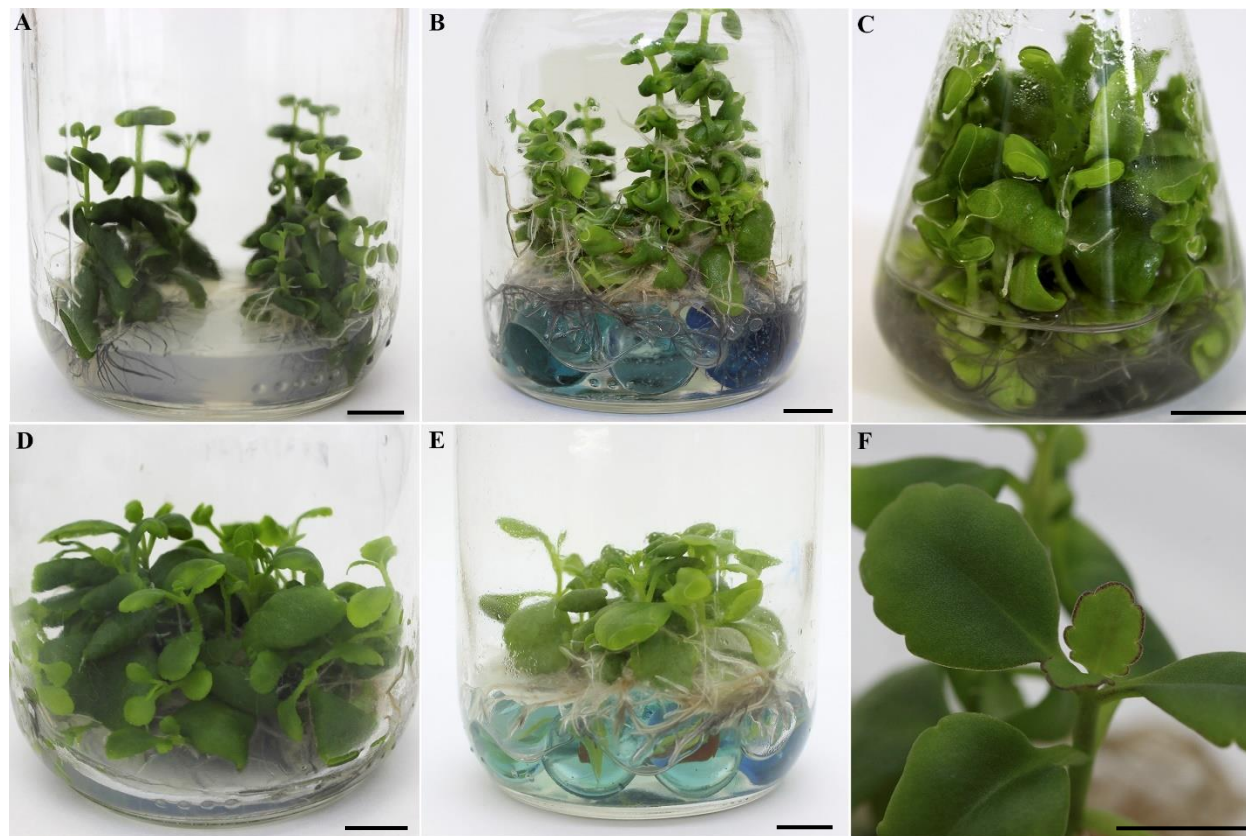
4.2 Determinação de condições para manutenção de plantas matrizes *in vitro*

O cultivo em MS0, tanto em meio sólido (Figura 13A) como no sistema em ponte de papel de filtro (Figura 13B) e meio líquido sob agitação (Figura 13C), resultou no desenvolvimento de plantas que apresentavam folhas retorcidas, sendo que a maioria das folhas não exibiam morfologia característica da espécie. Plantas regeneradas a partir de explantes cultivados em meio MS0 líquido apresentaram hiperidricidade, folhas de tamanhos, espessuras e morfologia bastante variadas (Figura 13C).

Culturas mantidas na presença de ANA em meio sólido (Figura 13D) e sobre ponte de papel de filtro (Figura 13E) deram origem a plantas com folhas de aspecto fenotípico normal, com bordos contendo reentrâncias e coloração características da espécie (Figura 13F), capazes de regenerar plantas completas a partir de suas gemas. Em comparação com culturas mantidas na ausência do fitorregulador, as plantas cultivadas nestas duas condições mostraram um menor crescimento apical, compensado, porém, pela expansão foliar, possuindo um grande número de folhas com tamanho e morfologia adequadas à micropropagação. Por outro lado, o cultivo de explantes em meio líquido suplementado com ANA não resultou em resposta morfogênica, ocorrendo necrose do material após alguns dias em cultura.

Em função dos resultados alcançados, culturas sobre ponte de papel em meio suplementado com 1 mg.L^{-1} de ANA foram selecionadas para o estabelecimento do estoque de plantas *in vitro* utilizadas como fonte de explantes foliares.

Figura 13: Plantas de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.



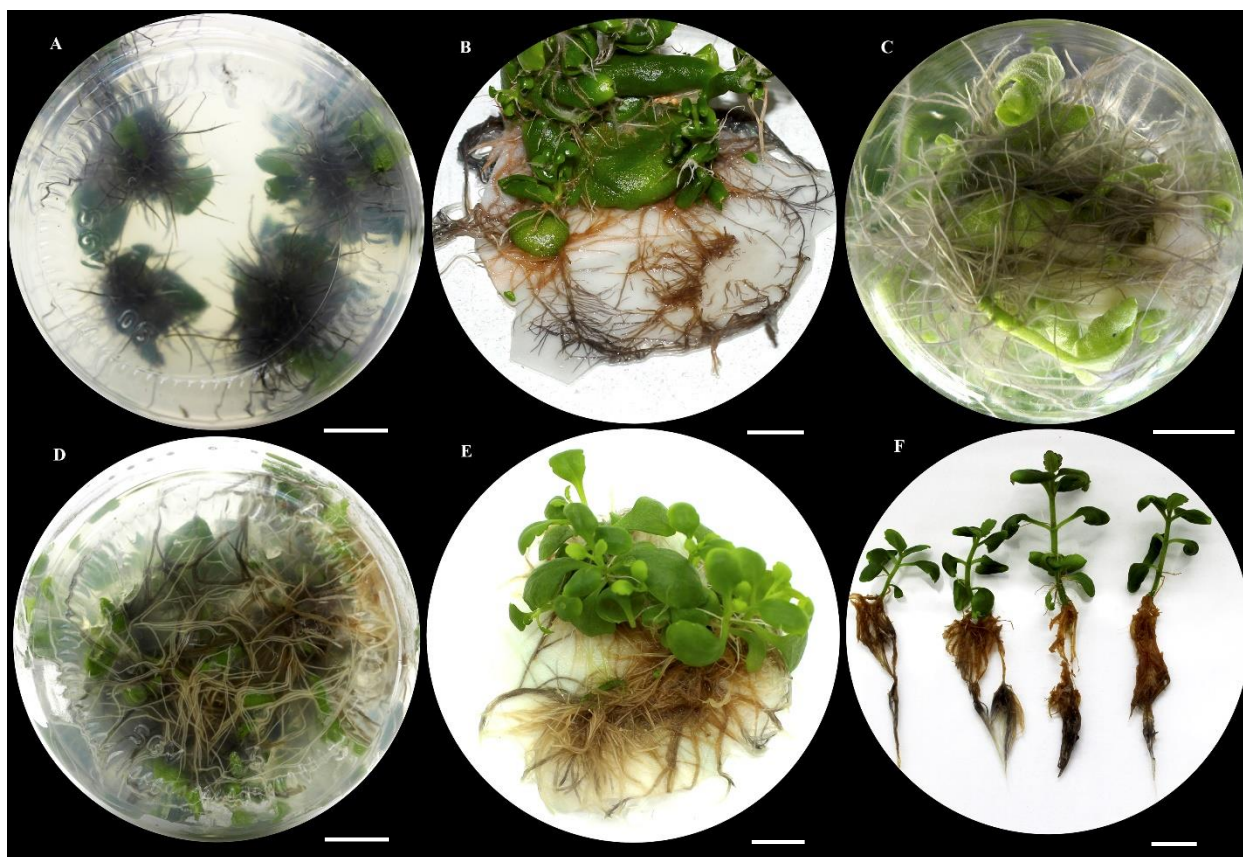
Legenda: (A) Meio sólido MS0, após 60 dias; (B) Ponte de papel de filtro sobre meio líquido MS0, após 45 dias; (C) Meio líquido MS0 sob agitação, após 30 dias; (D) Meio sólido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA, após 60 dias; (E) Ponte de papel de filtro sobre meio líquido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA, após 45 dias; (F) Detalhe de folhas de plantas cultivadas sobre ponte de papel de filtro com meio líquido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA, após 45 dias. Barra = 1 cm.

Cada sistema avaliado resultou na produção de raízes com características distintas. Plantas cultivadas em meio MS0 (Figuras 14A, 14B e 14C) geraram raízes finas e quebradiças. Em meio sem fitorregulador, raízes mantidas em meio sólido (Figura 14A) eram curtas e de coloração grafite. As raízes de plantas mantidas sobre ponte de papel (Figura 14B) apresentaram centro alaranjado e seu crescimento se deu em direção às bordas da ponte de papel, em contato com o meio, onde passaram a apresentar coloração grafite. Já no meio líquido sob agitação (Figura 14C), as raízes proliferaram principalmente no interior de folhas retorcidas dentro do meio de cultura, e as raízes dispersas no meio apresentaram coloração mais esbranquiçada.

Plantas cultivadas em meio suplementado com o fitorregulador ANA produziram raízes grossas e alongadas. Em meio sólido (Figura 14D), as raízes eram de coloração grafite com áreas esbranquiçadas, havendo intenso acúmulo de biomassa, enquanto em culturas sobre ponte de papel

de filtro (Figura 14E), as raízes desenvolvidas sobre as regiões centrais do papel de filtro eram alaranjadas, e aquelas formadas nas regiões periféricas mostravam coloração grafite. No sistema de cultivo em ponte de papel de filtro com suplementação de ANA, as raízes apresentaram maior comprimento quando comparadas aos demais sistemas. Além disso, este sistema se mostrou mais eficiente para o isolamento das raízes sem que ocorresse uma grande fragmentação e perda do material (Figura 14F).

Figura 14: Desenvolvimento de raízes em plantas de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

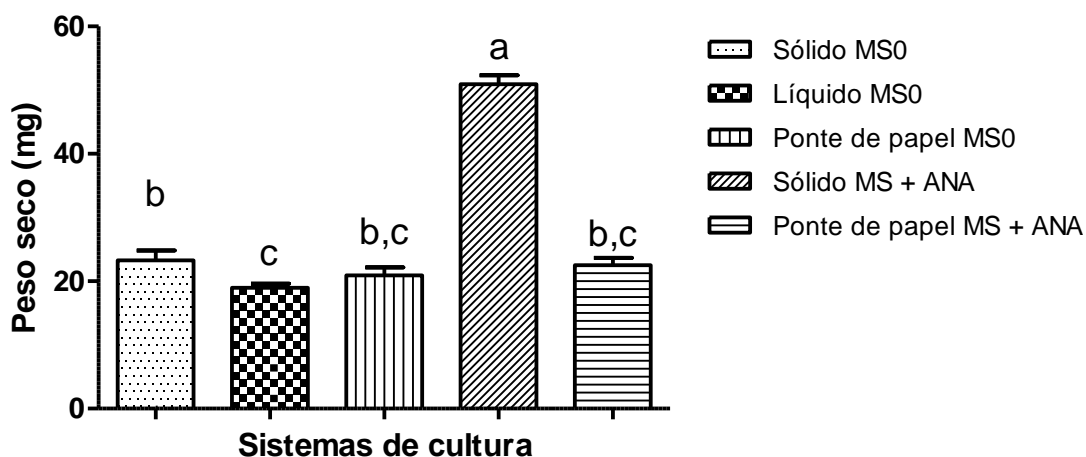


Legenda: (A) Meio sólido MS0, após 60 dias; (B) Ponte de papel de filtro sobre meio líquido MS0, após 45 dias; (C) Meio líquido MS0 sob agitação, após 30 dias; (D) Meio sólido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA, após 60 dias; (E) Ponte de papel de filtro sobre meio líquido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA, após 45 dias; (F) Detalhe do isolamento de plantas e raízes inteiras quando cultivadas sobre ponte de papel de filtro com meio líquido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA, após 45 dias. Barra = 1 cm.

Em meio sólido, a suplementação com ANA otimizou a produção de biomassa quando comparada ao cultivo em MS0 e se mostrou o sistema com maior produção de biomassa de raízes

doadoras de explantes (Figura 15). Com relação ao sistema de ponte de papel de filtro não foram observadas diferenças estatísticas quanto ao acúmulo de biomassa, entre o meio com ou sem a suplementação com o fitorregulador. As culturas mantidas em meio líquido sob agitação foram as que apresentaram menor eficiência quanto ao acúmulo de biomassa.

Figura 15: Biomassa de raízes de plantas cultivadas *in vitro* de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas em diferentes sistemas.



Legenda: Peso seco (mg) das raízes de cultura em meio sólido MS0 após 60 dias (Sólido MS0); raízes de cultura em meio líquido MS0 sob agitação após 30 dias (Líquido MS0); raízes oriundas de ponte de papel de filtro com meio líquido MS0 após 45 dias (Ponte de papel MS0); raízes de cultura em meio sólido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA após 60 dias (Sólido MS + ANA); raízes de cultura sobre ponte de papel de filtro com meio líquido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA após 45 dias (Ponte de papel MS + ANA).

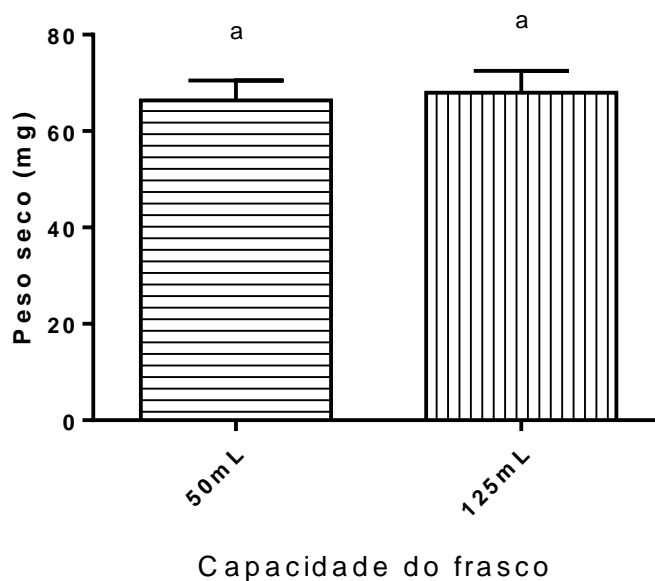
Considerando que as raízes exibiram características morfológicas distintas, todos os sistemas avaliados que apresentaram resposta morfogênica foram selecionados para os experimentos de cultura de raízes.

4.3 Estabelecimento de culturas de raízes adventícias

Culturas de raízes estabelecidas em frascos Erlenmeyer de diferentes capacidades (50 mL e 125 mL), contendo volumes distintos de meio de cultura (30 mL e 50 mL), não apresentaram diferenças estatísticas ($p = 0,5885$) quanto ao acúmulo de biomassa (Figura 16). Em função desses

resultados, foram selecionados para a continuidade do trabalho de cultivo e multiplicação de raízes os frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultura, de modo a otimizar o espaço físico e reduzir os gastos com os insumos do laboratório.

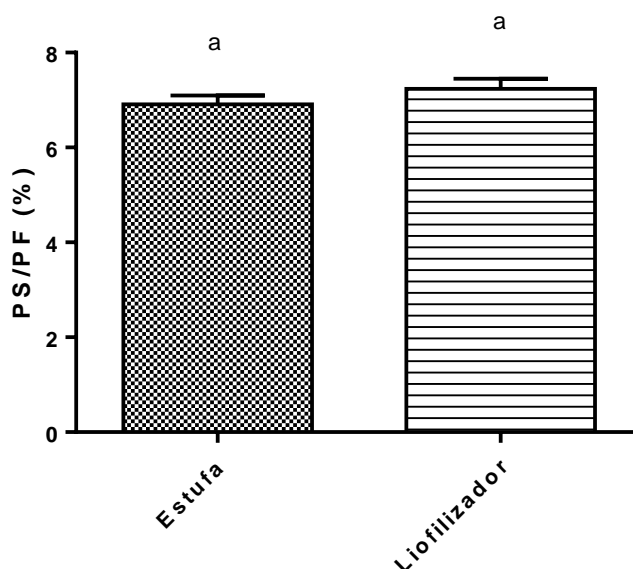
Figura 16: Biomassa de culturas de raízes de *K. pinnata* mantidas em meio MS suplementado com 5 mg.L^{-1} de AIB, após 30 dias em cultivo no escuro.



Legenda: Peso seco (mg) de raízes cultivadas em frascos Erlenmeyers com capacidade de 50 mL (30 mL de meio) e 125 mL (50 mL de meio) não apresentaram diferença significativa ($p = 0,5885$) de acordo com o teste T.

A avaliação entre os métodos para secagem do material para aferição do PS demonstrou não haver diferença estatística ($p = 0,2619$) entre a secagem em estufa e em liofilizador (Figura 17). Dessa forma, sempre que possível foi escolhido o uso do liofilizador, uma vez que este método permite tanto a quantificação do material (PS), quanto sua posterior utilização para produção de extratos.

Figura 17: Relação entre Peso Seco e Peso Fresco de culturas de raízes após secagem em estufa e liofilizador.

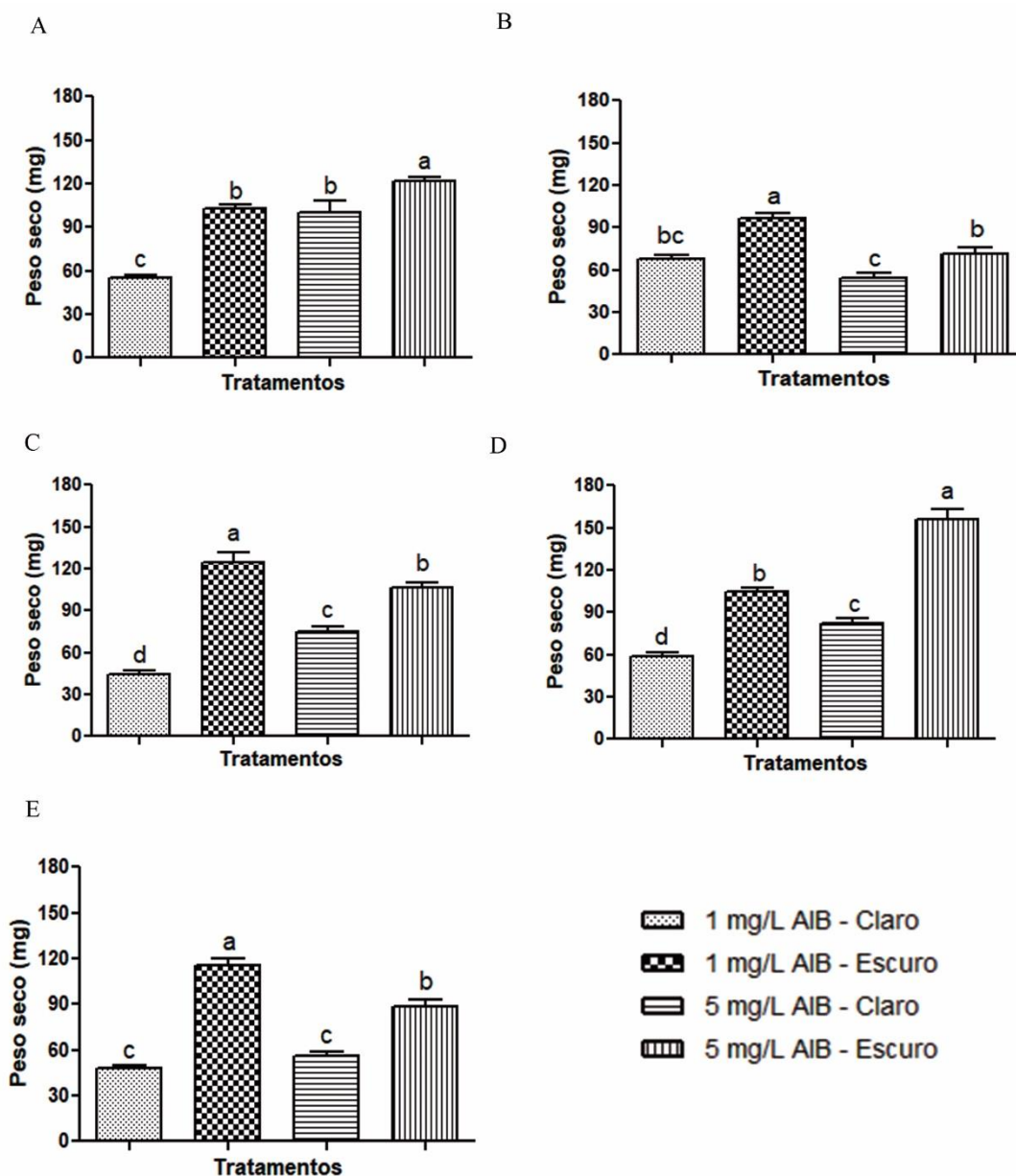


Legenda: Não foi observada diferença estatística empregando Teste T ($p = 0,2619$).

Ao avaliar a influência da luz no crescimento das culturas de raízes, constatou-se que a manutenção na ausência de luz resultou em maior acúmulo de biomassa, independentemente do sistema de cultivo utilizado para a propagação das plantas doadoras dos explantes radiculares na etapa anterior (Figura 18).

Culturas de raízes provenientes de plantas cultivadas nos sistemas meio líquido (MS0) (Figura 18B), ponte de papel (MS0) (Figura 18C) e meio sólido suplementado com $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA (Figura 18D) apresentaram maior acúmulo de biomassa quando mantidas no escuro e na menor concentração de AIB ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Por outro lado, culturas iniciadas com explantes radiculares oriundos de plantas propagadas nos sistemas meio sólido (MS0) (Figura 18A) e ponte de papel sobre meio suplementado com $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA (Figura 18E) mostraram maior acúmulo de biomassa quando mantidas no escuro em meio com $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB.

Figura 18: Acúmulo de biomassa de culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* mantidas em meio MS suplementado com AIB (1 e 5 mg.L⁻¹), após 30 dias de cultivo na presença ou ausência de luz.

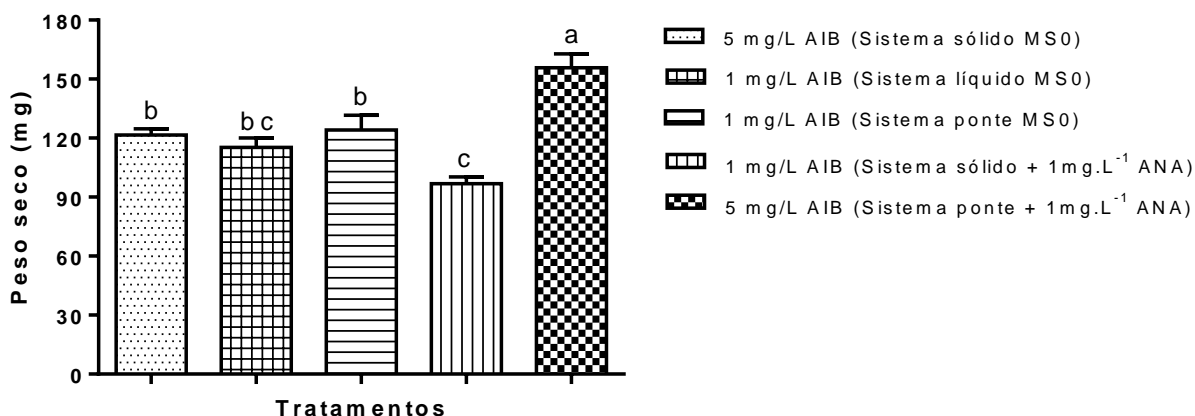


Legenda: Raízes provenientes de plantas cultivadas em diferentes sistemas: (A) meio sólido MS0; (B) meio líquido MS0 sob agitação; (C) ponte de papel sobre meio líquido MS0; (D) meio sólido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA; (E) ponte de papel sobre meio líquido MS + 1 mg.L⁻¹ de ANA.

Para determinar o melhor protocolo de multiplicação das raízes *in vitro* com base nos resultados descritos anteriormente, foi realizada uma análise estatística comparativa das culturas

que alcançaram maior acúmulo de biomassa (Figura 19). A análise dos dados mostrou que culturas de raízes iniciadas de explantes obtidos de plantas mantidas em meio MS0 não apresentaram diferença estatística quanto ao acúmulo de biomassa. Já o meio sólido MS + 1mg.L⁻¹ ANA levou a uma menor proliferação de raízes em cultura. Foi observado um significativo aumento da capacidade de multiplicação das raízes obtidas de plantas estabelecidas sobre ponte de papel em meio MS + 1mg.L⁻¹ ANA.

Figura 19: Análise comparativa das culturas de raízes com maior acúmulo de biomassa, provenientes de plantas de *Kalanchoe pinnata* mantidas em diferentes sistemas *in vitro*, após 30 dias de cultivo no escuro em meio MS contendo AIB.

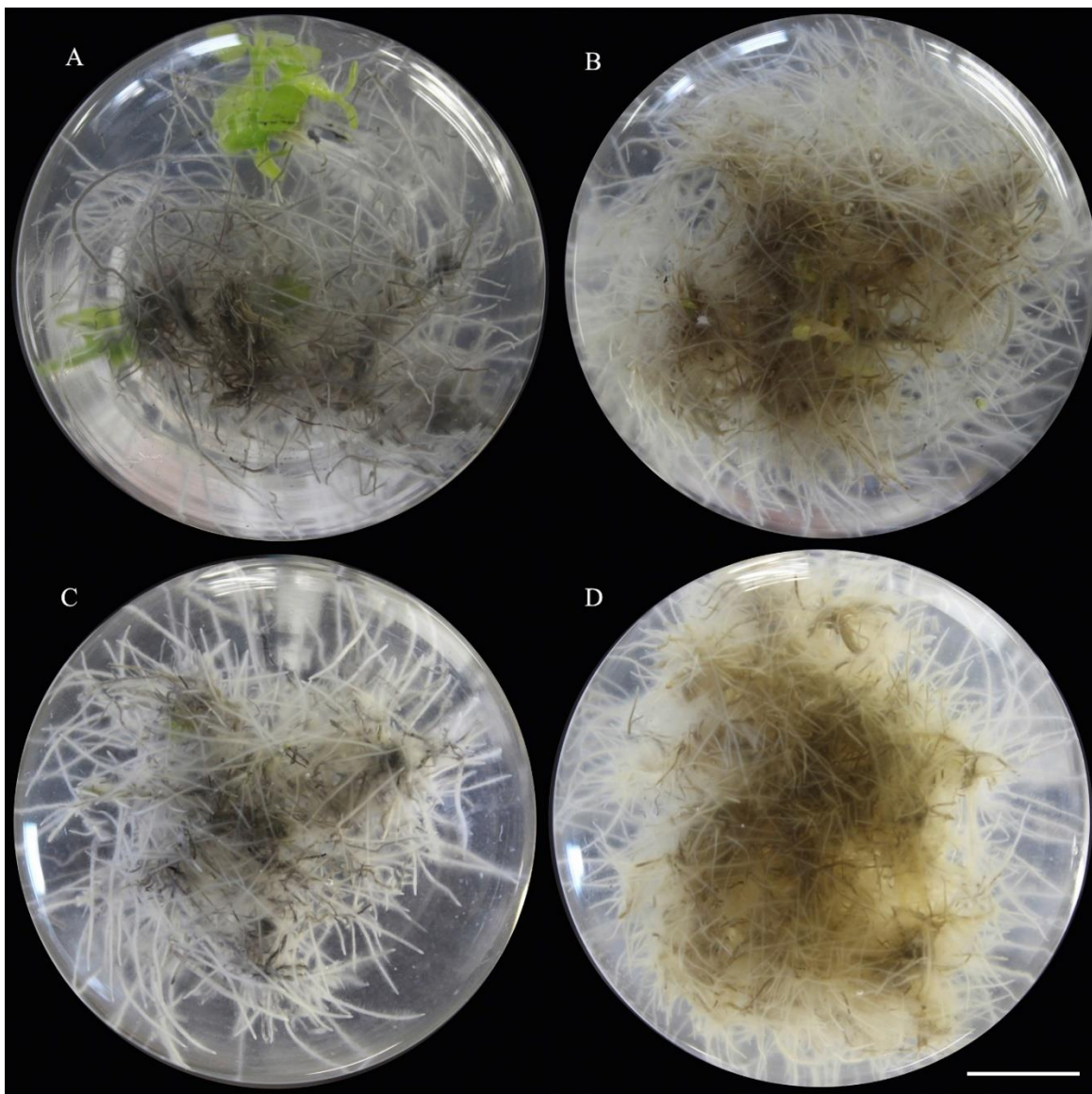


A condição luminosa influenciou na coloração de forma semelhante para todos os tratamentos. Culturas mantidas no claro (Figuras 20, 21, 22, 23 e 24 - A e C) apresentaram coloração grafite com pontas esbranquiçadas característica das plantas matrizes, enquanto as plantas mantidas no escuro (Figuras 20, 21, 22, 23 e 24 - B e D) exibiram coloração castanho-amarronzada.

Já o sistema de produção de plantas matrizes influenciou na morfologia das mesmas. O meio sólido MS0 gerou culturas que, quando mantidas na presença de luz na concentração mais baixa de AIB (1 mg.L⁻¹ AIB) (Figura 20A), apresentaram condição favorável à regeneração de parte aérea quando deixadas mínimas porções de caule ou folha. Raízes mantidas no escuro (Figuras 20B e 20D) eram mais finas que as no claro. O meio líquido MS0 levou à produção de raízes mais curtas (Figura 21). Plantas sobre ponte de papel de filtro em meio MS0 produziram culturas em 5 mg.L⁻¹ AIB no claro (Figura 22C) mais alongadas que as demais. O meio sólido MS + 1 mg.L⁻¹ ANA produziu raízes que, no claro (Figura 23A e 23C), eram compridas, enquanto as

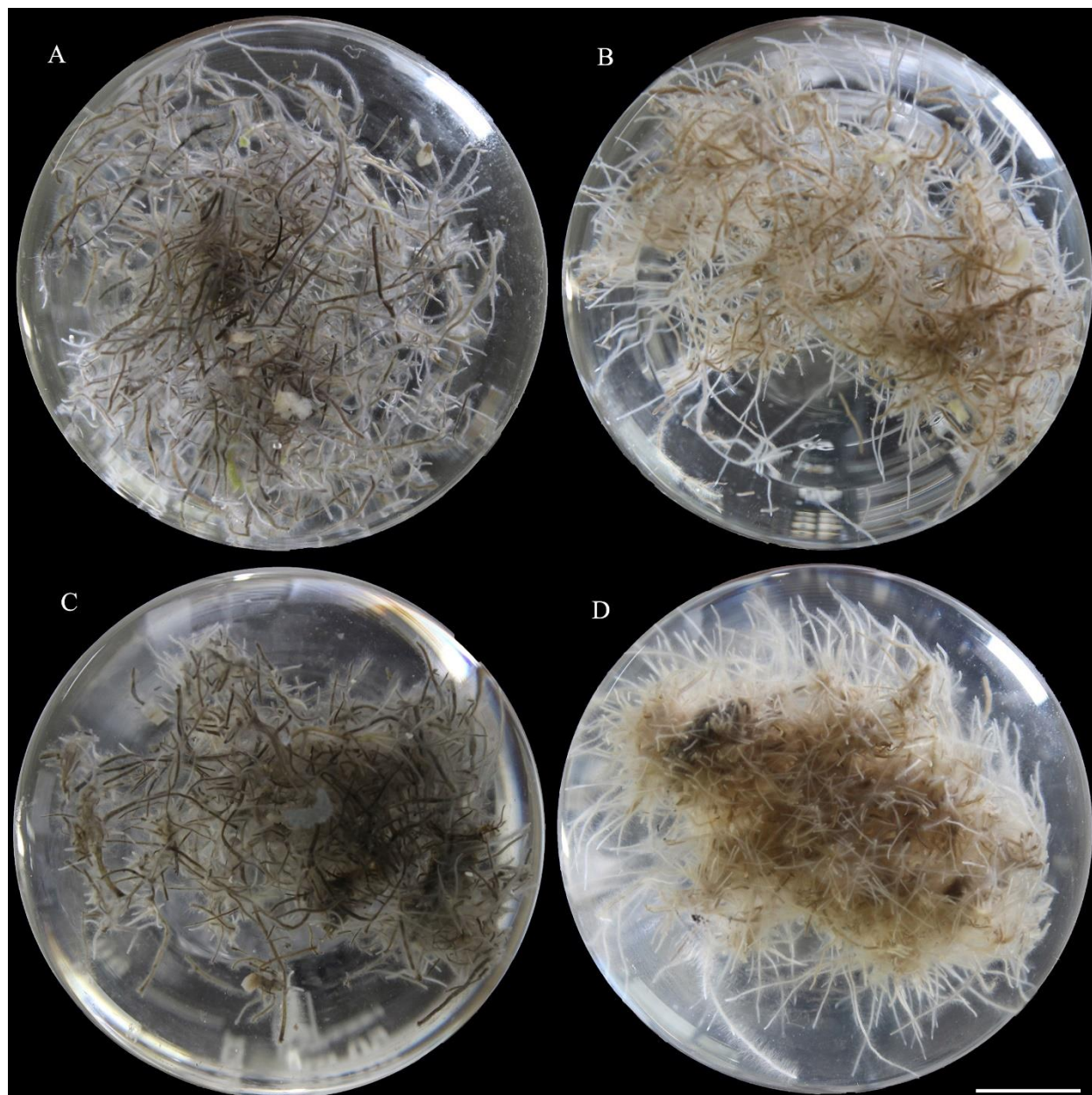
mantidas no escuro (Figura 23B e 23D) eram curtas. As culturas de raízes estabelecidas a partir de explantes oriundos de plantas cultivadas sobre ponte de papel em meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA eram bastante alongadas (Figura 24).

Figura 20: Culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas em meio sólido MS0, após 30 dias de cultivo.



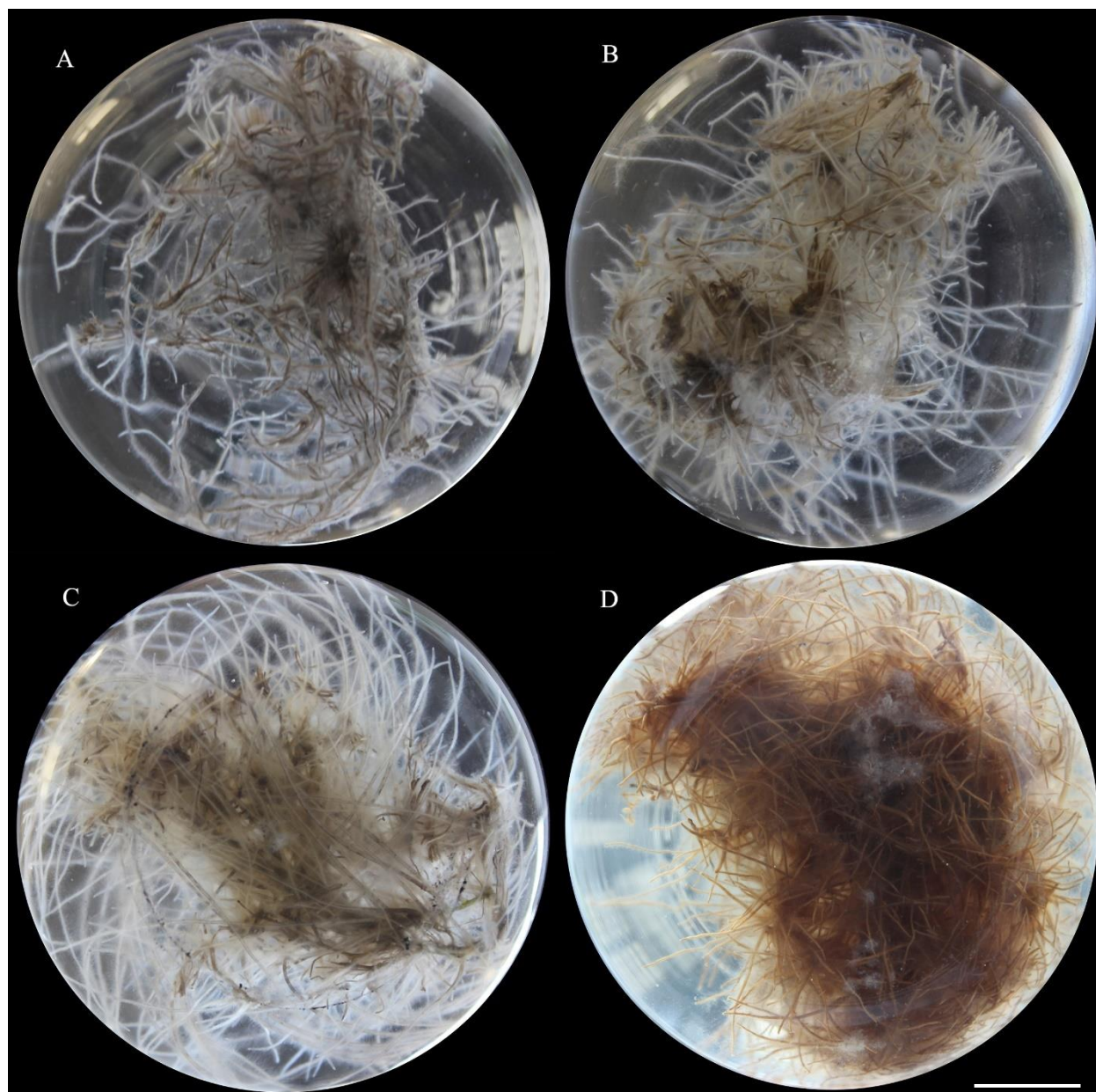
Legenda: Culturas mantidas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB e condições luminosas: (A) 1 mg.L⁻¹ AIB no claro; (B) 1 mg.L⁻¹ AIB no escuro; (C) 5 mg.L⁻¹ AIB no claro e (D) 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro. Barra = 1cm.

Figura 21: Culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas em meio MS0 líquido, após 30 dias de cultivo.



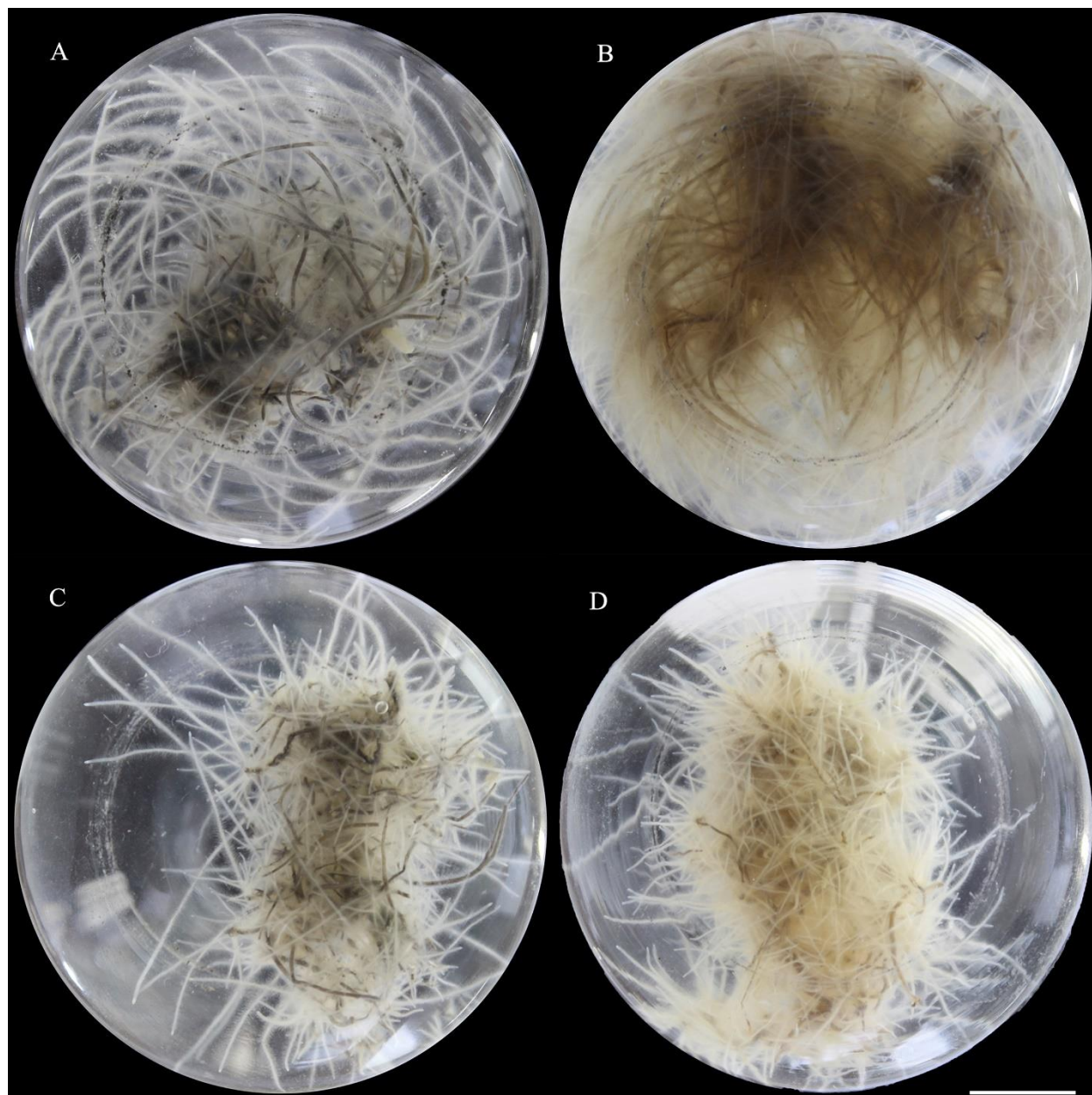
Legenda: Culturas mantidas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB e condições luminosas: (A) 1 mg.L⁻¹ AIB no claro; (B) 1 mg.L⁻¹ AIB no escuro; (C) 5 mg.L⁻¹ AIB no claro e (D) 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro. Barra = 1cm.

Figura 22: Culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas sobre ponte de papel de filtro em meio MS0, após 30 dias de cultivo.



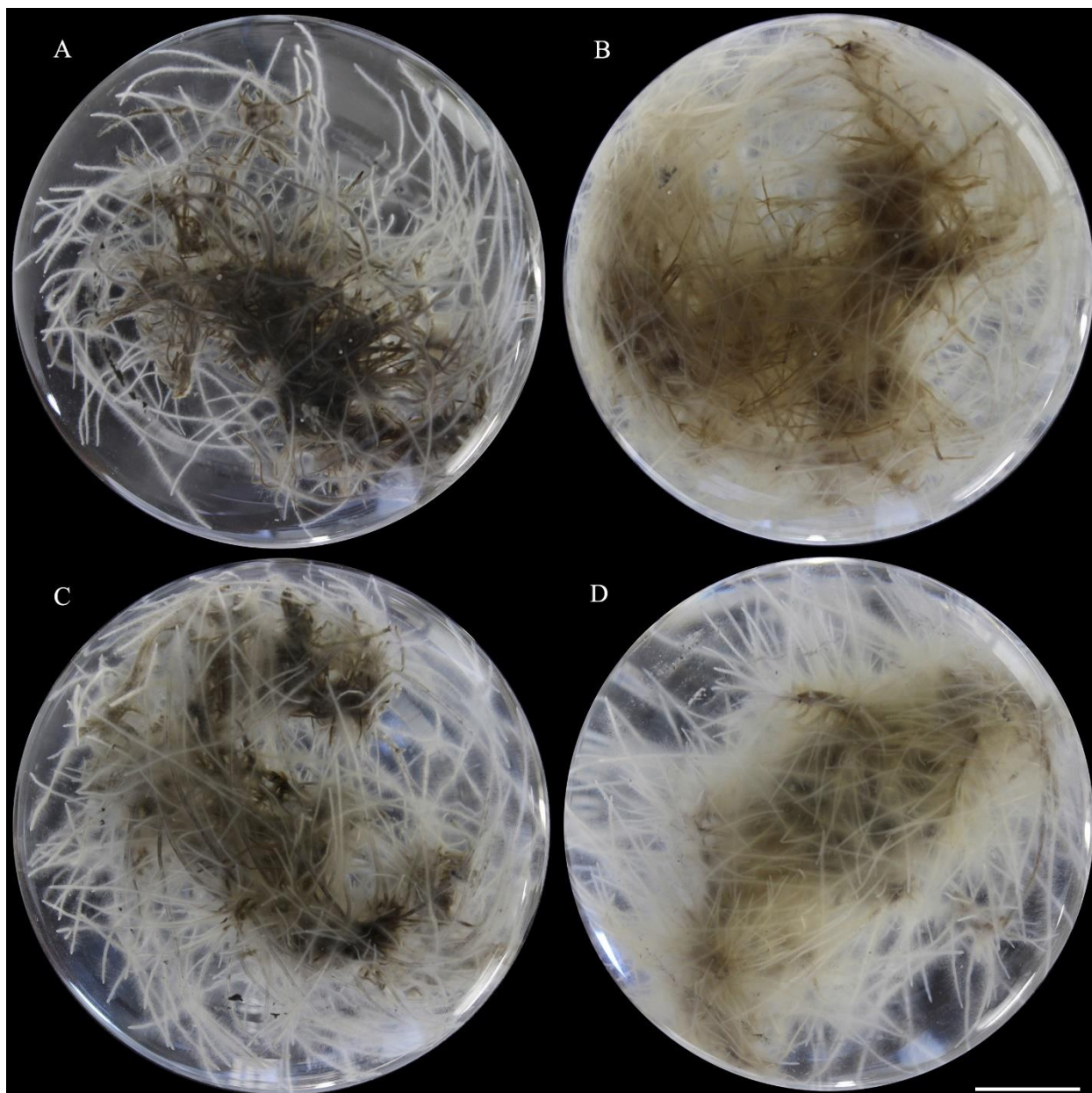
Legenda: Culturas mantidas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB e condições luminosas: (A) 1 mg.L⁻¹ AIB no claro; (B) 1 mg.L⁻¹ AIB no escuro; (C) 5 mg.L⁻¹ AIB no claro e (D) 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro. Barra = 1cm.

Figura 23: Culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas em meio sólido MS + 1 mg.L⁻¹ ANA, após 30 dias de cultivo.



Legenda: Culturas mantidas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB e condições luminosas: (A) 1 mg.L⁻¹ AIB no claro; (B) 1 mg.L⁻¹ AIB no escuro; (C) 5 mg.L⁻¹ AIB no claro e (D) 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro. Barra = 1cm.

Figura 24: Culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas sobre ponte de papel de filtro em meio MS + + 1 mg.L⁻¹ ANA, após 30 dias de cultivo.

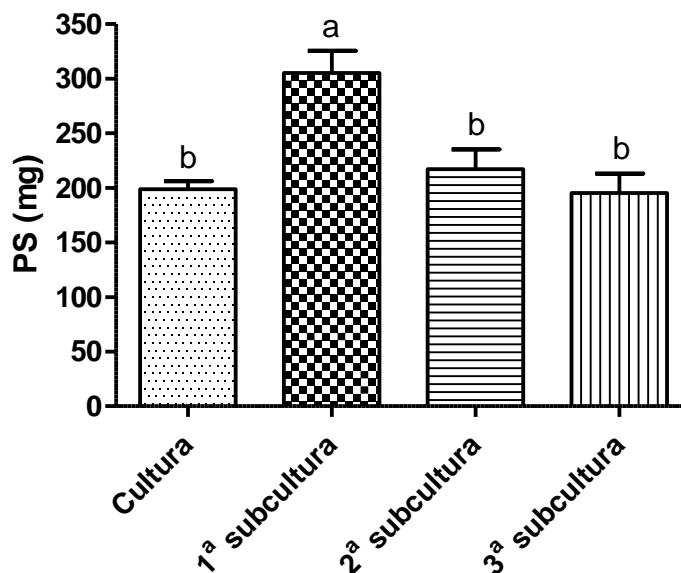


Legenda: Culturas mantidas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB e condições luminosas: (A) 1 mg.L⁻¹ AIB no claro; (B) 1 mg.L⁻¹ AIB no escuro; (C) 5 mg.L⁻¹ AIB no claro e (D) 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro. Barra = 1cm.

Para a determinação da curva de subculturas foram utilizadas as raízes cultivadas em meio líquido MS + 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro produzidas a partir de matrizes cultivadas em sistema de ponte de papel sobre meio líquido MS + 1 mg.L⁻¹ ANA. A primeira subcultura apresentou melhores

taxas de proliferação que a cultura e que suas subculturas posteriores alcançando em média 305,3 mg (PS) por frasco Erlenmeyer (Figura 25).

Figura 25: Capacidade de multiplicação de culturas de raízes de *K. pinnata* ao longo de subculturas.

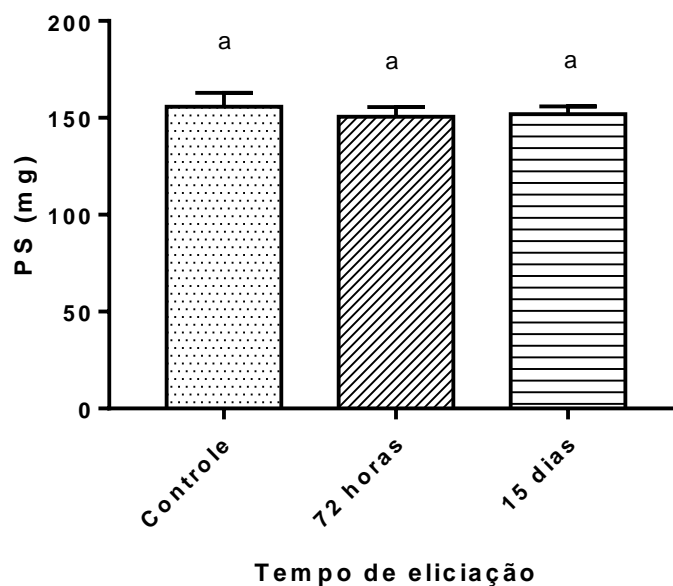


Legenda: Culturas de raízes em meio líquido MS + 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro após 30 dias de cultivo, que foram subcultivadas com igual peso fresco de explante inicial (0,5 g), mantidas em iguais condições de cultura. $p < 0,05$.

4.4 Eliciação das culturas de raízes

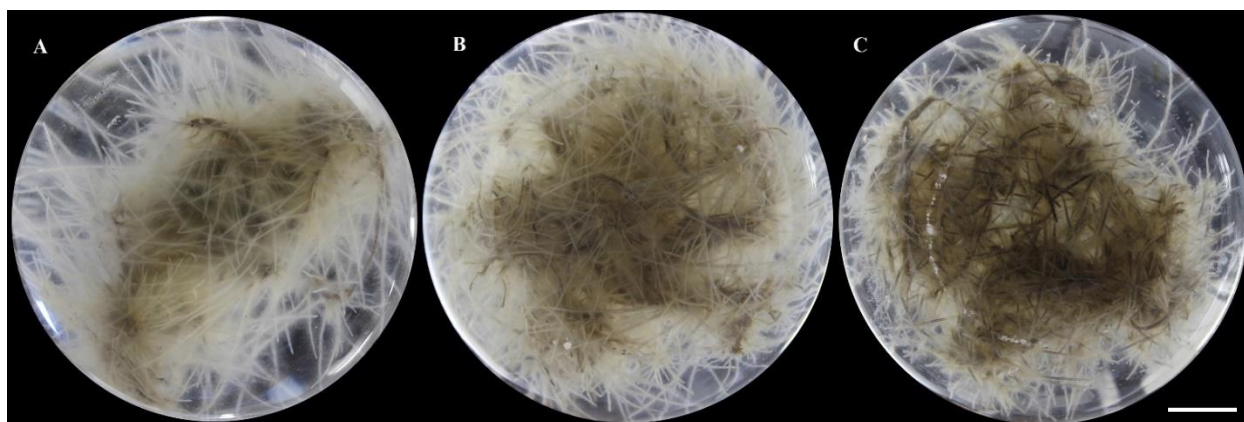
As culturas eliciadas não apresentaram alteração de acúmulo de biomassa quando comparadas ao tratamento controle, na ausência do eliciador ($p = 0,7974$) (Figura 26). Apesar disso, visualmente, as raízes eliciadas apresentaram alterações de coloração em relação ao controle, sendo mais escuras, com mais regiões grafites (Figura 27).

Figura 26: Biomassa de culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* mantidas em meio MS + 5 mg.L⁻¹ de AIB, eliciadas com 100μM de MeJa por diferentes tempos, após 30 dias de cultivo no escuro.



Legenda: Não foi observada diferença estatística de acordo com o teste de Tukey ($p = 0,7974$).

Figura 27: Culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata* estabelecidas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas cultivadas em ponte de papel sobre meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA e eliciadas com 100μM de MeJa, após 30 dias de cultivo em meio MS + 5 mg.L⁻¹ de AIB no escuro.



Legenda: (A) Cultura de raízes controle; (B) eliciadas por 72 horas e (C) 15 dias. Barra = 1 cm.

4.5 Análises fitoquímicas

Os dados relativos ao rendimento (Tabela 2) mostraram que culturas de raízes mantidas 30 dias em meio MS + 5 mg.L⁻¹ de AIB derivadas do sistema de ponte de papel sobre meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA foram as que apresentaram maior valor (26,67%), com um total de 0,6147 g de resíduo ao final do processo.

Tabela 2: Rendimento dos extratos etanólicos de material cultivado *in vivo* e produzido *in vitro* de *Kalanchoe pinnata*.

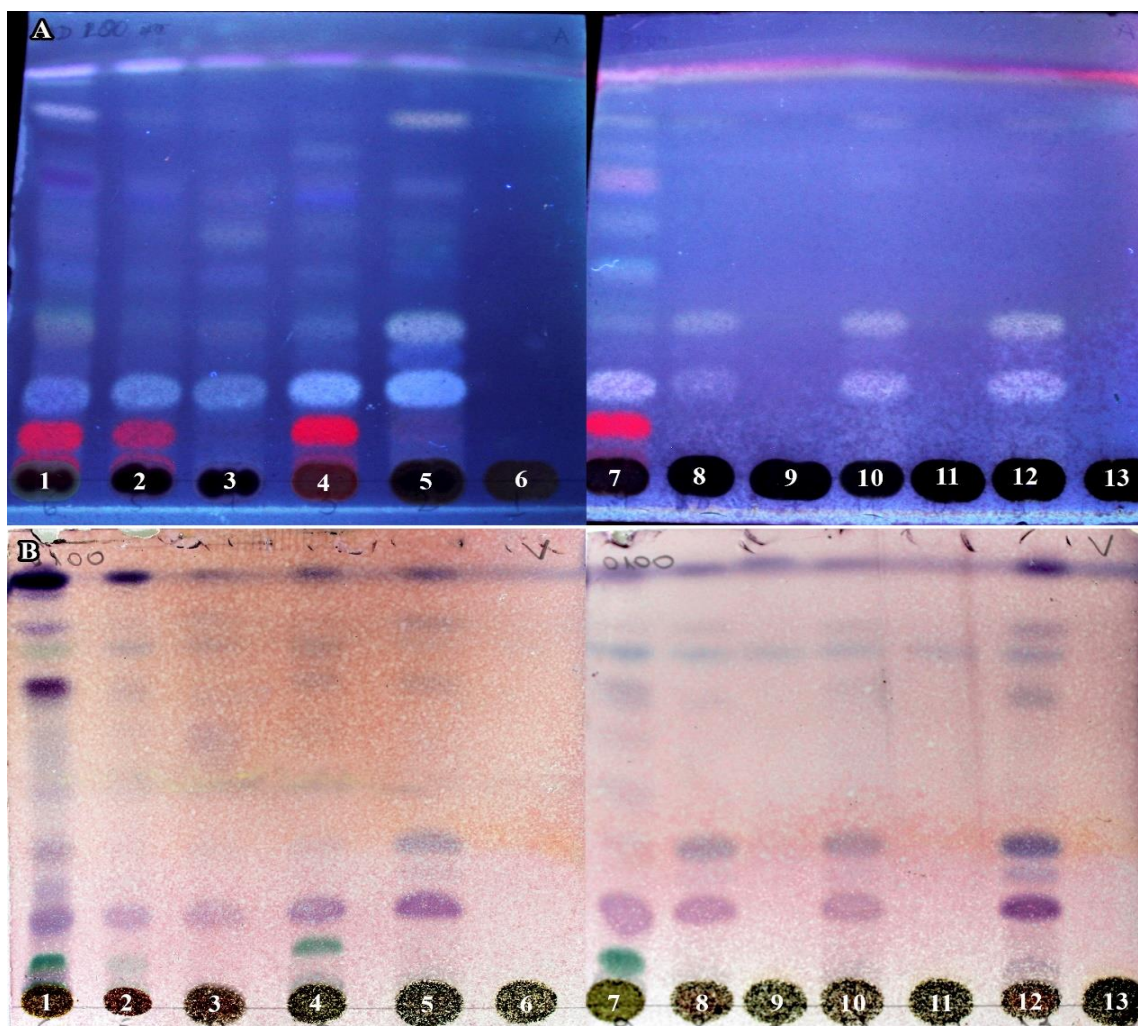
Condição	Sistema	Eliciação	Material	Peso Seco (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)		
<i>In vivo</i>	Terra preta	-	Folha	2,0517	0,1987	9,68		
			Caule	2,0794	0,0423	2,03		
			Raiz	2,0477	0,2967	14,49		
<i>In vitro</i>	MS0 sólido	-	Parte aérea	2,0195	0,2091	10,35		
			Meio de cultura	2,0098	0,544	27,07		
			Cultura de raízes	1,948	0,3494	17,94		
	Ponte de Papel MS + 1 mg.L ⁻¹ de ANA	72 horas	-	Parte aérea	1,7078	0,3654	21,40	
				Meio de cultura	2,2532	0,4149	18,41	
				Cultura de raízes	2,3051	0,6147	26,67	
				Meio de cultura	2,2934	0,4041	17,62	
				Cultura de raízes	2,4138	0,4509	18,68	
				15 dias	Meio de cultura	2,38	0,3222	13,54
					Cultura de raízes	2,2048	0,405	18,37

Legenda: Cálculo de rendimento de extração feito por resíduo (g)/PS (g)*100.

4.5.1 Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)

Das cromatografias com polaridade crescente realizadas para triagem, a fase móvel de diclorometano 100% foi a que melhor indicou a presença de substâncias da classe dos terpenos. Todos os extratos obtidos a partir de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*, com exceção dos de meio de cultura, apresentaram manchas características da classe. Foi possível observar que culturas de raízes eliciadas por 15 dias com MeJa apresentaram padrão de manchas semelhante ao de folhas *in vivo*. A presença de terpenos foi caracterizada pela ocorrência concomitante de manchas azuis em análise sob luz UV (365nm), após revelação com H₂SO₄ 10% (Figura 28A), e de manchas roxas visualizadas sob luz visível após revelação com vanilina (Figura 28B).

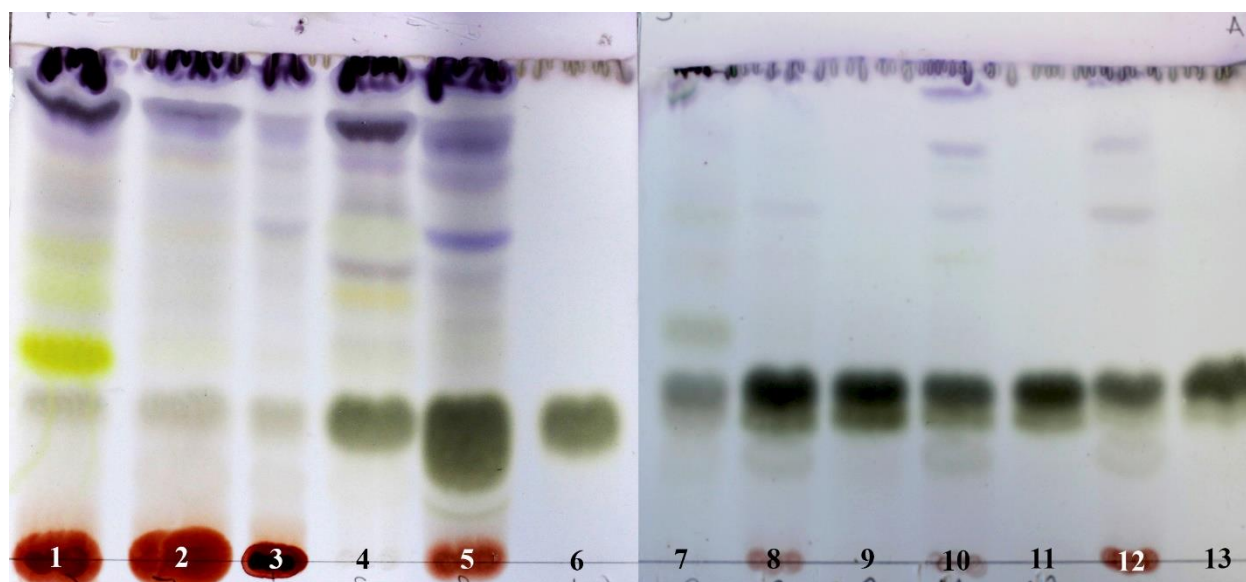
Figura 28: Cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciando a presença de terpenos nos extratos etanólicos de *Kalanchoe pinnata* cultivada *in vivo* e *in vitro* em meio de cultura MS.



Legenda: (A) Placa revelada com H_2SO_4 10% analisada sob luz UV em 365 nm e (B) revelada com vanilina observada sob luz visível. Extratos, da esquerda para a direita: *in vivo*: (1) folha, (2) caule, (3) raiz; *in vitro*: (4) parte aérea em meio sólido MS0, (5) cultura de raízes em 5 mg.L^{-1} AIB no escuro (matriz em meio sólido MS0), (6) meio de cultura com 5 mg.L^{-1} AIB da cultura das raízes no escuro (matriz em meio sólido MS0), (7) parte aérea em ponte de papel com 1 mg.L^{-1} ANA, (8) cultura de raízes em 5 mg.L^{-1} AIB no escuro (matriz em ponte de papel com 1 mg.L^{-1} ANA), (9) meio de cultura com 5 mg.L^{-1} AIB da cultura das raízes no escuro (matriz em ponte de papel com 1 mg.L^{-1} ANA), (10) cultura de raízes em 5 mg.L^{-1} AIB no escuro eliciadas por 3 dias com $100 \mu\text{M}$ MeJa, (11) meio de cultura com 5 mg.L^{-1} AIB da cultura das raízes eliciadas por 3 dias com $100 \mu\text{M}$ MeJa, (12) cultura de raízes em 5 mg.L^{-1} AIB no escuro eliciadas por 15 dias com $100 \mu\text{M}$ MeJa, (13) meio de cultura com 5 mg.L^{-1} AIB da cultura das raízes eliciadas por 15 dias com $100 \mu\text{M}$ MeJa. A fase móvel utilizada foi diclorometano 100%.

Os extratos também apresentaram substâncias da classe das saponinas, caracterizadas pela presença de manchas de coloração marrom quando visualizadas sob luz visível após revelação com anisaldeído sulfúrico. A presença de substâncias desta classe foi observada em todos os extratos avaliados, com destaque para aqueles obtidos a partir de plantas estabelecidas *in vitro*, inclusive meios de cultura (Figura 29).

Figura 29: Cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciando a presença de saponinas nos extratos etanólicos de *Kalanchoe pinnata*.

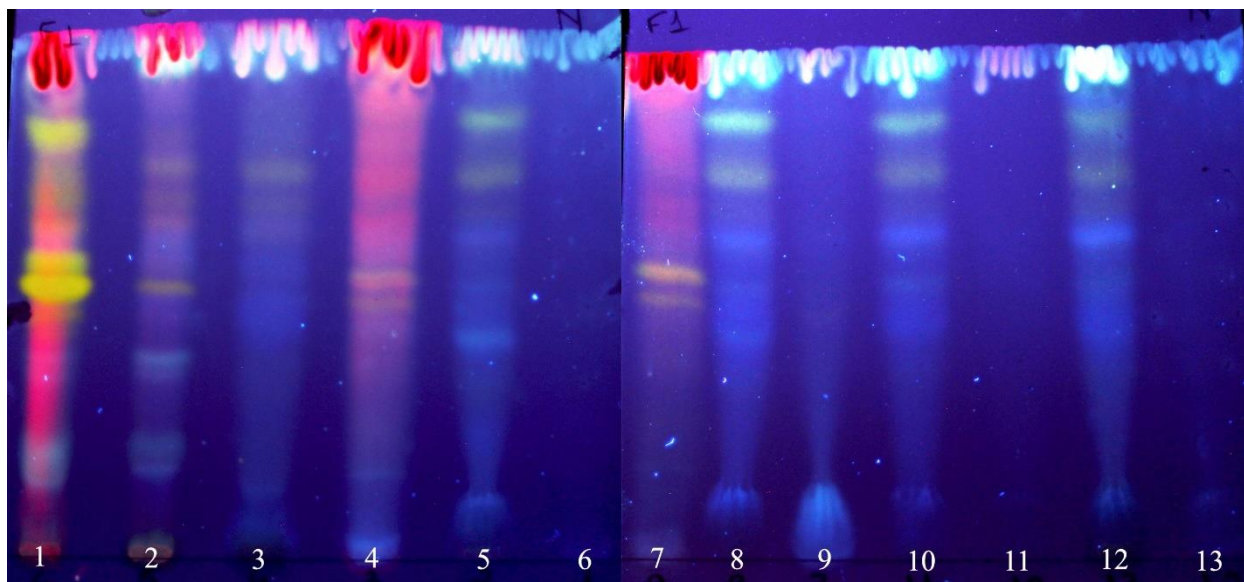


Legenda: Extratos, da esquerda para a direita: *in vivo*: (1) folha, (2) caule, (3) raiz; *in vitro*: (4) parte aérea em meio sólido MS0, (5) cultura de raízes em 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro (matriz em meio sólido MS0), (6) meio de cultura com 5 mg.L⁻¹ AIB da cultura das raízes no escuro (matriz em meio sólido MS0), (7) parte aérea em ponte de papel com 1 mg.L⁻¹ ANA, (8) cultura de raízes em 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro (matriz em ponte de papel com 1 mg.L⁻¹ ANA), (9) meio de cultura com 5 mg.L⁻¹ AIB da cultura das raízes no escuro (matriz em ponte de papel com 1 mg.L⁻¹ ANA), (10) cultura de raízes em 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro eliciadas por 3 dias com 100 µM MeJa, (11) meio de cultura com 5 mg.L⁻¹ AIB da cultura das raízes eliciadas por 3 dias com 100 µM MeJa, (12) cultura de raízes em 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro eliciadas por 15 dias com 100 µM MeJa, (13) meio de cultura com 5 mg.L⁻¹ AIB da cultura das raízes eliciadas por 15 dias com 100 µM MeJa. A fase móvel utilizada foi específica para saponinas, conforme descrito no Quadro 2.

As análises em CCD também indicaram a presença de substâncias da classe dos flavonoides nos extratos de *K. pinnata*. Essas substâncias foram detectadas pela ocorrência de manchas de coloração amarelada quando as placas foram visualizadas sob luz UV (365 nm), após revelação com NP-PEG. A ocorrência de flavonoides foi observada em todos os extratos de plantas

cultivadas *in vivo*, com destaque para as folhas, além de extratos de parte aérea de plantas *in vitro* e nas culturas de raízes (Figura 30).

Figura 30: Cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciando a presença de flavonoides nos extratos etanólicos de *Kalanchoe pinnata*.



Legenda: Extratos, da esquerda para a direita: *in vivo*: (1) folha, (2) caule, (3) raiz; *in vitro*: (4) parte aérea em meio sólido MS0, (5) cultura de raízes em 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro (matriz em meio sólido MS0), (6) meio de cultura com 5 mg.L⁻¹ AIB da cultura das raízes no escuro (matriz em meio sólido MS0), (7) parte aérea em ponte de papel com 1 mg.L⁻¹ ANA, (8) cultura de raízes em 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro (matriz em ponte de papel com 1 mg.L⁻¹ ANA), (9) meio de cultura com 5 mg.L⁻¹ AIB da cultura das raízes no escuro (matriz em ponte de papel com 1 mg.L⁻¹ ANA), (10) cultura de raízes em 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro eliciadas por 3 dias com 100 µM MeJa, (11) meio de cultura com 5 mg.L⁻¹ AIB da cultura das raízes eliciadas por 3 dias com 100 µM MeJa, (12) cultura de raízes em 5 mg.L⁻¹ AIB no escuro eliciadas por 15 dias com 100 µM MeJa, (13) meio de cultura com 5 mg.L⁻¹ AIB da cultura das raízes eliciadas por 15 dias com 100 µM MeJa. A fase móvel utilizada foi específica para flavonoides, conforme descrito no Quadro 2.

4.6 Avaliação da eficiência, capacidade produtiva e produtividade dos sistemas de produção de cultura de raízes

Na produção de plantas matrizes *in vitro*, o uso do fitorregulador ANA promoveu um crescimento mais acelerado, permitindo a redução do tempo de cultivo das plantas matrizes em 15 dias quando comparado ao meio MS0 (Tabela 3). Devido ao menor volume do frasco, o sistema em meio líquido sob agitação promoveu um crescimento em que o frasco se encontrava em sua capacidade máxima de suporte após 30 dias. Embora tenham resultado em menor biomassa (Figura 15), as culturas mantidas no sistema de ponte de papel apresentaram a vantagem de facilitar a manipulação e a coleta das raízes, com redução do tempo de isolamento do material em aproximadamente quatro vezes em comparação com meio sólido e oito vezes comparado ao meio líquido sob agitação. Além disso, este sistema proporcionou maior precisão na pesagem do material em função de não haver resíduos de meio de cultura presos às raízes, como ocorre quando é usado o meio solidificado. De acordo com a resposta dos explantes oriundos dos diferentes sistemas quando iniciadas as culturas de raízes, tem-se que, para obtenção de 1 g (PS) de cultura de raízes, é necessária uma menor quantidade de peso fresco de explantes, e em consequência, uma redução do número de frascos de planta matriz e de meio de cultura quando utilizado o sistema de ponte de papel de filtro sobre meio suplementado com 1 mg.L⁻¹ de ANA.

Tabela 3: Avaliação da eficiência de diferentes sistemas de cultura para obtenção de 1g (PS) de cultura de raízes.

Sistema	Meio	Matriz regenera novas matrizes	Ágar	Tempo de cultivo da planta matriz (dias)	Tempo para isolamento de explantes (min)	PF (g) de explante necessário	Nº de frascos de cultura de raízes	Meio de cultura (mL)
Sólido	MS0	não	sim	60	11,26	4,11	8	336,69
	ANA	sim	sim	45	11,81	5,14	10	368,41
Líquido	MS0	não	não	30	23,79	4,43	9	354,50
Ponte de Papel	MS0	não	não	60	4,79	4,16	8	320,21
	ANA	sim	não	45	2,91	3,21	6	262,83

O sistema de ponte de papel sobre meio suplementado com ANA levou a um aumento considerável da capacidade produtiva disponível (CPD), sendo aproximadamente 8 (oito) vezes maior que o sistema em meio líquido sob agitação e 4 (quatro) vezes maior que os sistemas em meio sólido (Tabela 4). Muzitano e colaboradores (2006), trabalhando com extratos aquosos de *K. pinnata in vivo* relataram uma eficiência de isolamento de flavonoides a partir da purificação de um extrato bruto de 0,112%. Utilizando esse dado como base, foi possível estimar a quantidade de

flavonoides produzidos por cada sistema em determinado tempo, onde o sistema de ponte de papel se mostra superior em 387 a 817%.

Tabela 4: Capacidade produtiva disponível (CPD) de raízes e estimativa da CPD de extrato bruto e flavonoides isolados de *K. pinnata* por dia de trabalho (8h/dia) para cada sistema de produção empregado.

Sistema	Meio	PS Raiz (g)	Resíduo da extração (g)	Flavonoides isolados (mg)
Sólido	MS0	42,63	8,53	9,55
	ANA	40,65	8,13	9,10
Líquido	MS0	20,17	4,03	4,52
Ponte de Papel	MS0	100,28	20,06	22,46
	ANA	164,86	32,97	36,93

Legenda: Para os cálculos foram considerados tempo de excisão de explantes obtidos para cada sistema, estimativa do rendimento médio de extração de culturas de raízes obtidas de 20% e estimativa de rendimento de isolamento de flavonoides de 0,112% conforme Muzitano e colaboradores (2006).

Em relação à produtividade, o sistema ponte de papel sobre meio suplementado com ANA apresentou a maior produtividade de biomassa pelas culturas de raízes dentre os sistemas e meios avaliados (Tabela 5).

Tabela 5: Produtividade dos diferentes sistemas de cultura.

Sistema	Meio	Produtividade
Sólido	MS0	0,243
	ANA	0,195
Líquido	MS0	0,226
Ponte de Papel	MS0	0,240
	ANA	0,311

Legenda: Produtividade em g de cultura de raiz (PS)/g de explante radicular (PF).

5 DISCUSSÃO

A inoculação de explantes provenientes de plantas *in vivo* para o ambiente *in vitro* é uma etapa de suma importância, uma vez que o tempo e os insumos gastos na etapa de descontaminação influenciam diretamente nos custos do processo, assim como na qualidade do material cultivado *in vitro*. Em resultados prévios (dados não mostrados), foram observadas altas taxas de contaminação e oxidação dos explantes. Desta forma, neste trabalho foram avaliadas diferentes substâncias para assepsia do material, buscando as maiores taxas de regeneração juntamente com redução da oxidação dos explantes. As substâncias mais utilizadas para o controle de patógenos nos trabalhos de CTV são etanol 70%, hipoclorito de sódio e, em alguns casos, antimicrobianos (VELTILARI; QUISEN, 2012). As concentrações das soluções de descontaminação e o tempo de exposição variam de acordo com o material vegetal e a espécie estudada, havendo necessidade de ajustes de protocolo e avaliação das condições mais adequadas para obtenção de altas taxas de descontaminação e de resposta morfogênica positiva (FERREIRA et al., 2009). No presente estudo, o uso de hipoclorito de sódio a 2%, sua associação com Tween 80[®] e o uso de PPM promoveram a descontaminação do material, porém as maiores taxas de regeneração dos explantes de *K. pinnata* foram obtidas empregando-se apenas hipoclorito de sódio a 2%, não diferindo estatisticamente do tratamento com hipoclorito e Tween 80[®] com posterior inoculação em meio com PPM. Pereira e colaboradores (2011) constataram, ao testar cinco diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, que a melhor porcentagem de descontaminação associada a não oxidação dos tecidos de *Musa sp.* foi alcançada com o uso de 2% de cloro ativo. Alguns trabalhos relatam protocolos para descontaminação de tecidos que aparentemente não são tão delicados, à semelhança do observado em *K. pinnata*. A imersão em água com detergente por 15 min, seguida de 5 minutos em hipoclorito de sódio e posterior lavagem com etanol 70% garantiu a assepsia de explantes para inoculação *in vitro* da espécie (LEAL-COSTA et al., 2010). Sementes de *K. blossfeldiana* foram tratadas com etanol 70% por 15 segundos, seguido de 30 minutos de hipoclorito de sódio a 1% (AIDA; SHIBATA, 1996). Para *Rhodiola imbricata*, também da família Crassulaceae, foram necessários 2 minutos em etanol 70% seguidos de 10-15 minutos de hipoclorito de sódio a 10%, e posterior lavagem com antibióticos (KAPOOR et al., 2018).

Além da contaminação, outro problema que comumente ocorre durante a etapa de isolamento dos explantes é a oxidação, que normalmente é devida à liberação de compostos

fenólicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). No presente trabalho, foi observado que o tratamento apenas com hipoclorito a 2% promoveu as menores taxas de oxidação. O Tween 80[®] é uma substância tensoativa com efeitos surfactantes, permitindo um maior contato das soluções descontaminantes com o material (ANDRADE et al., 2005), sendo utilizado frequentemente em concentrações entre 0,01% e 0,05%. É possível que seu uso associado a um tratamento de descontaminação prolongado leve a uma superexposição dos tecidos, havendo aumento da oxidação e morte dos mesmos, quando comparado a um tratamento já eficiente apenas com o uso de hipoclorito de sódio. Além disso, o Tween 80[®], por aumentar o poder de penetração do agente descontaminante, pode favorecer a lesão dos tecidos. O processo de oxidação também foi observado no presente trabalho com o uso de etanol nos protocolos de descontaminação, o que pode decorrer da desidratação do tecido, como ressaltado por Andrade e colaboradores (2005). Etanol e hipoclorito são substâncias eficientes para eliminar contaminações exógenas, porém não são eficazes para contaminações endofíticas (VIANNA et al., 1997). Dessa forma, o uso da solução de PPM é indicado para impedir a germinação de esporos tanto de bactérias quanto de fungos, funcionando como bioestático e biocida, e em altas concentrações sendo capaz de eliminar contaminações endógenas (Plant Cell Technology - <http://www.plantcelltechnology.com/plant-preservative-mixture-ppm/>). Na descontaminação dos explantes de *K. pinnata*, seu uso propiciou uma diminuição nas taxas de contaminação, quando comparado ao tratamento sem a sua adição, porém também reduziu a taxa de regeneração.

Além do uso de substâncias para descontaminação, um importante procedimento para facilitar a assepsia do material é o emprego de práticas preventivas durante a manutenção das plantas matrizes (VELTILARI; QUISEN, 2012). A produção do material em telados ou casas de vegetação permite o controle de irrigação, substrato e pragas, e, uma vez que o material apresente condições fitossanitárias melhores, a etapa de descontaminação pode ser mais simples, menos dispendiosa e menos tóxica à planta. Neste trabalho, as plantas matrizes cultivadas *in vivo* foram mantidas em telado, com regas frequentes, acesso a luz solar, com controle de pragas, sem contato direto com outras plantas ou ervas daninhas, sendo consideradas em bom estado fitossanitário, o que facilitou a descontaminação do material para inoculação *in vitro*, permitindo a utilização apenas de hipoclorito de sódio 2% comercial, tornando o processo mais simples, rápido e econômico, sem a necessidade do uso de outros aditivos no meio de cultura, como antibióticos e antifúngicos.

Neste trabalho, foram avaliados diferentes sistemas de cultura de plantas produzidas *in vitro* (meio sólido, meio líquido sob agitação e meio sob ponte de papel) combinados com duas formulações do meio de cultura (MS0 e MS + 5 mg.L⁻¹ ANA) para determinar: (1) a melhor condição para obtenção de explantes foliares para manutenção de estoque de plantas *in vitro* e (2) a condição com maior produção de biomassa de raízes, considerando que foram as fontes de explantes radiculares para a etapa de cultura de raízes.

O meio líquido com MS0 em contato direto com a planta levou a condições de estresse, apresentando aspectos relacionados à hiperidricidade, como folhas com aspecto translúcido, facilmente quebráveis, grossas, frágeis e alongadas (PALMA et al., 2011). A cultura *in vitro* pode levar a alterações morfofisiológicas nas plantas por expor os tecidos a condições artificiais, facilitando a formação de tecidos desdiferenciados ou hiperídricos, por exemplo. A ocorrência de hiperidricidade em CTV muitas vezes pode ser associada ao meio de cultura utilizado, presença de agente gelificante e ao balanço de citocininas (GIUSTI et al., 2002), além do acúmulo de vapor d'água e etileno nos frascos e da baixa troca gasosa (PALMA et al., 2011). Quando o meio líquido suplementado com ANA foi usado, a presença da auxina pode ter impossibilitado a regeneração dos explantes foliares, ocorrendo oxidação em todos os explantes. Possivelmente a imersão total do explante em meio líquido com ANA em um estágio inicial do desenvolvimento se torna muito agressivo, impedindo a regeneração das plantas.

O sistema em meio sólido e ponte de papel em MS0 gerou plantas mais alongadas, com folhas retorcidas por todo o comprimento do caule e com algum grau de hiperidricidade, principalmente na base das plantas, onde há contato com o meio de cultura, tornando-as parcial ou totalmente inaptas no processo de repique. Por outro lado, as plantas mantidas em meio MS sólido e sobre ponte de papel em meio suplementado com ANA apresentaram morfologia foliar normal, possibilitando o repique e gerando plantas igualmente saudáveis e responsivas. A alteração da morfologia vegetal de plantas produzidas *in vitro* foi avaliada na espécie como resultado do efeito da luz branca e luz azul. Leal-Costa e colaboradores (2010) relataram que plantas mantidas em MS0 sólido sob luz branca apresentaram a mesma morfologia de plantas mais alongadas com folhas com aspecto retorcido. A adição de luz azul promoveu o crescimento de plantas com folhas maiores e mais grossas, com células do mesófilo, cloroplastos e grãos de amido maiores, características condizentes com crassuláceas de metabolismo CAM saudáveis. Possivelmente, a adição da auxina ANA causa efeito semelhante à adição de luz azul, promovendo alteração positiva no balanço hormonal das plantas, mostrando-se bastante vantajosa na comparação com plantas

produzidas em meio MS0. A vantagem da adição de ANA se dá tanto no desenvolvimento da parte aérea quanto na produção de raízes, como no caso de raízes adventícias de *Passiflora pohlii* (SIMÃO et al., 2016).

Em relação aos resultados de cultivo *in vitro* com a espécie, culturas de calos foram estabelecidas a partir de explantes foliares mantidos em meio MS suplementado com combinações de 2,4-D e BAP (SANTOS et al., 2014). Estudos anteriores feitos pelo nosso grupo demonstraram que a produção de plantas completas de *K. pinnata* foi alcançada em meio MS solidificado na ausência de suplementação hormonal (MS0), porém a presença de ANA resultou em um aumento significativo da biomassa de parte aérea e raiz das plantas (BARBOZA, 2017). Entretanto, apesar da maior produção de biomassa, no presente estudo foi observado que as raízes que cresceram em meio sólido mostraram dificuldade para serem retiradas do meio de cultura e isoladas na etapa de pesagem para iniciar as culturas de raízes, o que acaba por reduzir a efetiva quantidade de explantes radiculares disponível. Adicionalmente, a lavagem das raízes com água estéril para retirada do meio de cultura acarretou em grande perda de material, além de ser observada redução na capacidade de resposta morfogênica, quando essas raízes foram colocadas em cultura. Dessa forma, os sistemas que utilizam meio de cultura sem adição de agentes gelificantes devem ser considerados como uma alternativa mais eficiente, devido à enorme facilidade e rapidez na manipulação e obtenção das raízes, reduzindo consideravelmente o gasto com insumos.

Uma vez isoladas e transferidas para iniciação das culturas, as raízes alcançaram maior acúmulo de biomassa nos tratamentos em ausência de luz, possivelmente devido ao efeito inibitório na atividade da peroxidase, enzima capaz de degradar auxinas, e compostos fenólicos endógenos no processo de indução da rizogênese (ARAB et al., 2018). A influência da luminosidade sobre as culturas de raízes é reportada em diferentes estudos, onde a ausência de luz pode trazer resultados mais eficientes, como observado nas culturas de raízes de *Cichorium intybus* (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007) e *Eleutherococcus koreanum* (PARK et al., 2005) ou a presença de luz ser um fator importante no estabelecimento de protocolos eficientes de culturas de raízes como em *Cleome rosea* (CORDEIRO et al., 2015) e *C. dendroides* (SAAVEDRA-DE PAULA, 2017).

No presente trabalho, a avaliação da suplementação com AIB indicou que a melhor concentração para elevar o acúmulo de biomassa varia de acordo com o sistema no qual a planta matriz foi cultivada. Uma vez que as plantas cresceram em condições diferentes e apresentaram aspectos morfológicos distintos, possivelmente essas duas condições de cultura influenciam na

capacidade proliferativa e de resposta ao regulador de crescimento quando isoladas em cultura de raízes. Estudos prévios com *K. pinnata* demonstraram a capacidade de multiplicação de raízes na presença de 1 mg.L⁻¹ de AIB (BARBOZA, 2017). Neste trabalho, a menor concentração de AIB (1 mg.L⁻¹) promoveu maiores taxas de crescimento para culturas provenientes de plantas mantidas em meio sólido suplementado com ANA e meios líquido e sobre ponte de papel em MS0. Já uma maior concentração do fitorregulador (5 mg.L⁻¹) induziu um maior acúmulo de biomassa em culturas de raízes provenientes de plantas estabelecidas nos sistemas em meio sólido (MS0) e em ponte de papel sobre meio MS + 1mg.L⁻¹ ANA. O uso deste fitorregulador já foi indicado com uma ação positiva na indução de raízes em trabalhos com as espécies *Hypericum perforatum* (ZOBAYED; SAXENA, 2003; CUI et al., 2010;), *Podophyllum peltatum* (ANBAZHAGAN et al., 2008), *Betula platyphylla* (VAARIO et al., 1995), *Vernonia amygdalina* (KHALAFALLA et al., 2009), *Arnebia hispidissima* (SHEKHAWAT, 2012), *Costus igneus* (NAGARAJAN et al., 2011) e *Withania coagulans* (ABOUZID et al., 2010). Já para outras espécies, a associação de mais de uma auxina é indicada para a multiplicação de raízes, como foi observado para *Psammosilene tunicoides*, em que foi necessária a combinação das auxinas AIB e ANA (ZHANG et al., 2013).

A produção de metabólitos de interesse pelos métodos de CTV frequentemente esbarra na manutenção do material vegetal a ser cultivado em longo prazo. O acompanhamento da capacidade de crescimento das culturas de raízes estabelecidas nas condições mais adequadas ao acúmulo de biomassa (culturas em meio MS + 5mg.L⁻¹ AIB no escuro, oriundas de raízes do sistema de ponte de papel em meio MS + 1mg.L⁻¹ ANA), demonstrou um maior acúmulo de biomassa ao final da primeira subcultura, havendo um decréscimo na capacidade de multiplicação nas subculturas subsequentes. A adição de auxinas exógenas favorece o processo de enraizamento e produção de raízes adventícias, porém em estágios mais avançados das culturas, a longo prazo, pode causar efeitos contrários, inibindo a proliferação de raízes (ARAB et. al., 2018). A manutenção prolongada *in vitro* e exposição contínua a auxinas pode promover o acúmulo destes reguladores de crescimento nos ápices radiculares, impedindo a proliferação (GEORGE et al., 2008).

Embora as culturas de raízes sejam consideradas sistemas eficientes na produção de metabólitos secundários, muitas estratégias têm sido empregadas visando otimizar a produção nesses sistemas. A adição de metil jasmonato (MeJa) tem sido amplamente relatada para esta finalidade. O MeJa é uma das substâncias mais empregadas no processo de eliciação em culturas *in vitro* (JIANG et al., 2017; SHAKYA et al., 2017). A eliciação das culturas de raízes de *K. pinnata* não alterou o acúmulo de biomassa quando comparado às culturas não eliciadas. Muitas

vezes a resposta à introdução de um agente estressor ao meio, ao mesmo tempo que promove o aumento da produção de metabólitos secundários de interesse, também reduz o crescimento das culturas, uma vez que o órgão, ou planta, está direcionando recursos para o metabolismo secundário. Em *hairy roots* de *Momordica charantia*, a eliciação com 100 μM de MeJa do 15º ao 25º dia de cultura promoveu o aumento da produção de metabólitos em detrimento do acúmulo de biomassa (CHUNG, 2005). Já para *Eleutherococcus koreanum*, a adição de 50 μM de MeJa nos últimos 7 dias de uma cultura de 6 semanas promoveu não só o aumento da produção de metabólitos quanto de biomassa. Entretanto, há casos em que a adição de eliciador não altera o crescimento das culturas, como observado em raízes adventícias de *Oplopanax elatus* mantidas em biorreatores após eliciação por 8 dias com 200 μM de MeJa (JIANG et al., 2017).

A eliciação das culturas de raízes de *K. pinnata* se mostrou promissora na indução de metabólitos, resultando em um maior número de manchas referentes a substâncias da classe dos terpenos, quando as culturas foram mantidas por maior tempo (15 dias) em contato com o eliciador. O uso de MeJa para estimular a produção de metabólitos secundários já foi indicado na produção *in vitro* de terpenos, assim como de fenilpropanoides e alcaloides (ZHAO et al., 2005), biofenóis solúveis (SIVAKUMAR; PAEK, 2005), saponinas triterpênicas (YENDA, 2010), hipericina (WU et al., 2014), ácido clorogênico (LEE et al., 2015), polissacarídeos (JIANG et al., 2017), fenóis e flavonoides (ZHAO et al., 2005; LEE et al., 2015; JIANG et al., 2017).

O reconhecido uso medicinal de *K. pinnata* tem resultado na realização de diversos estudos com a espécie, sendo que na maioria dos estudos são utilizados extratos aquosos, à semelhança do que é feito na medicina popular (MUZITANO et al., 2011; BARBOZA, 2017). Entretanto, para análises mais abrangentes, comumente são utilizados outros tipos de solventes, como o metanol e o etanol, muito utilizados para extração de flavonoides, inclusive de *K. pinnata*, devido à solubilidade de substâncias como a quercetina e rutina (DARMAWAN et al., 2013). No presente trabalho optou-se pelo uso desta substância, uma vez que o etanol é considerado um solvente menos poluente, derivado de material vegetal, renovável e com custo menor, sendo enquadrado no conceito de química verde (CARRÉ et al., 2018). Com relação ao processo de extração, foi empregada a técnica de extração com auxílio de ultrassom, um método barato, com baixa necessidade de maquinário, rápido, limpo e que permite a extração de uma grande variedade de substâncias. A eficácia do método se dá pela formação de bolhas pelas ondas acústicas que, ao se romperem, promovem danos às estruturas celulares, liberando substâncias para o meio (MA et al., 2008).

A maioria dos trabalhos com fitoquímica de *K. pinnata* utiliza extratos de folhas de campo ou cultivadas *in vivo* e relata a presença de diversas substâncias, como saponinas, taninos, fenóis (BARBOZA, 2017), glicosídeos, alcaloides (ABHIJIT, 2015) e, principalmente, flavonoides (ABDELLAOUI et al., 2010; MUZITANO et al., 2011; DARMAWAN et al., 2013; MILAD et al., 2014; BARBOZA, 2017). Para raízes produzidas *in vivo* já foi detectada em extratos metanólicos a presença de esteroides, saponinas, alcaloides, glicosídeos, flavonoides e taninos (MAJAZ et al., 2011). Barboza (2017) avaliou as respostas morfogênicas de explantes de folhas e raízes de plantas estabelecidas *in vitro*, cultivados em meio MS líquido suplementado com diferentes auxinas e citocininas. Em estudos preliminares com culturas de raízes produzidas *in vitro*, Barboza (2017) detectou a presença de saponinas e flavonoides, estando esta última classe de metabólitos relacionada à ação antibacteriana no material investigado.

No presente estudo, nas análises em cromatografia em camada delgada (CCD), foram encontradas manchas características de flavonoides e terpenos nos extratos de material *in vivo*, parte aérea e culturas de raízes de todos os tratamentos avaliados, eliciados ou não. Manchas características das saponinas foram encontradas em todos os extratos, inclusive nos meios de cultura, sendo um resultado bastante promissor, uma vez que viabiliza um método não destrutivo para extração de saponinas de *K. pinnata*, utilizando-se apenas o meio de cultura e propagando as culturas de raízes. As substâncias evidenciadas em CCD nas amostras de material produzido *in vitro* correspondem às manchas também encontradas nas amostras de extratos de plantas cultivadas *in vivo*, havendo indicações de que, no caso das saponinas, as condições *in vitro* induziram a uma maior produção dos metabólitos.

A avaliação da capacidade produtiva utilizando técnicas de CTV tem por objetivo a otimização de processos de produção. No presente estudo, o cálculo da capacidade produtiva de extratos foi aproximado para todos os sistemas, uma vez que foram preparados extratos apenas de alguns tratamentos, sendo utilizada a média de rendimentos dos extratos de culturas de raízes (20%), porém o ideal seria realizar o cálculo individualmente. Utilizando o resultado de rendimento de isolamento de flavonoides de Muzitano e colaboradores (2006), partindo de um extrato bruto, foi possível estimar quanto cada sistema de cultura seria capaz de produzir de flavonoides, classe de metabólito pela qual a espécie é reconhecida. A avaliação de parâmetros para aumentar a capacidade produtiva pode ser direcionada a métodos para aumento do rendimento das extrações, assim como o aumento da escala de produção, como culturas de raízes em biorreatores.

A produtividade dos sistemas *in vitro* avaliados no presente trabalho foi determinada de acordo com a matéria-prima vegetal utilizada, ou seja, foi determinada a relação entre a quantidade de raízes produzidas por unidade de explante radicular inoculado. O sistema em ponte de papel sobre meio suplementado com ANA se mostrou mais produtivo, aumentando a produção de raízes de 29 a 59% em relação aos outros sistemas avaliados. Dessa forma, é possível sugerir que o aumento da produtividade de culturas de raízes apresenta como gargalos produtivos o sistema utilizado e a composição do meio de cultura.

A ideia de utilização de um índice para determinação da eficiência produtiva tem sido pouco explorada em trabalhos de pesquisa, que demandam a determinação de indicadores mais apropriados, sobretudo quando os resultados podem ser transferidos para escala industrial. Visando à eficiência da produção, no presente estudo foram determinadas condições que favorecem a redução dos custos do processo *in vitro*. A etapa de descontaminação se mostrou eficiente com apenas o uso de hipoclorito de sódio comercial, uma substância de baixo custo. Em relação ao sistema de cultivo *in vitro*, o uso de ponte de papel de filtro apresenta vantagem de não utilizar ágar e necessitar de uma quantidade menor de meio; na etapa de cultura de raízes, o emprego de frascos Erlenmeyer menores permitiu a produção de mais material em um mesmo espaço, considerando que o aumento do volume do frasco não acarretou em aumento do acúmulo de biomassa das culturas; e além disso, a manutenção das culturas no escuro permite a adaptação de salas de cultura sem necessidade de iluminação, sendo mais um componente de redução de custos do processo. Em relação à manipulação do material, a CTV exige uma mão de obra qualificada, aspecto que também encarece o processo. Pensando-se em uma escala de produção industrial, como ocorre nas biofábricas, além desses aspectos, outros devem ser considerados para que se atinjam valores máximos de produção, como, por exemplo, a utilização de equipamentos de reciclagem de meio, evitando a necessidade de subculturas e alcançando a indução da liberação de metabólitos no meio, o que permite a manutenção do material vegetal por mais tempo em cultura (BAQUE et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível otimizar a produção de culturas de raízes de *Kalanchoe pinnata*, evidenciando a riqueza de metabólitos *in vivo* e *in vitro* da espécie e a possibilidade da elicitação para as culturas. Também foi possível definir parâmetros para o uso das técnicas de CTV com vistas à sua exploração comercial, sem a necessidade da propagação da espécie no ambiente. Os indicadores propostos viabilizam a produção *in vitro* com

aumento da eficiência e produtividade para obtenção de metabólitos secundários de interesse medicinal de *K. pinnata*.

CONCLUSÕES

Em relação aos métodos propostos para o cultivo *in vitro* de *K. pinnata*, com vistas ao acúmulo de biomassa de raízes e a síntese de metabólitos, foi possível concluir:

- O uso de hipoclorito de sódio a 2% foi considerado o melhor tratamento para a descontaminação de folhas para inoculação *in vitro*;
- As maiores taxas de multiplicação de raízes foram obtidas em matrizes produzidas *in vitro* em meio sólido MS + 1mg.L⁻¹ ANA, porém os maiores valores de acúmulo de biomassa nas culturas de raízes foram obtidos a partir do sistema de ponte de papel com meio MS + 1mg.L⁻¹ ANA;
- A manutenção das culturas no escuro foi essencial para o acúmulo de biomassa de raízes;
- O uso de MeJa nas culturas de raízes alterou o padrão qualitativo de produção *in vitro* de terpenos;
- A presença de terpenos, flavonoides e saponinas foi detectada tanto no material *in vivo* quanto no material *in vitro*;
- Em termos de produtividade, capacidade produtiva e eficiência, o sistema de cultura de matrizes em ponte de papel sobre meio MS + 1mg.L⁻¹ ANA, seguido de cultura de raízes em meio MS + 5mg.L⁻¹ AIB no escuro, foi considerado a melhor combinação para a produção de raízes e seus produtos;
- Os indicadores propostos ao longo do processo de produção viabilizaram a determinação do método mais eficiente para o cultivo *in vitro* da espécie.

PERSPECTIVAS

Com base nos resultados promissores alcançados no presente trabalho em relação à otimização do cultivo *in vitro* de raízes de *K. pinnata*, à produção de metabólitos de interesse medicinal e ao uso de indicadores para avaliação da eficiência metodológica em CTV, será dada continuidade às pesquisas com a espécie. Sendo assim, propõe-se:

- Avaliação da produção em larga escala de plantas matrizes e culturas de raízes empregando biorreatores;
- Avaliação da multiplicação das culturas de raízes ao longo de subculturas, após redução ou retirada da auxina AIB;
- Avaliação da produção de metabólitos nas culturas de raízes utilizando o eliciador MeJa em diferentes concentrações e tempos de exposição, assim como o uso de outros eliciadores;
- Caracterização fitoquímica do material aplicando outras técnicas cromatográficas, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa.

REFERÊNCIAS

- ABOUZID, S.F.; EL-BASSUONY, A. A.; NASIB, A.; KHAN, S.; QURESHI, J.; HOUDHARY, M. I. Withaferin A production by root cultures of *Withania coagulans*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.3, n.1, p.23-27, 2010.
- AIDA, R.; SHIBATA, M. Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgene silencing. **Plant Science**, v.121, n.175, 1996.
- AIJAZ, A.; JAIN, S.; HARIHARAN, A.G. Effect of elicitation on the production of phyto-constituents through plant tissue culture technique – A review. **International Journal of Drug Discovery and Herbal Research**, v. 1, n. 2, p. 84-90, 2011.
- AKASH, T.; ISHIZAK, M.; AYABE, S. Isoflavonoid production by adventitious-root cultures of *Iris germanica* (Iridaceae). **Plant Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 207-215, 2005.
- ALLORGE-BOITEAU, L. Madagascar centre de speciation et d'origine du genre *Kalanchoe* (crassulaceae). **Biogéographie de Madagascar**, p.137-145, 1996.
- ANBAZHAGAN, V. R. ; AHN, C. H. ; HARADA, E. ; KIM Y. S. ; CHOI, Y. E. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllum peltatum*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, n.44, p.494-501, 2008.
- ARAB M. M.; YADOLLAHI, A.; EFTEKHARI, M.; AHMADI, H.; AKBARI, M.; KHORAMI, S. S. Modeling and optimizing a new culture medium for *in vitro* rooting of $g \times n 15$ *Prunus rootstock* using artificial neural network-genetic algorithm. **Nature - Scientific reports**, v.8, n.9977, DOI:10.1038/s41598-018-27858-4, 2018.
- ARNOLD, J. R. T. - **Administração de Materiais: uma introdução**. Tradução: Celso Rimoli, Lenita R. Esteves. Ed. Atlas. São Paulo, 1999.
- BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, D.A. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. **Molecules**, v.19, n.9, p.13541-13563, 2014.
- BARBOZA, T. J. S. Avaliação da produção de metabólitos e do potencial medicinal de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. em diferentes sistemas *in vitro*. **Tese de doutorado**. UERJ, 2017.
- BARROS, L. S. Levantamento etnobotânico em feiras livres da Paraíba e saberes da tradição dos raizeiros. Universidade Estadual da Paraíba, 2015.
- BATIANOFF GN; BUTLER DW. Assessment of invasive naturalized plants in south-east Queensland. **Plant Protection Quarterly**, v.17, n.1, p.27-34, 2002.
- BAQUE, A.; MOH, S. H.; LEE, E. J.; ZHONG, J. J.; PAEK, K. Y. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high value-added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology advances**, v.30, p.1255-1267, 2012.

BELLONI, J.A. Uma Metodologia de Avaliação da Eficiência Produtiva de Universidades Federais Brasileiras. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Produção e Sistemas, Florianópolis, 2000.

BERGER, A. Crassulaceae. In: Engler, A. & Prantl, K., **Die Naturlichen Pflanzenfamilien**, 2 ed., 18A, p.352-483, 1930.

BHOITE, H.A.; PALSHIKAR, G. S. Plant Tissue Culture: A Review. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.6, p. 565-572, 2012.

BISWAS, S. K.; CHOWDHURY, A., DAS J.; ZAHID HOSEN, S. M.; UDDIN, R., RAHAMAN, S. Literature review on pharmacological potentials of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.5, n.10, p.1258-1262, 2011.

BOGUCKA-KOCKA, A.; ZIDORN, C.; KASPRZYCKA, M.; SZYMCZAK, G.; SZEWCZYK, K. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. **Saudi Journal of Biological Sciences**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.037>, 2016.

CARRÉ, P.; CITEAU, M.; DAUGUET, S. Hot ethanol extraction: economic feasibility of a new and green process. **OCL**, v.25, n.2, D206, 2018.

CARVALHO, A. L. T. Produção de Metabólitos Secundários *in vitro*. **Centro Federal de Educação Tecnológica de Química**, Rio de Janeiro, 2005.

CARVALHO, C. A.; SANTANA, G. S.; AMARO, M. O. F.; FRANCO, A. J.; PINTO, R.; ZATTI, R. A.; FONSECA, C. C.; CARDOSO, S. A.; ROSA, M. B.; OLIVEIRA, L. L. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. in Experimental Animal Models. **Ciência e Natura**, v. 36 Ed. Especial II, p. 775-781, 2014.

CARVALHO, J. C. T; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.

CHASE, M. W., et al. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.80, p.528-580, 1993.

CORDEIRO, L. S.; SIMÕES-GURGEL, C.; ALBARELLO, N. Multiplication and cryopreservation of adventitious roots of *Cleome rosea* Vahl. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, p. 249-257, 2015.

CUI, X.; CHAKRABARTY, D.; LEE, E.; PAEK, K. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Bioresource Technology**, v.101, p.4708-4716, 2010.

DARMAWAN, A.; MEGAWATI; SOFA FAJRIAH, S. 3',4'-Dimethoxy Quercetin, a flavonol

compound isolated from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3, p.88-90, 2013.

DA SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S; MENDONCA, S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.G.; ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica**. v.60, p.201-210, 1995.

ESPINOSA-LEAL, C. A.; PUENTE-GARZA, C. A.; GARCIA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active Compounds. **Planta**. Online. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>, 2018.

FERNANDES, J. M.; FELIX-SILVA, J.; CUNHA, L. M.; GOMES, J. A. S. G.; SIQUEIRA, E. M. S.; GIMENES, L. P.; LOPES, N. P.; SOARES, L. A. L.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; ZUCOLOTO, S. M. Inhibitory Effects of Hydroethanolic Leaf Extracts of *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) against Local Effects Induced by *Bothrops jararaca* Snake Venom. **Plos One**. DOI:10.1371, 2016.

FILOVÁ, A. Production of secondary metabolites in plant tissue cultures. **Res. J. Agricult. Sci.**, v.46, p.236-245, 2014.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n.3, 2006.

GAI, Q.; JIAO, J.; LUO, M.; WANG, W.; GU, C.; FU, Y.; MA, W. Tremendous enhancements of isoflavonoid biosynthesis, associated gene expression and antioxidant capacity in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. **Process Biochemistry**. v. 51, p. 642-649, 2016.

GANDHI, S. G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y. S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 303-317, 2015.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**. v.2, n.3. p.119-145, 2009.

GARCIA, D. E. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. **Pastos y Forrajes**, v. 27, n. 1, 2004.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE CLERK, G. J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rded. v. 1. Springer, The Netherlands, 2008.

GIUSTI, P.; VITTI, D.; FIOCCHETTI, F.; COLLA, G.; SACCARDO, F.; TUCCI, M. *In vitro* propagation of three endangered cactus Species. **Scientia Horticulturae** v. 95, p. 319-332, 2002.

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

GÓRAJ-KONIARSKA, J.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W.; MOŁDOCH, J.; SANIEWSKI, M. Elicitation of anthocyanin production in roots of *Kalanchoe blossfeldiana* by methyl jasmonate. **Acta Biologica Cracoviensia - Series Botanica**. v.57, n.1, p.141-148, 2015.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA/CBAB. p. 183-260, 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de Biotecnologia** – LFDGV/CCA/UFSC. Florianópolis: Edição da Steinmacher, p.41, 2006.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.

HITMI, A.; BARTHOMEUF, C.; SALLANON, H. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Shoot Tips. **Journal of Plant Physiology**. v.156, p.408-412, 2000.

HUSSAIN, A.; QARSHI, I. A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A., RINALDI, L.M.R. **Recent advances in plant *in vitro* culture**. 1st edition. InTech, Croatia, 210p, 2012.

Invasive Species Compendium. Datasheet. Disponível em: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/29328>. Último acesso em 01/07/18.

ISAH, T.; UMAR, S.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P., RAJASEKHARAN, P. E.; ZAFAR, N.; FRUKH. A. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 2017.

JIANG, X-L.; PIAO, X-C.; GAO, R.; JIN, M-Y.; JIANG, J.; JIN, X-H.; LIAN, M-L. Improvement of bioactive compound accumulation in adventitious root cultures of an endangered plant species, *Oplonanax elatus*. **Acta Physiol Plant**. v.39, n.226, 2017.

KAPOOR, S.; RAGHUVANSHIA, R.; BHARDWAJA, P.; SOODB, H.; SAXENAA, S.; CHAURASIA, O. P. Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v.183, p.258-265, 2018.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 3,n.13, p. 1222-1239, 2009.

KHALAFALLA, M. M.; DAFFALLA, H. M.; EL-SHEMY, H. A.; ABDELLATEF, E. Establishment of *in vitro* fast-growing normal root culture of *Vernonia amygdalina* - a potent African medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.21, p.5952-5957, 2009.

- LEAL-COSTA, M. V.; NASCIMENTO, L. B. S.; MOREIRA, N. S.; REINERT, F.; COSTA, S. S.; LAGE, C. L. S.; TAVARES, E. S. Influence of Blue Light on the Leaf Morphoanatomy of *In Vitro Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae). **Microscopy and Microanalysis**. v.16, p. 576-582, 2010.
- LEE, E. J.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.120, p.1-10, 2015.
- LEITE, I. A.; MARINHO, M. G. V. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidade indígena no município de Baía da Traição-pb. **Biodiversidade**. v.13, n.1, p. 82, 2014.
- LIMA, M. R.; SANTOS, M. R. A. Aspectos Etnobotânicos da Medicina Popular no Município de Buritis, Rondônia. **Revista Fitos**. v.2, n.2, 2006.
- LOVELL, C. A. K. Production frontiers and productive efficiency. In: FRIED, H. O.; LOVELL, C. A. K.; SCHMIDT, S. S. (eds.), **The measurement of productive efficiency**. New York, Oxford University, 1993.
- MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Peels. **Agriculture Food Chemistry**. v.56, p.5682-5690, 2008.
- MACEDO, M. M. Gestão da produtividade nas empresas. **Revista Organização Sistêmica**, v.1 n.1, 2012.
- MAJAZ, A. Q.; TATIYA, A. U.; KHRURSHID, M.; NAZIM, S.; SIRAJ, S. The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): a phytochemical and pharmacological review. **IJRAP**, v.5, n.2, p.1478-1482, 2011.
- MILAD, R.; EL-AHMADY, S.; SINGAB, A. N. Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v.4, n.1, p.86-104, 2014.
- MEYER J-Y. A preliminary review of the invasive plants in the Pacific Islands (SPREP Member Countries). In: Sherley G, ed. *Invasive Species in the Pacific: A Technical Review and Draft Regional Strategy*. Samoa: South Pacific Regional Environment Programme, p.85-114, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MORT M. E.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; FRANCISCO-ORTEGA, J.; SANTOS-GUERRA, A. Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from *matK* sequence data. **American Journal of Botany**, v.88, p.76-91, 2001.

MORTON, J. F. Mucilaginous plants and their uses in medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.29, p.245-266, 1990.

MUZITANO, M. F.; BERGONZI, M. C.; DE MELO, G. O.; LAGE, C. L. S.; BILIA, A. R.; VINCIERI, F. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of ethnopharmacology**, v.133, p.132-137, 2011.

NAGARAJAN, A.; ARIVALAGAN, U.; RAJAGURU, P. *In vitro* root induction and studies on antibacterial activity of root extract of *Costus igneus* on clinically important human pathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.1, n.4, p.67-76, 2011.

NANDAGOPAL, S.; KUMARI, B.D.R. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. **Journal of Central European Agriculture**, v.8, n.1, p.73-80, 2007.

NASCIMENTO, L. B. S.; LEAL-COSTA, M. V.; MENEZES, E. A.; LOPES, V. R.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; TAVARES, E. S. Ultraviolet-B radiation effects on phenolic profile and flavonoid content of *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v.148, p73-81, 2015.

NOPO-OLAZABAL, C.; CONDORI, J.; NOPO-OLAZABAL, L.; MEDINA-BOLIVAR, F. Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of *Vitis rotundifolia* treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.74, p. 50-69, 2004.

OJEWOLE, J. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* leaf aqueous extract. **Journal of ethnopharmacology**. v. 99, n.1, p.13-19, 2005.

OKWU D.E; NNAMDI, F.U. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial Activity. **J. Chem. Pharm. Res.** v.3, n2, p.1-10, 2011.

OTÁLVARO-ÁLVAREZ, A.M.; VELÁSQUEZ-LOZANO, M.E. Obtención de escopolamina en biorreactor a partir de cultivos de raíces de *Brugmansia candida*. **Rev. Acad. Colomb. Cienc.**, v.38, n.146, p.35-42, 2014.

OLIVEIRA, G. C. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais no município de Alagoa Nova - PB. **Universidade estadual da paraíba**, 2012.

PALMA, D.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S.; FORTES, A. M. T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Bras. Agrociência**, v.17, n.2-4, p.174-184, 2011.

PARK, S. Y.; AHN, J. K.; LEE, W. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant science**, v. 168, n. 5, p. 1221-1225, 2005.

PATIL, R.; BHARGAVA, K.; PATEL, P.; SINGH, K.; SURANA, J. Diuretic and antiurothiatic activity of hydroalcoholic extract of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. **Journal of Pharmaceutical Research**. v.7, n.2, p.87-91, 2008.

PEREIRA, G. A.; CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande Naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura. Sociedade Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 222-226, 2011.

PEREIRA, T. M. S.; MOURA, D. C.; RODRIGUES, E. M. Análise fitogeográfica das plantas medicinais comercializadas nas feiras livres de Campina Grande - PB, Brasil. **Congresso internacional da diversidade do semi-árido**, 2016.

PIER: Pacific Island Ecosystems at Risk. **Institute of Pacific Islands Forestry**. 2004.

PIKART, F. C.; MIOTO, P. T. Metabolismo ácido das crassuláceas: considerações ecofisiológicas e evolutivas. **VI Botânica no Inverno 2016** - São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. p.138-143, 2016.

PRASAD, B. C. N.; GURURAJ, H. B.; KUMAR, V.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. Valine pathway is more crucial than phenyl propanoid pathway in regulating capsaicin biosynthesis in *Capsicum frutescens* Mill. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 18, p. 6660-6666, 2006.

RAJ, A.; GURUJARA, M. P.; JOSHI, H.; SHARSTRY, C. S. *Kalanchoe pinnatum* in treatment of gallstones: an ethnopharmacological review. **Int. J. PharmTech. Res.**, v.6, p.252-261, 2014.

RANSON, S. L.; THOMAS, M. Crassulacean Acid Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiology*, v.11, p.81-110, 1960.

SAAVEDRA-DE PAULA, A. M. Cultura de raízes de *Cleome dendroides* Schult. & Schult f. e caracterização química de materiais obtidos *in vitro* e coletados a campo. **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Rio de Janeiro, 2017.

SALAHDEEN, H. M.; YEMITAN, O. K. Neuropharmacological effects of Aqueous Leaf Extract of *Bryophyllum pinnatum* in Mice. **African Journal of Biomedical Research**. v.9, p.101-107, 2006.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; GUIMARÃES, M. C. M.; LIMA, R. A.; OLIVEIRA, C. L. L. G. Callogenesis in leaves of *Kalanchoe pinnata* Lam. by 2,4-D and BA action. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, supl. I, p.760-764, 2014.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.

SANTOS, P. F. Estudo da gestão da qualidade total e sua influência na produtividade industrial. Programa de pós-graduação em engenharia de produção. **Monografia de Especialização**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2017.

Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.

SHAKYA, P.; MARSLIN, G.; SIRAM, K.; BEERHUES, L.; FRANKLIN, G. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**; Doi: 10.1111/jphp.12743; 2017.

SILVA, M. D. P.; MARINI, F. S.; MELO, R. S. Levantamento de plantas medicinais cultivadas no município de Solânea, agreste paraibano: reconhecimento e valorização do saber tradicional. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.17, n.4, supl. II, p.881-890, 2015.

SIMÃO, M. J.; FONSECA, E.; GARCIA, R.; MANSUR1, E.; PACHECO, G. Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.124, p.419-430, 2016.

SIVAKUMAR, G.; PAEK, K. Y. Methyl jasmonate induce enhanced production of soluble biophenols in *Panax ginseng* adventitious roots from commercial scale bioreactors. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n.6, 2005.

SIVAKUMAR, G. Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. **Biotechnology Journal**. v.1, p.1419-1427, 2006.

SOLTIS, P. S. Phylogenetic relationships among Saxifragaceae *sensu lato*: a comparison of topologies based on 18S rDNA and *rbcL* sequences. **American Journal of Botany**, v.84, p.504-522, 1997.

STEVENSON, W. J. **Administração das Operações de Produção**. LTC. 6ª edição. Rio de Janeiro, 2001.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. (Org.). **Cultura de Tecidos e**

Transformação Genética de Plantas. Brasília: SPI, v.1, p.11-19, 1998.

TUPY, O.; YAMAGUSHI, L. C. T. Eficiência e produtividade: conceito e medição. **Agricultura em São Paulo**, v.45, n.2, p.39-51, 1998.

US National Plant Germplasm System. Disponível em: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?21076>. Último acesso em 29/08/17.

VAARIO, L.; OTOMO, Y.; SODA, R.; IDE, Y. Plant regeneration from root tissue and establishment of root culture of Japanese White Birch (*Betula platyphylla* var. japonica). **Plant Tissue Culture Letters**, v.12, n.3, p.251-258, 1995.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.** 2.ed. Germany: Springer, 2001.

WANG, C. H.; ZHENG, L. P.; TIAN, H.; WANG, J. W. Synergistic effects of ultraviolet-B and methyl jasmonate on tanshinonebiosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v.159, p. 93–100. 2016

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Medicinal plants in Papua New Guinea.** Geneva: WHO Press, 2009.

WU, S-Q.; YU, X-K.; LIAN, M-L; PARK, S-Y.; PIAO, X-C. Several factors affecting hypericin production of *Hypericum perforatum* during adventitious root culture in airlift bioreactors. **Acta Physiology Plant**. v.36, p.975-981, 2014.

YADAV, N. P.; DIXIT, V. K. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. **Journal of Ethnopharmacology**. v.86, p.197-202, 2003.

ZHANG, Z.; YU, Z.; JIN, Z.; LIU, J.; LI, Y. Liquid culture of adventitious roots is a potential alternative to field cultivation for *Psammosilene tunicoides*, a rare and endangered endemic medicinal plant. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.5, n.2, p.127-131, 2013.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.23, p.283-333, 2005.

ZOBAYED, S. M. A.; SAXENA, P. K. *In vitro*-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. **Plant Science**, v.165, p.463-470, 2003.