



**PROCESSO DE ESTABELECIMENTO DE CULTIVO *in vitro* DE PLÂNTULAS
DE *Simaba cedron* PLANCH. (SIMAROUBACEAE)**

Marcia Santos de Freitas Lira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos – Mestrado Profissional, PPGEP/ITEC, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos.

Orientadores: Jandecy Cabral Leite

Belém
Novembro de 2020

**PROCESSO DE ESTABELECIMENTO DE CULTIVO *in vitro* DE PLÂNTULAS
DE *Simaba cedron* PLANCH. (SIMAROUBACEA)**

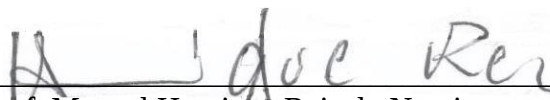
Marcia Santos de Freitas Lira

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA PROCESSOS – MESTRADO PROFISSIONAL (PPGEP/ITEC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS.

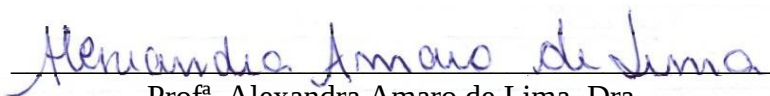
Examinada por:



Prof. Jandecy Cabral Leite, Dr.
(PPGEP/ITEC/UFPA-Orientador)



Prof. Manoel Henrique Reis do Nascimento, Dr.
(PPGEP/ITEC/UFPA-Membro)



Prof^ª. Alexandra Amaro de Lima, Dra.
(PPGEP/ITEC/UFPA-Membro)

BELÉM, PA - BRASIL
NOVEMBRO DE 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Lira, Marcia Santos de Freitas, 1979-
Processo de estabelecimento de cultivo in vitro de
plântulas de *simaba cedron* planch. (simaroubaceae) / Marcia
Santos de Freitas Lira - 2020.

Orientador: Jandecy Cabral Leite

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade Federal
do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Processos, 2019.

1. Cultura de Tecidos Vegetais 2. Micropropagação 3.
Produção de Mudanças e Biotecnologia I. Título

CDD 22.ed.660.6.

*“Dedico esse trabalho à minha avó
Maria Cardoso (in memoriam), que foi
meu exemplo de fé e fortaleza”.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter acampado um exército de Anjos para apoiar-me nesta incrível jornada e, a todos os Anjos em forma de gente que estiveram ao meu lado durante essa trajetória.

Aos meus filhos, marido e família pelo amor incondicional durante minha ausência familiar.

Aos meus orientadores, pelo acompanhamento no decorrer das pesquisas experimentais e pela assistência na elaboração desta dissertação.

Ao ITEGAM, à UFPA e ao CBA/SUFRAMA pela oportunidade de melhorar minha qualificação profissional.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz...”

(Bill Gates)

Resumo da Dissertação apresentada ao PPGE/UFPA como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos (M. Eng.)

**PROCESSO DE ESTABELECIMENTO DE CULTIVO *in vitro* DE PLÂNTULAS
DE *Simaba cedron* PLANCH. (SIMAROUBACEA)**

Marcia Santos de Freitas Lira

Novembro/2020

Orientadores: Jandecy Cabral Leite
Simone da Silva

Área de Concentração: Engenharia de Processos

Simaba cedron, conhecida popularmente como "cedron", é amplamente utilizada para o tratamento de febres e picadas de cobras. Suas sementes são utilizadas no tratamento de problemas estomacais e infecções hepáticas. Os frutos são usados para cólica e tratamento da malária, enquanto a casca é usada como antiespasmódica. É amplamente distribuída na região amazônica estendendo-se até o sudeste do Brasil (Espírito Santo) e ao norte alcançando parte da América Central (até a Costa Rica). É uma espécie que habita principalmente áreas florestadas, porém também ocorre em áreas não florestadas como capoeiras e encaves de mata dentro do cerrado. Na Serra dos Carajás ocorre na área transicional entre a vegetação rupestre e a floresta de terra firme adjacente. A *Simaba cedron* é geralmente propagada por sementes, mas com sucesso limitado, pois a baixa viabilidade da mesma restringe a sua propagação. Diante de tal dificuldade, torna-se necessário o estudo de condições adequadas à produção em larga escala destas mudas. Sabendo-se que em diversas espécies, o uso da micropropagação tem possibilitado a obtenção de grande quantidade de mudas livres de doenças e mais homogêneas, em tempo e espaço físico reduzidos, em comparação aos métodos de propagação convencionais, objetivou-se com este trabalho a obtenção de plantas matrizes assépticas, como primeira etapa no desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a simaba. As sementes foram coletadas de uma planta matriz

localizada no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), em Manaus/AM. O experimento foi instalado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CBA, onde os explantes foram cultivados em meio de cultura segundo Murashige e Skoog (MS) e em Wood Plant Medium (WPM), durante 60 dias. A taxa de desinfestação foi de 75% e, das sementes desinfestadas, 100% germinaram. A taxa de multiplicação máxima foi obtida com o meio MS (8,0:1), cujas plântulas atingiram, em média 4,8 cm e 75% de enraizamento.

Abstract of Dissertation presented to PPGE/UFPA as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Process Engineering (M. Eng.)

PROCESS OF ESTABLISHMENT AND *in vitro* DEVELOPMENT OF *Simaba cedron* PLANCH SEEDLINGS. (SIMAROUBACEAE)

Marcia Santos de Freitas Lira

November/2020

Advisors: Jandecy Cabral Leite

Simone da Silva

Research Area: Process Engineering

Simaba cedron, popularly known as "cedron", is largely used for fever and snake bites. Its seeds are used in the treatment of stomach problems and liver infections. The fruits are used for the treatment of pain and malaria while its bark is an antispasmodic. *Simaba cedron* is generally propagated through seeds, but with limited success, as the low viability of same restricts its propagation. In view of such difficulty, it becomes necessary the study for adequate conditions for the large-scale production of these seedlings. Being it known that in several species, the use of micropropagation has made it possible to obtain a large amount of disease-free and more homogeneous seedlings, in reduced time and physical space, in comparison with conventional propagation methods, the objective of this work was to analyze the effect of two culture media on the production of aseptic parent plants as a first step in the development of a micropropagation protocol for *Simaba cedron*. The seeds were collected from a matrix plant located in the Centro de Biotecnologia da Amazônia (T.N.: Amazon Biotechnology Center) (CBA)), in Manaus/AM. The experiment was installed at the Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/CBA (T.N.: Plant Tissue Culture Laboratory), where the explants were disinfected and grown in culture medium according to MURASHIGE e SKOOG (MS) and in Wood Plant Medium (WPM), during 60 days. The disinfestation

rate obtained was 75% and, of the disinfested seeds, 100% germinated. The cultivation medium that was more favorable to the cultivation of simaba was the MS, where the multiplication rate was of 8.0: 1, whose seedlings reached, in average, 4.8 cm and 75% of rooting.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - IDENTIFICAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO PROBLEMA.....	3
1.2 - OBJETIVOS.....	4
1.2.1 - Objetivo geral.....	4
1.2.2 - Objetivos específicos.....	4
1.3 - CONTRIBUIÇÕES E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	4
1.4 - DELIMITAÇÃO DA PESQUISA.....	5
1.5 - ESCOPO DO TRABALHO.....	6
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1 - PLANTAS MEDICINAIS.....	8
2.1.1 - A industrialização das plantas medicinais.....	9
2.2 - FAMÍLIA SIMAROUBACEAE.....	11
2.2.1 - O gênero <i>Simaba</i>	12
2.2.2 - A espécie <i>Simaba cedron</i>	13
2.3 - CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....	16
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	20
3.1.1 - Cadastro do projeto no Sisgen.....	20
3.1.2 - Coleta de material vegetal.....	21
3.1.3 - Certificação botânica.....	21
3.1.4 - Processo de estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	22
3.1.4.1 - Etapa I - Pré-assepsia.....	22
3.1.4.2 - Etapa II - Desinfestação.....	22
3.1.4.3 - Etapa III - Inoculação (introdução <i>in vitro</i> das sementes).....	23
3.1.4.4 - Etapa IV – Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Simaba cedron</i>	24
3.1.5 - Coleta de dados.....	26
3.1.6 - Análise dos dados.....	26
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 - ESTABELECIMENTO DA CULTURA <i>IN VITRO</i>	27
4.2 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA PLÂNTULA.....	28

4.2.1 - Alongamento da plântula.....	28
4.2.2 - Organogênese dos brotos.....	31
4.2.3 - Formação de segmentos nodais (gemas).....	32
4.2.4 - Taxa de multiplicação.....	33
4.2.5 - Enraizamento.....	34
4.2.6 - Calogênese.....	35
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	37
5.1 - CONCLUSÕES.....	37
5.2 - SUGESTÕES.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXO I - PROTOCOLO DE CERTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	45
ANEXO II - REGISTRO DO ARTIGO DESTA DISSERTAÇÃO – PUBLICADO.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Imagens ilustrativas de ocorrência de vitiligo (a) e psoríase(b)...	2
Figura 1.2	Imagens ilustrativas de ocorrência de problemas estomacais (a) e picadas de cobras (b).....	2
Figura 1.3	Imagens ilustrativas de chá comercial de <i>Simaba cedron</i>	3
Figura 2.1	Ocorrência dos quassinóides nos gêneros da família Simaroubaceae.....	12
Figura 2.2	Planta matriz de <i>Simaba cedron</i> do Centro de Biotecnologia da Amazônia.....	13
Figura 2.3	Mapa de distribuição do registro de ocorrência da espécie <i>Simaba cedron</i>	14
Figura 2.4	Semente de <i>Simaba cedron</i>	15
Figura 2.5	Imagens ópticas da madeira.....	15
Figura 2.6	Etapas da micropropagação de vegetais <i>in vitro</i>	17
Figura 3.1	Metodologia utilizada para o processo de estabelecimento da cultura <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Simaba cedron</i>	20
Figura 3.2	Localização do ponto de coleta.....	21
Figura 3.3	Câmara de fluxo laminar preparada para o processo de assepsia e introdução <i>in vitro</i> das sementes.....	22
Figura 3.4	Processo de desinfestação de sementes e estabelecimento <i>in vitro</i> das culturas de <i>Simaba cedron</i>	23
Figura 3.5	a) Preparo do meio de cultura b) Sala de crescimento e desenvolvimento do laboratório de cultura de tecidos vegetais do CBA.....	24
Figura 4.1	Taxa de desinfestação das Sementes de <i>Simaba Cedron</i>	27
Figura 4.2	Altura Média da <i>Simaba Cedron</i> após 60 dias de cultivo nos meios de MS e WPM ao meio de cultura MS.....	29
Figura 4.3	<i>Simaba cedron</i> , após 60 dias de cultivo em meio MS.....	29
Figura 4.4	Produção média de brotos de <i>Simaba cedron</i> após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM.....	31
Figura 4.5	Produção média de segmentos nodais de <i>Simaba cedron</i> , após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM.....	32

Figura 4.6	Taxa de multiplicação da <i>Simaba cedron</i> , após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM.....	33
Figura 4.7	Taxa de enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Simaba cedron</i>	34
Figura 4.8	Taxa de calogênese da <i>Simaba cedron</i> , após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Composição dos meios de cultura MS e WPM.....	25
Tabela 4.1	Efeitos dos meios de cultura MS e WPM no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Simaba cedron</i> (n=30), em 60 dias.....	30

NOMENCLATURA

CBA	CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA
MS	MURASHIGE e SKOOG, 1962
WPM	WOOD PLANT MEDIUM (LOYD e McCOWN, 1981)
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
ANVISA	AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O conhecimento da ciência aliada à constante inovação tecnológica possibilitou grandes conquistas na área da saúde. Com novos medicamentos e a produção em grande escala foi possível combater doenças e até preveni-las, como é o caso das vacinas. Entretanto, apesar do avanço na produção e variedade de remédios sintéticos, o acesso a estes medicamentos não é comum a todos, devido, principalmente, aos preços altos, incompatíveis com poder aquisitivo de certa parte da população, principalmente a que vive em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

É sabido que o mercado de medicamentos sintéticos gera lucros exorbitantes e importantes para a economia mundial, contudo, é preciso que o uso da tecnologia e o conhecimento científico sejam usados em prol de uma população sem acesso ao tratamento de suas enfermidades por questões financeiras.

A Organização das Nações Unidas – ONU, no plano da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, traça como um de seus objetivos: Proporcionar o acesso a medicamentos para todos (BRASIL, 2015). Mas, fica a pergunta: Como assegurar o acesso a medicamentos seguros, eficazes, de qualidade e a preços acessíveis para todos?

A indústria de plantas medicinais e de fitoterápicos pode representar uma excelente alternativa para responder à questão acima. De um lado, constitui importante fonte de inovação em saúde e pode fortalecer a produção e a inovação locais com base na exploração da rica biodiversidade brasileira. De outro, representa a possibilidade de ampliação de opções terapêuticas ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) na perspectiva de melhoria da atenção à saúde e de inclusão social (HASENCLEVER *et al.*, 2017).

A indústria de fitoterápicos é uma indústria em franco desenvolvimento no mundo e pode representar uma oportunidade de desenvolvimento para o setor farmacêutico no Brasil. Esta oportunidade é relevante não só pela riqueza de nossa dotação natural de fatores em biodiversidade, mas pelo conhecimento tradicional e científico acumulado sobre a atividade biológica dessas plantas pela sociedade civil e pelas Instituições de Ciência e Tecnologia – ICTs (ALVES, 2013).

A *Simaba cedron*, espécie vegetal, objeto deste estudo, é uma planta medicinal amplamente utilizada para tratamento de febre, picadas de cobras, problemas

estomacais, infecções hepáticas, cólica, tratamento da malária e contra espasmos (GUPTA, 1979). Ainda, extratos de Simaba da espécie *Simaba cedron* (Planchon), são usados na fabricação de composição cosmética, dermatológica, podendo ser usada no tratamento de desordens da pele, em particular vitiligo e psoríase (BONTE *et al.*, 1994, 1995 and 1997).



Figura 1.1 - Imagens ilustrativas de ocorrência de vitiligo (a) e psoríase(b).

No Brasil, a espécie é amplamente distribuída na região amazônica estendendo-se até parte do sudeste do país. Tendo em vista que a *Simaba cedron* é uma planta medicinal de uso para tratamentos de doenças comuns no Brasil, como: malária, picadas de cobras, problemas estomacais.



Figura 1.2 - Imagens ilustrativas de ocorrência de problemas estomacais (a) e picadas de cobras (b).

Considera-se que a espécie é uma excelente opção para tratamentos de doenças para a população de baixa renda do país. Seu cultivo *in vitro* para micropropagação, além de proporcionar à população medicamentos com preços mais acessíveis, fomentaria o mercado da bioeconomia brasileira.



Figura 1.3 - Imagens ilustrativas de chá comercial de *Simaba cedron*.

1.1 - IDENTIFICAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO PROBLEMA DA PESQUISA

A *Simaba cedron* é geralmente propagada por sementes, que podem trazer variações genéticas que, consequentemente, influenciam o teor dos princípios ativos presentes nas plantas. Apesar de seus múltiplos propósitos, ainda são poucos os estudos sobre os métodos de propagação da espécie.

Neste sentido, a cultura de células e tecidos pode resolver ou minimizar pontos na multiplicação sistematizada de plantas elites pelo processo de micropropagação. Além disso, pode ser empregada na produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que, por algum tipo de impedimento, não são sintetizados (ARNALDOS *et al.*, 2001).

Pelo fato de as plantas trabalhadas serem geneticamente padronizadas, pode-se eliminar a interferência da variabilidade genética nos resultados. Consequentemente, os resultados obtidos são efeitos das variáveis introduzidas no processo pelo experimentador (SILVA, 2015).

Dada a contribuição desta planta para importantes finalidades, como a saúde, e a necessidade de estudos relacionados aos métodos de propagação da *Simaba*, justifica-se a aplicação de metodologias que forneçam o estabelecimento do processo de cultivo *in vitro* de *Simaba cedron* que poderão servir de matrizes selecionadas para testes de multiplicação, visando selecionar linhagens de alta qualidade para o plantio extensivo e extração de fitofármacos, assim como a melhoria da produção dos princípios ativos.

1.2 - OBJETIVOS

1.2.1 - Objetivo geral

Desenvolvimento da primeira etapa do processo de cultivo *in vitro* de plântulas de *Simaba cedron*.

1.2.2 - Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de desinfestação de sementes de *Simaba cedron*;
- Avaliar a influência da utilização de dois meios de cultivo (MS e WPM) sobre o processo do estabelecimento *in vitro* de plântulas de *Simaba cedron* quanto ao número de brotos, número de gemas, altura da plântula e taxa de enraizamento.

1.3 - CONTRIBUIÇÕES E RELEVÂNCIA DO TEMA

Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, as plantas medicinais ainda desempenham importante papel na saúde mundial. Estima-se que cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (VEIGA, 2008).

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

No entanto, alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, como a heterogeneidade dos indivíduos, devido a variabilidades genética e bioquímica, além de comprometer a micropropagação (VIEIRA, 2000). Neste contexto, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônômico, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies.

Atualmente, as aplicações da biotecnologia na área agrícola e de plantas medicinais têm sido bastante difundidas. KERBAUY (1999) descreve várias dessas

aplicações, como clonagem, cultura de células, tecidos e órgãos, obtenção de plantas haplóides a partir de cultura de anteras, produção de metabólitos secundários em biorreatores, geração de variantes somaclonais, microenxertia, tecnologia dos protoplastos e criopreservação.

Devido à importância desta planta para múltiplos propósitos e ao método convencional de propagação por germinação de sementes, que pode acarretar diferenças na composição de seus princípios ativos, ações que envolvam a produção de mudas padronizadas são imprescindíveis para delinear estratégias que visem à conservação, ao manejo sustentável e ao melhoramento genético dessa espécie. Razões pelas quais trona-se necessário, avaliar a influência dos diferentes meios de cultivo no estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Simaba cedron*, como primeira etapa no desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a espécie.

Em todo o mundo, as plantas têm sido usadas como fonte medicinal primária e secundária, desde o início do mundo. A farmacologia das plantas é reconhecida pela identificação dos princípios ativos de cada espécie, em cada caso, os componentes fitoquímicos, metabólitos secundários podem exercer a função de bioativos importantes na composição da espécie, agregando valor aos bioprodutos e bioprocessos oriundos da biodiversidade (Referência?).

Esses bioativos podem ser usados nas indústrias farmacêuticas, cosméticos, suplementos alimentares, perfumarias, corantes. Nesse sentido, destaca-se que o uso, a longo prazo, de diversas espécies nesses setores contribuiu para a escassez de algumas e extinção de outras, necessitando buscar técnicas para o uso sustentável da mesma ou a busca de um processo de cultivo diferenciado, no caso deste estudo, o cultivo *in vitro* da espécie *Simaba cedron*.

O emprego do processo de estabelecimento de cultura *in vitro* para diferentes espécies busca aperfeiçoar a produção em larga escala de material vegetal geneticamente padronizado.

1.4 - DELIMITAÇÃO DA PESQUISA

Devido à utilização desta planta para múltiplos propósitos e ausência de informações sobre métodos de propagação que possam otimizar a sua produção quantitativa e qualitativa, optou-se por dar início aos estudos necessários para o

estabelecimento de um processo para obtenção do protocolo de cultivo *in vitro* de *Simaba cedron*.

Como se trata de uma planta lenhosa, cujo tempo de propagação é longo, nesta pesquisa, objetivou-se desenvolver um protocolo para assepsia de sementes e avaliar a influência dos diferentes meios de cultivo no estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *S. cedron*, como primeira etapa no desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a espécie.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Biotecnologia da Amazônia.

1.5 - ESCOPO DO TRABALHO

Este trabalho busca contribuir para a elaboração de um protocolo de produção de mudas micropropagadas de *Simaba cedron*, pois, apesar da importância da espécie no tratamento de múltiplas doenças, há uma escassez de produção científica e de referências sobre a espécie.

Dessa forma, foi estabelecido o estudo e elaboração do processo de estabelecimento de plântulas *in vitro* de *Simaba cedron* através do desenvolvimento de protocolos de desinfestação de sementes e estabelecimento *in vitro* de plântulas.

Neste sentido, buscou-se o estabelecimento desta cultura, partindo-se dos referenciais bibliográficos selecionados e dos trabalhos de pesquisa realizados.

- A primeira fase da pesquisa concentrou-se no levantamento bibliográfico sobre a espécie de interesse, sua utilização e seus métodos de cultivo, concentrando-se na elaboração da temática de pesquisa e subsequente aprofundamento do respectivo objeto de investigação;
- A segunda fase da pesquisa concentrou-se na elaboração de um protocolo de assepsia de sementes para introdução *in vitro*;
- A terceira e última fase da pesquisa concentrou-se precisamente no processo de estabelecimento da cultura *in vitro* e seleção do melhor meio de cultivo para o referido processo.

A construção deste trabalho procura servir de base para auxiliar, através de seus resultados e plântulas produzidas, pesquisas futuras para o estabelecimento de um protocolo completo de produção em larga escala de mudas de *S. cedron*.

Este trabalho visa estabelecer o cultivo *in vitro* (um processo de produção inovador) para a espécie *Simaba cedron*, num período de 60 (dias), utilizando como estratégia o uso de dois meios de culturas diferentes, em condições ambientais controladas.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - PLANTAS MEDICINAIS

Há milhares de anos, o homem dependia integralmente de produtos naturais para sua sobrevivência tanto física como biológica, e observando a relação dos animais com a flora, percebeu que poderia fazer uso das plantas como meio de prevenir, tratar e curar suas doenças. E assim, tendo como base a observação e experiência, povos de diversos países transmitiram por gerações, seus conhecimentos sobre o uso das plantas no tratamento de doenças que acometem tanto o homem, como os animais, tornando as plantas medicinais, atualmente, não apenas um importante recurso da medicina tradicional, mas também uma identidade cultural de muitos povos (FIRMO *et al.*, 2011).

De acordo com ELDIN e DUNFORD (2001), é sabido que povos antigos utilizavam as plantas como prática na medicina natural através de registros encontrados, os quais relatam que os povos chineses possuíam em 2.800 a.C., uma lista com mais de 360 espécies de plantas que utilizavam como remédio, assim como médicos egípcios em 2.000 a.C., e os povos da antiga Grécia no século IV a.C. que já utilizavam e comercializavam as plantas medicinais.

A importância empírica do uso das plantas medicinais pelo homem ao longo de gerações fica ainda mais evidente quando, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que apesar da indústria farmacêutica de medicamento sintético ser cada vez mais comum no mundo, contudo, devido ao alto preço dos medicamentos sintéticos, grande parte da população de muitos países em desenvolvimento, ainda depende da medicina tradicional como atenção primária à saúde. E um importante recurso desta medicina se encontra nas plantas medicinais e suas propriedades fitoterápicas, tendo em vista que 85% desta população de baixa renda utilizam plantas, ou preparações a partir destas, no tratamento de suas enfermidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

No Brasil, o conhecimento sobre o uso das plantas medicinais está historicamente ligado aos povos indígenas, onde os mesmos foram expostos às doenças endêmicas durante o período de colonização no país, onde surgiu a necessidade de aprimorar seus conhecimentos sobre as plantas nativas no Brasil para cura de novas

doenças que surgiram à época. Ainda sob o efeito da colonização, plantas de origem europeia e africana trazidas ao país nos navios negreiros foram adaptadas e cultivadas no Brasil, contribuindo assim para uma maior diversidade de plantas medicinais para atender a demanda e as necessidades dos novos povos que passaram a habitar o território brasileiro (NOLDIN, 2005).

Apesar da indústria de medicamentos sintéticos dominarem o mercado da medicina moderna, as plantas medicinais ainda estão presentes no cotidiano do brasileiro, principalmente na cultura indígena através dos Pajés, curandeiros da tribo, que continuam passando seus conhecimentos às novas gerações.

2.1.1 - A industrialização das plantas medicinais

O elevado custo de medicamentos sintéticos faz com que muitos pacientes deixem de fazer ou dar continuidade ao tratamento médico prescrito para suas doenças. Muitos dependem de ações governamentais e humanitárias que distribuem medicamentos sintéticos de forma gratuita. Contudo, conforme mencionado anteriormente, pacientes de países em desenvolvimento veem nas plantas medicinais uma alternativa eficaz e de menor custo para cura e tratamento de suas doenças.

A partir dos anos 80 e 90 do século passado, frente às várias mudanças geradas pelo momento político, econômico e também da saúde, algumas práticas populares, dentre elas, o uso terapêutico das plantas medicinais, começaram a ser resgatadas no meio científico, não no sentido de se contraporem às alopáticas, mas de atuarem como complementares às práticas de saúde vigentes (ALVIM *et al.*, 2006).

Faz-se necessário destacar que as plantas medicinais são importantes tanto para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas vegetais, como também são importantes como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos, e não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos (WHO, 2002).

Com o crescente interesse das pesquisas e comercialização envolvendo as plantas medicinais, muitos países estão aperfeiçoando as legislações no âmbito das plantas medicinais, com o intuito de assegurar à população o acesso seguro e racional às plantas medicinais e fitoterápicos, viando o uso sustentável da biodiversidade.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por regulamentar a legislação que envolve os medicamentos fitoterápicos,

visando uma produção e comercialização de produtos que contemplem boas práticas de manipulação e qualidade garantida.

Com a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF, em 2006, ocorreram muitas ações no sentido de proporcionar o acesso aos medicamentos fitoterápicos. Diversos estados e municípios criaram políticas locais para o setor, com a aprovação de leis específicas. Muitos serviços de saúde passaram a oferecer esse tipo de tratamento e aumentou o número de profissionais que utilizam a fitoterapia no tratamento de seus pacientes, como é o caso do Sistema Único de Saúde (SUS) que segue um dos princípios orientadores da PNPMF, que é ampliar as opções terapêuticas e melhoria da atenção primária à saúde aos usuários do SUS (BRASIL, 2006).

A procura por medicamento natural e com baixo custo fez com que a indústria de fitoterápicos crescesse em escala mundial, entusiasmando o mercado fitoterápico cada vez mais em expansão, mesmo em países industrializados, ficando a Europa com maior índice de distribuição neste mercado e a Alemanha a responsável por cerca de 50% desta distribuição. Em 2011, enquanto o mercado global alçou o patamar de US\$ 26 bilhões no mercado fitoterápico (em distribuições desiguais, pois a Europa e Ásia concentram 59% deste), o Brasil movimentou cerca de R\$ 1,1 bilhão neste mesmo ano, acumulando um aumento de 13% de ganhos em relação a 2010. Apesar do crescimento, estes valores ainda são considerados baixos, considerando o potencial bioeconômico do país (ALVES, 2013).

O Brasil possui a maior cobertura vegetal do planeta, seis ricos biomas, com mais de 120 mil espécies de plantas, e pela sua diversidade étnica, cultural e socioeconômica, tornou-se um país com forte tradição no uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Ao invés de se aproveitar as riquezas naturais brasileiras para a produção de medicamentos fitoterápicos, o Brasil depende fortemente de insumos farmacêuticos importados, tendo custos altíssimos com medicamentos industrializados (SARAIVA *et al.*, 2015).

Embora, dada a importância de se utilizar das práticas alternativas à medicina tradicional, registre-se a necessidade de estudos relativos ao comportamento biotecnológico das plantas com atividades terapêuticas, como é o caso do gênero *Simaba*, popularmente conhecida como “pau pra tudo”.

2.2 - FAMÍLIA SIMAROUBACEAE

A família Simaroubaceae apresenta características botânicas semelhantes à Ruteaceae, Meliaceae e Burseraceae, sendo a primeira a mais relacionada, em função da composição química, anatomia da madeira e falta de canais de resina na casca e nos estames livres, porém, diferenciada das demais pela ausência de cavidades secretoras, que contém óleos aromáticos em folhas e partes florais e devido à presença de quassinóides exclusivos da família Simaroubaceae (ALVES *et al.*, 2014).

A família Simaroubaceae é constituída por, aproximadamente, 32 gêneros e 200 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, esta família é constituída por seis gêneros, cerca de 28 espécies (12 endêmicas) e duas subespécies não endêmicas (FORZZA *et al.*, 2010).

Sua distribuição ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do país (NUNOMURA *et al.*, 2012), sendo representada pelos gêneros *Quassia* e *Picrolemma*, na região Amazônica; *Castela* e *Picrasma*, no sul do país; *Simaba*, *Simarouba* e *Picrolemma* em quase todas as regiões do país (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Este gênero se caracteriza por apresentar plantas lenhosas com porte variando de um subarbusto de 30-50 cm até uma árvore de 30 m, sendo árvores pequenas ou arborescentes, em torno de 7-12 m de altura ou arbustos entre 4-6 m (SOUSA *et al.*, 2016).

Podem ser encontradas em ambientes de mata úmida, alagável ou terra firme. Sua floração e frutificação ocorrem durante todo o ano, com maior incidência nos meses de julho a outubro, e setembro a novembro, respectivamente (NUNOMURA, 2005), tendo como característica marcante um sabor bastante amargo em seu córtex.

Assim, muitas espécies dessa família (*Quassia amara*, *Picrasma excelsa*, *Jamaica quassia*) (Figura 2.1), são conhecidas há mais de um século, por conterem substâncias amargas, denominadas de “quassina”, nome conferido a toda esta classe de compostos estruturalmente relacionados, denominados de quassinóides (POLONSKY, 1973).

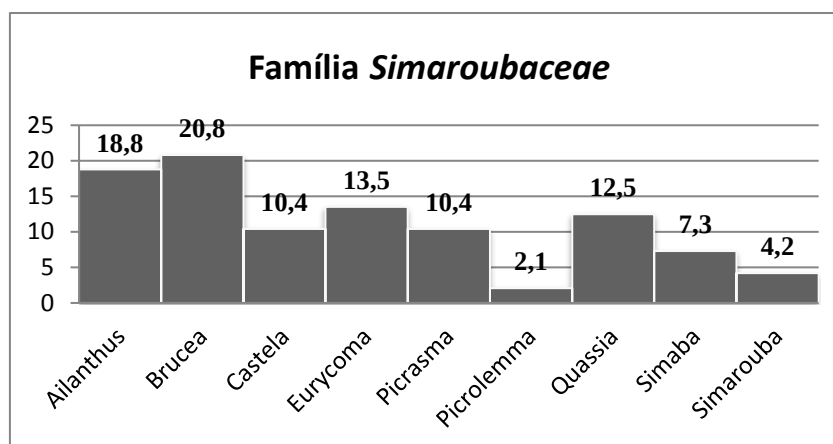


Figura 2.1 - Ocorrência dos quassinóides nos gêneros da família Simaroubaceae.
Fonte: ALMEIDA (2007).

Estes compreendem um grupo de substâncias naturais quase que exclusivo de espécies das Simaroubaceae, podendo, assim, ser considerado marcador taxonômico desta família (MURGU, 1998; SARAIVA *et al.*, 2006). A presença ou ausência de quassinóides levou alguns gêneros a serem excluídos da família, sendo este um importante parâmetro de classificação taxonômica de Simaroubaceae.

PLANCHON (1846) apresentou o primeiro estudo taxonômico de conjunto para a família Simaroubaceae, intitulado *Revue de la Famille des Simarubées*, no qual o gênero *Simaba* configurou à época 11 espécies, entre as quais a *S. cedron* é de sua autoria. Neste estudo o autor afirma que o intenso sabor amargo é, sem dúvida, a característica mais marcante da família.

2.2.1 - O gênero *Simaba*

Pertencente ao segundo maior grupo da família Simaroubaceae, o gênero *Simaba* possui, aproximadamente, 35 espécies distribuídas na América do Sul. No Brasil, foram registradas 23 espécies do gênero *Simaba* distribuídas no Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (PIRANI e THOMAS, 1988). Suas plantas são reconhecidas por serem árvores, arbustos ou subarbustos com caule subterrâneo, mas que não precisam de muita profundidade subterrânea para favorecer o seu alargamento (CAVALCANTE, 1983).

Este gênero apresenta plantas lenhosas com tamanhos distintos, sendo o subarbusto variando de 30-50 cm, árvores maiores que podem chegar até 30 m, árvores pequenas que variam em torno de 7-12 m e arbustos entre 4-6 m (NUNOMURA, 2005).

As plantas deste gênero podem ser encontradas em lugares de mata úmida, lugares alagáveis ou terra firme. Caracterizam-se ainda, por florescer e produzir frutos durante todo o ano, sendo que os meses de julho a outubro e setembro a novembro, respectivamente, as épocas mais favoráveis para a produção de frutos (NUNOMURA, 2005).

2.2.2 - A espécie *Simaba cedron*

As primeiras notícias conhecidas sobre a *Simaba cedron* são encontradas na história de Bucaners, publicada em 1699. Os índios foram os primeiros a vender as sementes em Cartagena, em 1828. Na História Natural de Drogas Simples de Guibourt, descobriu-se que Hooker, famoso diretor do Jardim Real de Kew, deu ao autor ilustre notícias citadas sobre a semente de uma planta conhecida pelos habitantes de Nova Granada com o nome de Cedrón, muito apreciada por suas propriedades medicinais (JAIME, 1884).

Simaba cedron, popularmente conhecida como cedron (Figura 2.2), é amplamente distribuída na região amazônica estendendo-se até o sudeste do Brasil (Espírito Santo) e ao norte, alcançando parte da América Central (até Costa Rica) conforme mapa de distribuição (Figura 2.3).



Figura 2.2 - Planta matriz de *Simaba cedron*, do Centro de Biotecnologia da Amazônia.

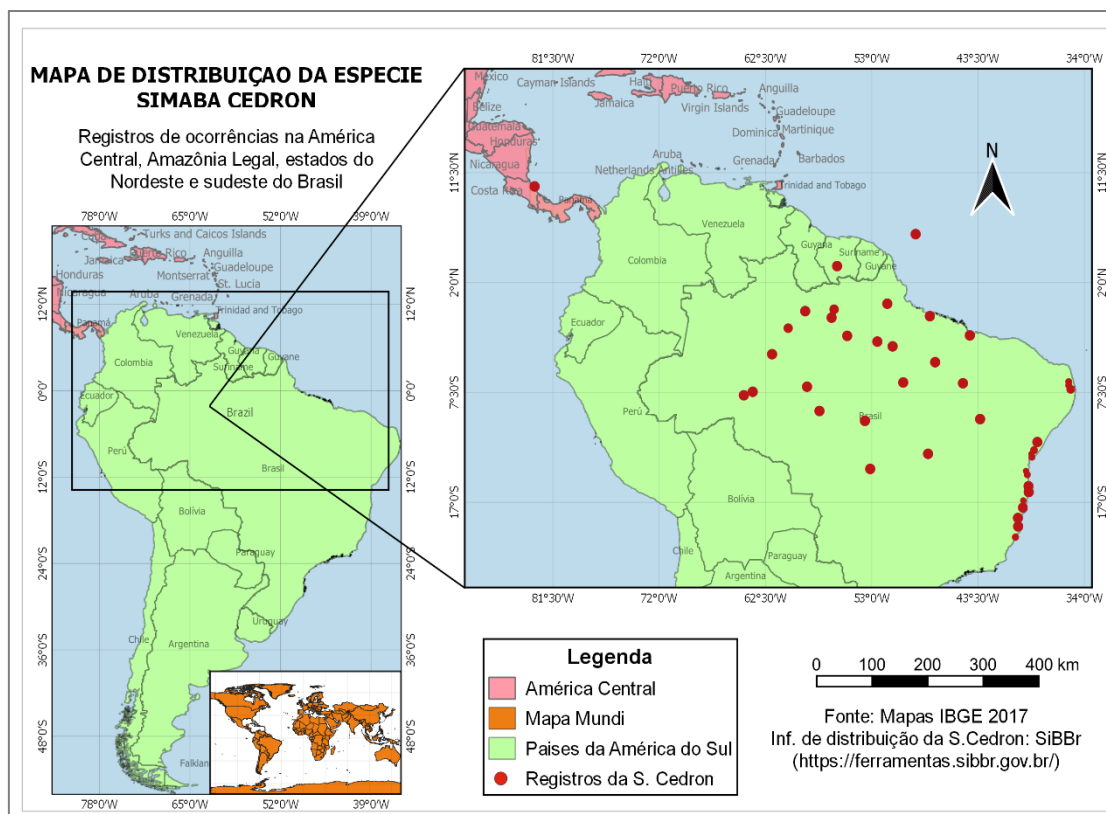


Figura 2.3 - Mapa de distribuição da espécie *Simaba cedron*.

É uma espécie que habita principalmente áreas florestadas, porém também ocorre em áreas não florestadas como capoeiras e encraves de mata dentro do cerrado. Na Serra dos Carajás ocorre na área transicional entre a vegetação rupestre e a floresta de terra firme adjacente (DEVECCHI e PIRANI, 2016).

É amplamente utilizada para o tratamento de febre e picada de cobras. Suas sementes são utilizadas no tratamento de problemas estomacais e infecções hepáticas. Os frutos são usados para cólica e tratamento da malária, enquanto a casca é usada como antiespasmódica (GUPTA, 1979).

Extratos de *Simaba* das espécies *Simaba cedron* (Planchon), são usados na fabricação de composição cosmética ou farmacêutica, particularmente dermatológica, ou um meio de cultura de células da pele, devido à sua atividade significativa sobre a despigmentação da pele e na diferenciação de queratinócitos, podendo ser usada no tratamento de desordens da pele, em particular vitiligo e psoríase (BONTE *et al.*, 1994, 1995 and 1997).

A *Simaba cedron* é geralmente propagada por sementes (Figura 2.4), que podem trazer variações genéticas que, consequentemente, influenciam o teor dos princípios ativos presentes nas plantas. A semente é única, pendurada, coberta por uma camada

membranosa escura. O albúmen é nulo, os cotilédones são muito grandes, carnudos e brancos em um estado recente e, com o tempo tornam-se amarelos devido ao ranço da substância gordurosa.



Figura 2.4 - Semente de *Simaba cedron*.

A espécie também é chamada de “pau-pra-tudo” e, segundo LEME (2016), pode ser diferenciada das demais espécies pela anatomia da madeira (figura 2.5), por seus vasos solitários e múltiplos (a), raios unisseriados e multisseriados (b) e seus cristais prismáticos nas células do parênquima (c), sendo uma importante ferramenta de identificação e qualidade do produto vegetal.

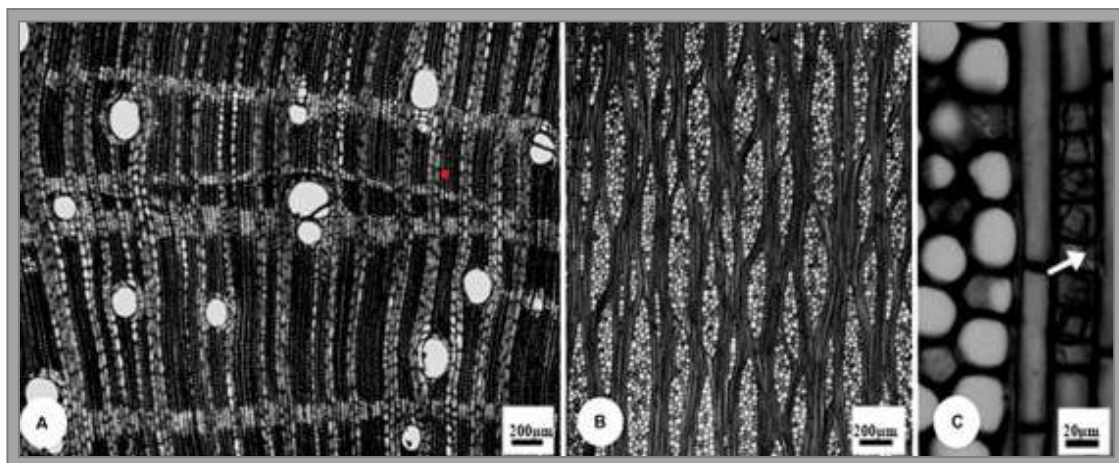


Figura 2.5 - Imagens ópticas da madeira.
Fonte: LEME (2016).

Dentre os vários relatos da composição química da *S. cedron*, destacam-se os compostos: cedronolactonas A, B, C, D e E, chaparrinona, chaparrina, glaucarubolona, glaucarubol, samaderina Z, guanepolida, ailanquassina A, poliandrol, cedronina e simalikalactone D (MORETTI *et al.*, 1994; OZEKI *et al.*, 1998, HITOTSUYANAGI *et al.*, 2001).

2.3 - CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A cultura de tecidos vegetais é uma metodologia que se tornou efetivamente importante para a agricultura, pois é possível aplicar esta técnica para diversos benefícios no cultivo das plantas, benefícios estes como: produção de plantas em grande escala, melhoramento genético, intercâmbio e conservação de germoplasma, engenharia genética e etc. Para a aplicação desta técnica, pequenas frações de tecido vivo, denominados explantes, são isoladas de um organismo vegetal, passam pelo processo de desinfecção e assepsia, e assim, garantindo que as frações de tecido vivo são cultivadas, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado, sem contaminação (TORRES *et al.*, 1999).

Embora a cultura de tecidos possa ser aplicada para diversos benefícios na agricultura, a principal finalidade desta técnica é desenvolver uma nova planta análoga à planta matriz, isto é, obter uma clonagem vegetal que é definida como propagação assexuada de células ou organismos cujo objetivo é obter um novo ser vivo, mantendo-se o genótipo idêntico ao ser de onde foi retirado o explante (TORRES *et al.*, 1999).

Em razão do exposto acima, a cultura de tecidos é considerada como uma excelente ferramenta para clonar plantas em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Permite ainda, aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura, etc.) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente (CALDAS *et al.*, 1998a).

A cultura de células e tecidos pode resolver ou minimizar pontos na multiplicação sistematizada (Figura 2.6) de plantas elites pelo processo de micropropagação. Além disso, pode ser empregada na produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que, por algum tipo de impedimento, não são sintetizados (ARNALDOS *et al.*, 2001).

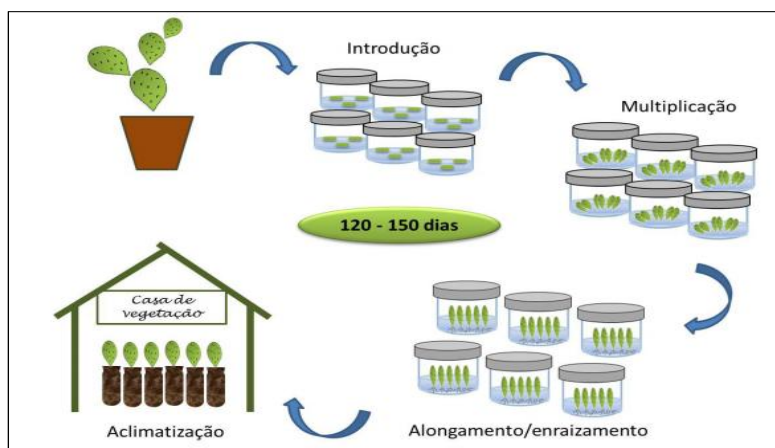


Figura 2.6 - Etapas da micropropagação de vegetais *in vitro*.
Fonte: SOUZA *et al.* (2015).

Pelo fato de as plantas trabalhadas serem geneticamente padronizadas, pode-se eliminar a interferência da variabilidade genética nos resultados. Consequentemente, os resultados obtidos são efeitos das variáveis introduzidas no processo pelo experimentador (SILVA, 2015).

Diversos critérios são importantes para o estabelecimento de cultivos *in vitro* como, por exemplo: o genótipo (espécie, cultivar ou variedade a ser utilizada), a fonte de explante (raiz, caule, folha, meristema, entre outros) e as condições de cultivo (meio de cultura, temperatura, luminosidade e o frasco a ser utilizado (ANDRADE *et al.*, 2000).

A escolha do genótipo a ser utilizado depende dos objetivos dos estudos. Variedades podem responder de maneiras diferentes às condições estabelecidas *in vitro*, no entanto, alguns autores afirmam que toda espécie e cultivar são capazes de responder às condições da cultura *in vitro*, desde que seja estabelecida uma combinação correta entre os fatores que afetam as condições de regeneração da planta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; MANTELL *et al.*, 1994).

A fonte de explante influencia diretamente na regeneração *in vitro*, isso porque o estado fisiológico em que se encontra está diretamente relacionado à sua regeneração. De modo geral, tecidos jovens e em crescimento são mais utilizados na cultura de tecidos (ANDRADE *et al.*, 2000).

As condições de cultivo, principalmente os meios de cultura, são os principais fatores para obtenção da regeneração de plantas. O meio de cultura é basicamente constituído de sais minerais (macro e micronutrientes), nitrogênio reduzido, uma fonte

de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento necessários à divisão e manutenção da proliferação celular (D'ONOFRIO e MORINI, 2006).

A combinação desses fatores associados às condições de cultivo, como: iluminação (intensidade, qualidade e fotoperíodo) e frasco da cultura (tamanho e permeabilidade a trocas gasosas) são a base da cultura de tecidos vegetais (KERBAUY, 1999).

Os explantes, antes de serem inoculados em meio de cultura, devem passar por um processo de desinfestação, o qual se baseia na esterilização superficial do explante, visando eliminar os microrganismos, como bactérias e fungos (ANDRADE *et al.*, 2000).

Na micropropagação, o uso de métodos eficientes de desinfestação e germinação, *in vitro*, de sementes, permitem a obtenção de plantas assépticas fornecedoras de propágulos livres de contaminantes, os quais podem ser usados para a multiplicação e posterior enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Diversas substâncias têm sido utilizadas para a desinfestação de sementes de espécies arbóreas, entre as quais se destaca o hipoclorito (de sódio ou de cálcio), pela facilidade de remoção dos tecidos das sementes durante a lavagem com água, por favorecer a germinação em virtude da capacidade de estimular a atividade da α -amilase e, ainda, pelo fato de promover o rompimento da dormência das sementes de algumas espécies (KANEKO e MOROHASHI, 2003).

Após o processo de desinfestação, os tecidos vegetais são colocados em contato com o meio de cultura onde passam pelo processo de morfogênese, que é resultado da divisão e diferenciação celular, podendo ser influenciada por três fatores (D'ONOFRIO e MORINI, 2006). O primeiro é o fator genético, que é determinado em sua fertilização, incorporando uma potencialidade em que os genes podem ser expressos durante seu desenvolvimento; o segundo fator, são as características desenvolvidas durante a ontogênese, onde uma vez expostos a estímulos externos, podem se manter de forma estável ou permanente; o terceiro fator são as características desenvolvidas que são influenciadas somente pelo ambiente de forma temporária (KERBAUY, 1999).

Quanto aos meios nutritivos, existem formulações distintas que devem ser ajustadas para cada espécie. O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suas diluições são, costumeiramente, as mais utilizadas. No entanto, existem formulações específicas a determinados grupos de plantas como, por exemplo, o meio WPM

(LLOYD e MCCOWN, 1981), mais usual em espécies lenhosas (CALDAS *et al.*, 1998a).

Na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro* dos tecidos vegetais, diversos estudos propõem a redução ou incremento de alguns macro e/ou micronutrientes que compõem esses meios de cultura, suprimindo melhor as exigências nutricionais de cada espécie, a exemplo dos 23 meios modificados para amoreira-preta (*Rubus* sp.) e videira (*Vitis* sp.) (VILLA *et al.*, 2008).

As técnicas de cultura de tecidos são bastante aplicadas em pesquisas envolvendo plantas medicinais, com ênfase na micropropagação, cujos protocolos permitem estabelecer padrões para a multiplicação massal de várias espécies. Além disso, essa ferramenta biotecnológica permite a produção de metabólitos secundários *in vitro*, assegurando, assim, formas alternativas para a exploração sustentável de algumas espécies, principalmente em ecossistemas ameaçados (MORAIS *et al.*, 2012).

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais tem como objetivos a obtenção de germoplasma competitivo e adaptado a diversos métodos de cultivo, escolha de novas espécies que servirão como fonte de compostos biologicamente ativos e aprimoramento da produção de fitofármacos. Tal fato, evidencia, que a cultura de tecidos mostra-se viável e uma opção para garantir uma produção em longa escala de bioprodutos (MORAIS *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A metodologia experimental para a obtenção do estabelecimento da cultura *in vitro* de plântulas de *Simaba cedron* foi realizada em (06) etapas: Cadastro do Projeto no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), Coleta do material vegetal, Certificação Botânica, Processo de Estabelecimento *in vitro*, Coleta e Análise de dados, conforme o fluxograma abaixo (Figura 3.1).

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA, em Manaus-AM.

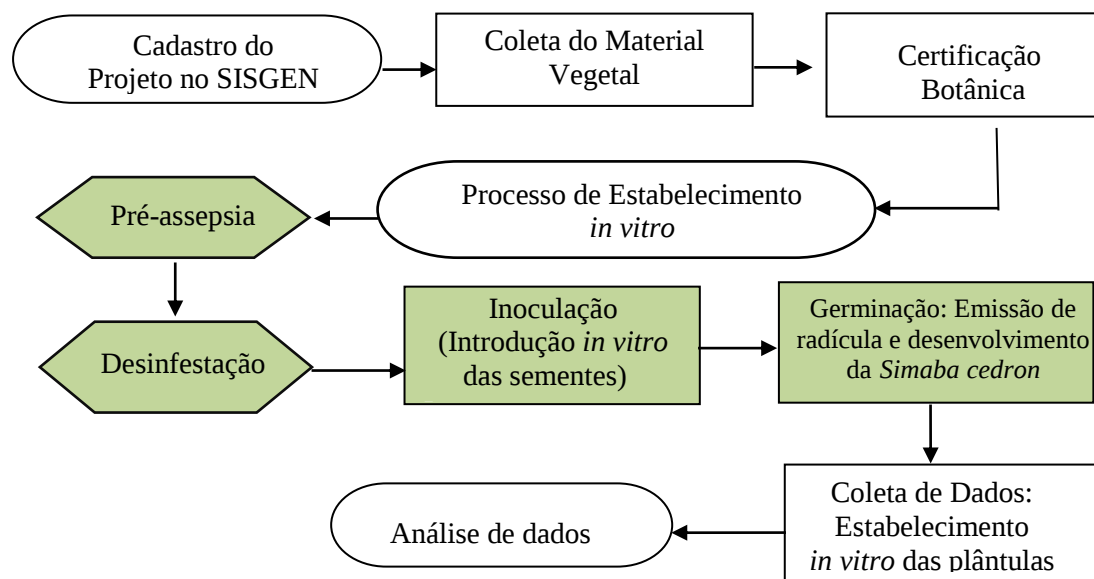


Figura 3.1 - Metodologia utilizada para o processo de estabelecimento da cultura *in vitro* de plântulas de *Simaba cedron*.

3.1.1 - Cadastro do projeto no SisGen

Foi realizado o cadastro do projeto no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob o registro de nº AA09699, conforme a exigência da Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015,

que dispõe sobre bens, direitos e obrigações relativos à pesquisa ou desenvolvimento tecnológico realizado sobre amostra de patrimônio genético do país.

3.1.2 - Coleta do material vegetal

Os frutos maduros da *Simaba cedron* foram coletados de uma planta matriz localizada na área externa do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, situado na área urbana de Manaus-AM, conforme Figura 3.2, e levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais para o início dos procedimentos em laboratório.

Com o auxílio de uma tesoura de corte, esterilizada, os frutos foram colhidos manualmente, armazenados numa cesta e levados até o laboratório para posterior pré-assepsia.

O Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA é uma instituição tecnológica de referência internacional devido ao apoio à pesquisa de inovação tecnológica a partir da biodiversidade Amazônica, com o objetivo de promover a bioeconomia de forma sustentável.

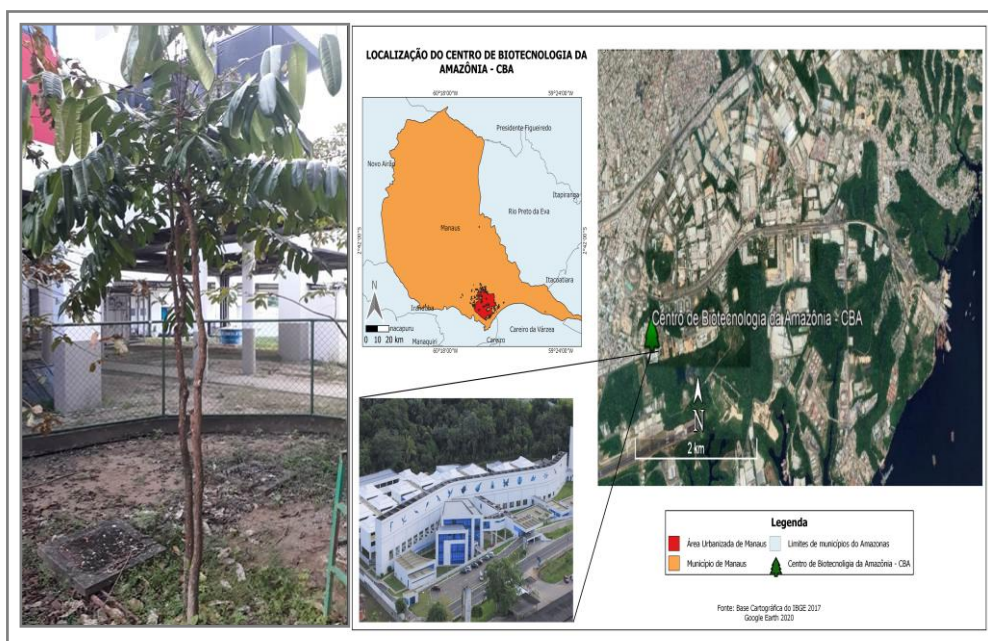


Figura 3.2 - Localização do ponto de coleta.

3.1.3 - Certificação botânica

As Exsicatas de *Simaba cedron* foram preparadas com material vegetal proveniente da planta matriz. A identificação botânica foi realizada por Mariana

Mesquita do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA). A exsicata encontra-se depositada no herbário do INPA sob Registro Botânico nº 287796 conforme anexo II.

3.1.4 - Processo de estabelecimento da cultura *in vitro*

3.1.4.1 - Etapa I - Pré-assepsia^[U1]

Os frutos da *Simaba cedron* foram coletados, de uma planta matriz cultivada no Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA, em Manaus/AM e levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais para os procedimentos de pré-assepsia.

Inicialmente, as sementes foram lavadas em água corrente com detergente líquido (de origem comercial) e, posteriormente, imersas em um Becker contendo água destilada e autoclavada, por 24 horas.

Após este período, as mesmas foram imersas em um Becker contendo solução de detergente comercial, durante trinta minutos sob agitação (em agitador magnético), e, logo após, imersas em água destilada autoclavada, por vinte minutos.

Finalizando-se os procedimentos de pré-assepsia, as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar, para proceder a desinfestação (Figura 3.3).

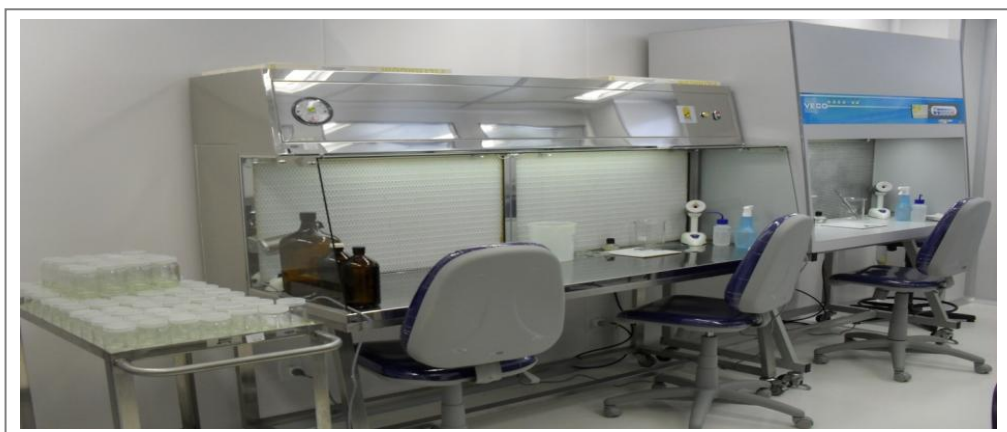


Figura 3.3 - Câmara de fluxo laminar preparada para o processo de assepsia e introdução *in vitro* das sementes.

3.1.4.2 - Etapa II - Desinfestação

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com lavagens sucessivas em álcool 70% durante 5 minutos, seguida de imersão em hipoclorito de

sódio (2% de cloro ativo) por 30 minutos, e lavadas (três vezes) em água destilada estéril, por 5, 5 e 15 minutos (Figura 3.4).

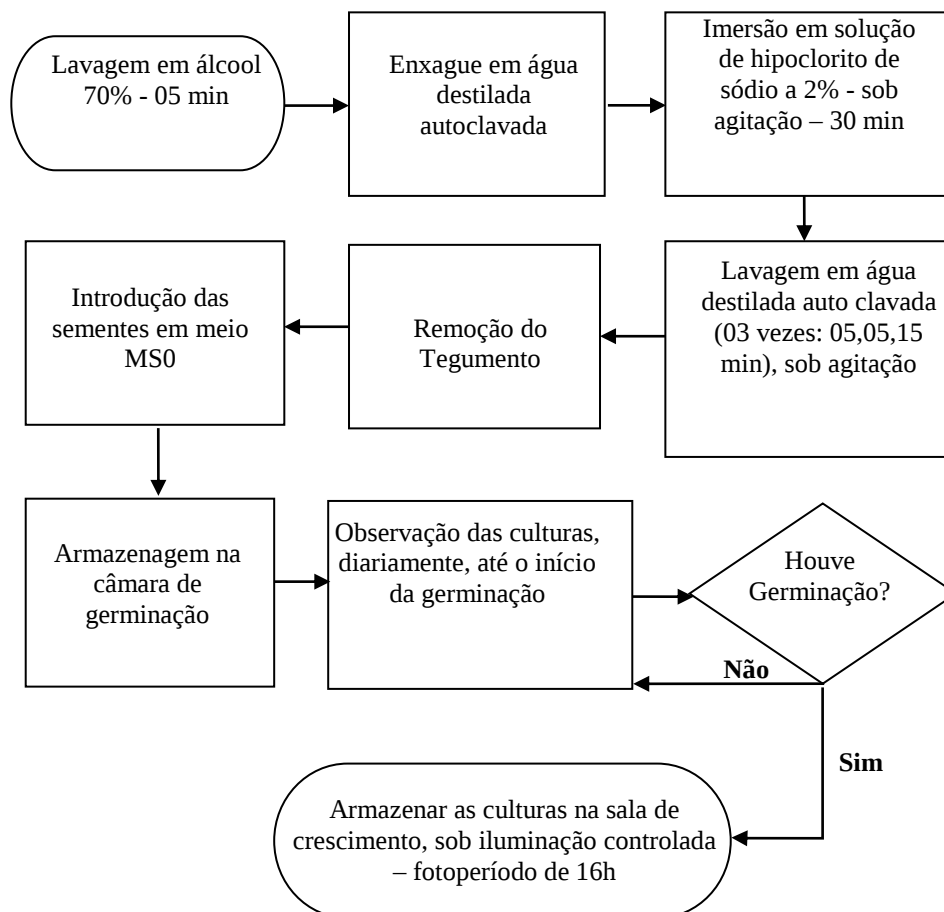


Figura 3.4 - Processo de desinfestação de sementes e estabelecimento *in vitro* das culturas de *Simaba cedron*.

3.1.4.3 - Etapa III - Inoculação (introdução *in vitro* das sementes)

O tegumento das sementes foi retirado e as mesmas foram inoculadas em frascos de vidro (250 mL) contendo 40 mL de meio de cultura semissólido de composição básica segundo MURASHIGE e SKOOG (1962), sem reguladores de crescimento (MS0), suplementado com 3% de sacarose; 4,1 μM de ácido nicotínico; 0,6 mM de mio-inositol; 2,4 μM de piridoxina-HCl; 1,5 μM de tiamina-HCl e solidificado com 2% de phytigel (Figura 3.5). O pH foi ajustado para 5,8 e os meios foram esterilizados em autoclave, a 120 °C e 1,1 Kgf/cm², durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas no escuro, a 25±1°C, durante uma semana. Após este período, foram mantidas em sala de crescimento e desenvolvimento (Figura 3.5)

sob iluminação, com lâmpadas fluorescentes (Sylvania, Phillips/luz do dia) com intensidade de $30,0 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e 16 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias, sendo avaliado o desenvolvimento e a porcentagem de contaminação.



Figura 3.5 - a) Preparo do meio de cultura; b) Sala de crescimento e desenvolvimento do laboratório de cultura de tecidos vegetais do CBA.

3.1.4.4 - Etapa IV - Desenvolvimento *in vitro* de *Simaba cedron*

Durante o desenvolvimento desta etapa do processo, foi avaliado o efeito de diferentes meios de cultura sobre o desenvolvimento da *Simaba cedron*.

Quando as plântulas atingiram a altura máxima livre dos frascos (8 cm), foram utilizadas como doadoras de explantes para os testes com os meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1981) (Tabela 3.1).

Cada explante ou fitômero constituiu-se de uma região nodal, sem folhas, com tamanho aproximado de 1 cm.

Os efeitos dos meios de cultura foram analisados quanto à organogênese de brotos e raízes, após 60 dias de cultivo.

Os meios de cultura são formulações químicas, compostas de água destilada, deionizada e sais minerais, vitaminas e reguladores de crescimento, quando necessários, conforme demonstrados na tabela 3.1.

Os meios de cultura utilizados na pesquisa foram o MS (Murashige e Skoog, 1962) que é universalmente usado, especialmente para morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas, e caracteriza-se pela elevada concentração de sais minerais e o WPM (LLOYD e McCOWN, 1981), amplamente utilizado para propagação de arbustos e árvores, em laboratórios comerciais (QUISEN e ÂNGELA, 2008).

Tabela 3.1 - Composição dos meios de cultura MS e WPM.

Componentes	MS (mg/L)	WPM (mg/L)
Macronutrientes		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	96
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556
KH ₂ PO ₄	170	170
KNO ₃	1900	-
K ₂ SO ₄	-	990
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
NH ₄ NO ₃	1650	400
Micronutrientes		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
FeEDTA		
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	37,3
Orgânicos		
Ácido Nicotínico	0,5	0,5
Glicina	2,0	-
Mio-inositol	100	100
Piridoxina.HCl	0,5	0,5
Tiamina	0,1	1,0
Sacarose (g/L)	30	20

Fonte: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), WPM (LLOYD e McCOWN, 1981).

3.1.5 - Coleta de dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos e três repetições, sendo utilizados 30 explantes para cada tratamento, que foram realizados em triplicata. As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo.

3.1.6 - Análise dos dados

Os dados obtidos quanto ao efeito dos diferentes meios de cultura (MS e WPM) sobre a altura das plântulas, o número de brotos e de segmentos nodais por broto e a taxa de multiplicação foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de significância 5%.

Estas análises foram efetuadas utilizando-se o *Graph Pad in Stat*, versão 3,01. Para a análise das porcentagens de germinação e enraizamento, conforme o meio utilizado, foi usado o teste de diferença entre porcentagens (p_1 e p_2) ao nível de 5% de significância utilizando-se o Software Statistica for Windows TM, versão 5.0.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - ESTABELECIMENTO DA CULTURA *IN VITRO*

Diariamente, as sementes inoculadas foram observadas a olho nu por vários ângulos, objetivando verificar o nível de contaminação oriunda de microrganismos do próprio vegetal ou de procedência operacional. As plântulas que apresentaram visualmente algum tipo de contaminação foram retiradas da sala de crescimento de forma gradual, levadas para a autoclave procedendo-se sua descontaminação e posterior descarte.

Após cinco dias de cultivo, foi verificado que 75% das sementes apresentaram-se assépticas (Figura 4.1), destas 100% germinaram, as quais posteriormente foram utilizadas como doadoras de explantes para o início da cultura a partir da obtenção das primeiras plântulas assépticas.



Figura 4.1 - Taxa de desinfestação das sementes de *Simaba cedron*.

Considerando que esse delineamento experimental foi inteiramente casualizado e que não há na literatura outros estudos desse tipo aplicado à espécie *Simaba cedron*, os resultados obtidos foram comparados com experimentos análogos a outras espécies da mesma família.

SILVA (2015), ao realizar experimentos com a espécie *Quassia amara*, obteve taxa de desinfestação de 28% e, das sementes desinfestadas, 83% germinaram, em meio

MS0. Quando tais resultados são comparados aos obtidos com a *Simaba cedron* (75%), observa-se que o mesmo foi bem superior à taxa de desinfestação obtida pela autora.

SILVA (2009), ao realizar os testes de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de *Picrolemma sprucei*, utilizou o antibiótico Timentin® 3,0 g + 0,1 g (ticarcilina dissódica + clavulanato de potássio), na concentração de 75 g/100 mL para uso no meio de cultura, onde obteve uma taxa de desinfestação das sementes de 60,0%, cujo início da germinação foi observado após 32 dias.

Relativamente ao gênero *Picrolemma sprucei*, pode-se inferir que o tempo de germinação foi tardio quando comparado ao início de germinação da *Simaba* aqui estudada que foi de 05 dias, respondendo de forma positiva ao processo novo iniciado. Além disso, o referido autor precisou utilizar antibiótico em seu processo de desinfestação, artifício que tornou o seu processo de desinfestação mais oneroso que o apresentado neste trabalho.

A quebra de dormência tegumentar e a pré-asepsia das sementes possibilitam o estabelecimento *in vitro* de plantas de *S. cedron*. O hipoclorito pode ter atuado como estimulante da germinação, em razão da capacidade de estimular a atividade da α -amilase pelo aumento da quantidade dessa enzima na semente, ou ainda, pelo fato de promover a quebra da dormência das sementes em algumas espécies (KANEKO e MOROHASHI, 2003).

4.2 - EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA PLÂNTULA

4.2.1 - Alongamento da plântula

Foi avaliado e comparado alongamento das plântulas desenvolvidas nos dois meios de cultura (WPM e MS).

Observou-se que ocorreram diferenças significativas entre tais meios de cultura para o comprimento da parte aérea de *S. cedron*, pois, ao utilizar o meio MS obtiveram-se plântulas com altura média de 4,8 cm, enquanto as cultivadas em meio WPM tiveram um crescimento de 2,4 cm (Figuras 4.2 e 4.3; Tabela 4.1).

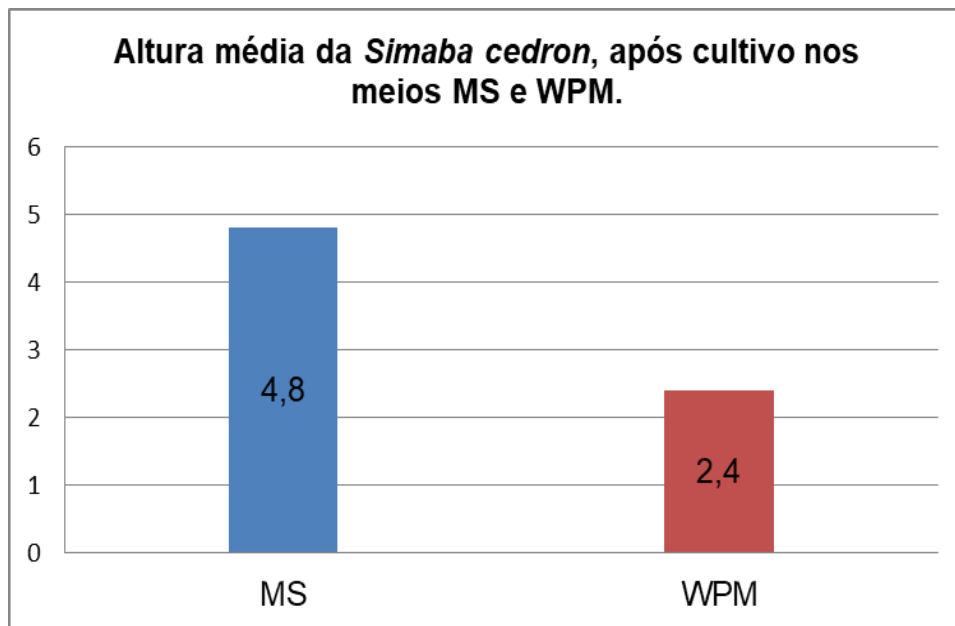


Figura 4.2 - Altura média da *Simaba cedron*, após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM ao Meio de Cultura MS.



Figura 4.3 - *Simaba cedron*, após 60 dias de cultivo em meio MS.

Tabela 4.1 - Efeitos dos meios de cultura MS e WPM no cultivo *in vitro* de *Simaba cedron* (n=30), em 60 dias.

Parâmetros avaliados	MS	WPM
Altura (cm)	4,8 ^a	2,4 ^b
Número de brotos	1,5 ^a	1,3 ^a
Número de segmentos nodais por broto	8,0 ^a	3,0 ^b
Taxa de multiplicação	8,0:1,0 ^a	3,0:1,0 ^b
Taxa de enraizamento (%)	75 ^a	0 ^b
Taxa de calogênese (%)	38 ^b	70 ^a

*Letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística a nível de 5%.

Em relação aos parâmetros avaliados observou-se que a altura da *Simaba cedron* no meio de cultura MS foi de 4,8cm e no WPM de 2,4cm, sendo que o meio MS apresentou o dobro da altura do WPM, mostrando um resultado com mais eficácia do que no meio WPM.

Referente ao número de brotos, o meio de cultura MS apresentou uma produção média de 1,5 e o WPM de 1,3, verificou-se a diferença quantitativa foi baixa, um resultado não significativo no comparativo entre os dois meios de cultura.

Quanto ao número de segmentos nodais por broto, o meio MS apresentou o quantitativo de 8,0 unidades e o WPM de 3,0 unidades, verificando-se que o resultado obtido com o MS foi quase 3 vezes maior do que o produzido no WPM, representando positivamente a influência do meio do cultivo MS.

Tratando-se da taxa de multiplicação, note-se que no meio MS o percentual obtido foi de 8,0:1,0 e o meio WPM apresentou uma taxa de 3,0:1,0, relativamente baixa quando comparado ao primeiro.

A taxa de enraizamento verificada no MS foi de 75%, já no WPM foi 0%, o resultado desperta a atenção, porque universalmente esse meio de WPM é utilizado para plantas lenhosas conforme aponta a literatura.

Com relação à taxa de calogênese, pode-se inferir que foi relativamente baixa no meio MS, apenas de 38%, já no meio WPM foi 70%. No entanto, para o objetivo do estudo esse resultado não influencia negativamente nos resultados, uma vez que a proposta é o estabelecimento de uma etapa do processo para o desenvolvimento de

cultivo *in vitro* de plântulas, comparando os dois meios que são utilizados para multiplicação e mantendo-se o padrão genético da linhagem no estabelecimento do processo.

Ao elaborar o protocolo de cultura de tecidos de *Quassia amara* em meio MS, SILVA (2015), obteve plântulas que atingiram, em média 5,23 cm, aos 60 dias de cultivo, enquanto as cultivadas em meio WPM deram origem a plântulas com altura média de 1,39 cm.

LENCINA *et al.* (2014), ao realizar experimentos com grápia (*Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride) observou que não houve diferença significativa entre os meios de cultura WPM, MS e MS ½ para o comprimento da parte aérea, número de folhas e comprimento da raiz, após 15 dias de cultivo.

Em plantas de *Cordia trichotoma*, foi verificado crescimento da parte aérea (1,6 cm) e da raiz (7,3cm) significativamente superior nos cultivos em meio WPM, se comparados àqueles realizados em meio de cultura MS ½ (0,7 e 1,3 cm respectivamente), aos 28 dias de avaliação (FICK, 2007).

4.2.2 - Organogênese de brotos

Em relação ao brotamento, os resultados obtidos com o meio MS mostraram-se estatisticamente semelhantes aos obtidos com o WPM, com produção média de 1,5 e 1,3 brotos, por explante, respectivamente (Figura 4.4 e Tabela 4.1).

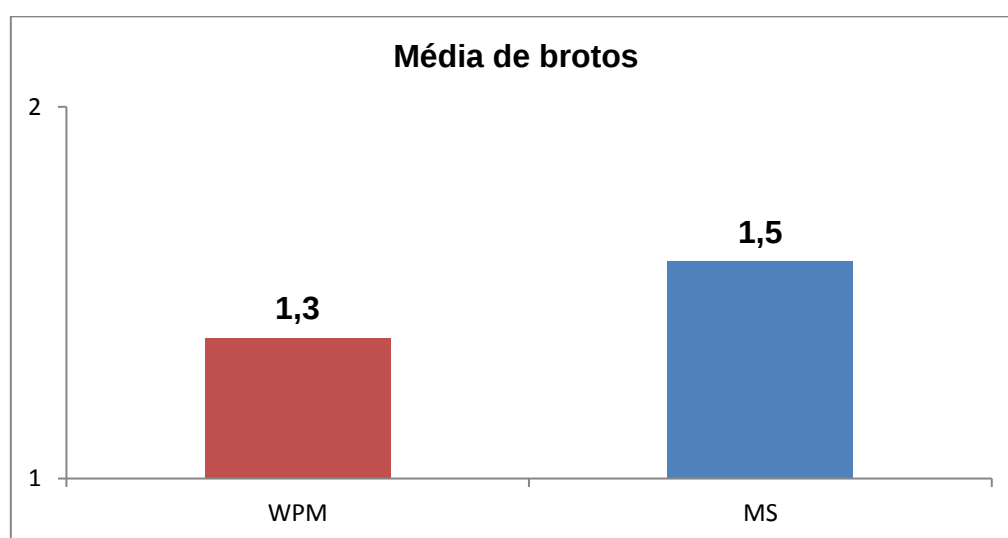


Figura 4.4 - Produção média de brotos de *Simaba cedron*, após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM.

4.2.3 - Formação de segmentos nodais (gemas)

Os resultados obtidos demonstram que o meio MS mostrou-se superior para a formação de gemas, quando comparado com o meio WPM, onde foram observadas a formação de 8 e 3 segmentos nodais, respectivamente, aos 60 dias de cultivo (Figura 4.5).

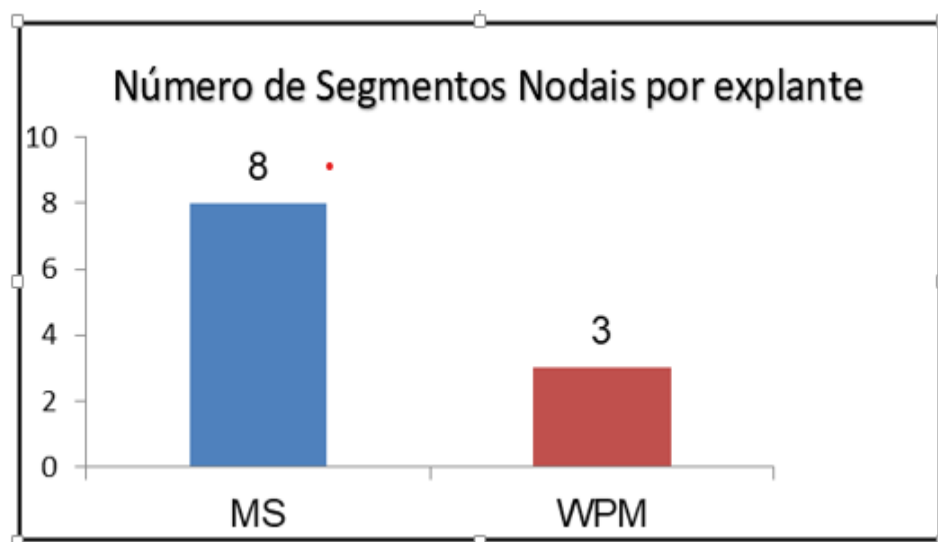


Figura 4.5 - Produção média de segmentos nodais de *Simaba cedron*, após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM.

Na micropropagação, plantas que apresentam maior número de segmentos nodais ou gemas axilares são preferidas, ao se considerar que esses tipos de propágulos possuem menor variação somaclonal e epigenética (TORRES *et al.*, 1999). Neste estudo, houve diferença significativa entre os meios de cultura MS e WPM para o número de segmentos nodais (Tabela 4.1), indicando que o meio de cultura influenciou o crescimento *in vitro* das plântulas de *Simaba*, onde o meio MS levou ao desenvolvimento de plântulas com, em média, 8 segmentos nodais, cada. Enquanto ao meio WPM promoveu o desenvolvimento médio de 3 segmentos nodais por plântula.

Entretanto, o meio de cultura WPM foi utilizado nos experimentos por causa da sua formulação, que foi desenvolvida especialmente para espécies lenhosas e apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS (MELO *et al.*, 1999), estimulando o crescimento *in vitro* pelas baixas concentrações de nitrogênio na forma amoniacal (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Além disso, o meio de cultura

WPM possui maior quantidade da vitamina tiamina – HCl, se comparado ao meio de cultura MS (Tabela 3.1).

A tiamina é apontada como uma substância benéfica para a multiplicação *in vitro*, possibilitando maior indução de brotos em explantes de espécies arbóreas (MANTOVANI e FRANCO, 1998), justificando, deste modo, sua utilização nestes experimentos.

Comparado ao meio de cultura MS, o meio WPM se mostrou mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de plantas de açoita cavalo (*Luehea divaricata* MART. E ZUCC.), no qual foi observado maior número de segmentos nodais por broto (4,9) e maior enraizamento dos explantes (66,8%), aos 60 dias de avaliação (FLORES, 2007).

4.2.4 - Taxa de multiplicação

Com relação à taxa de multiplicação, o melhor resultado foi obtido em plântulas cultivadas no meio MS0, onde foi observada a produção de, em média, 8,0 novas plântulas por explante, após 60 dias de cultivo, enquanto o no meio WPM foi observado 3,0 novas plântulas por explante (Figura 4.6).

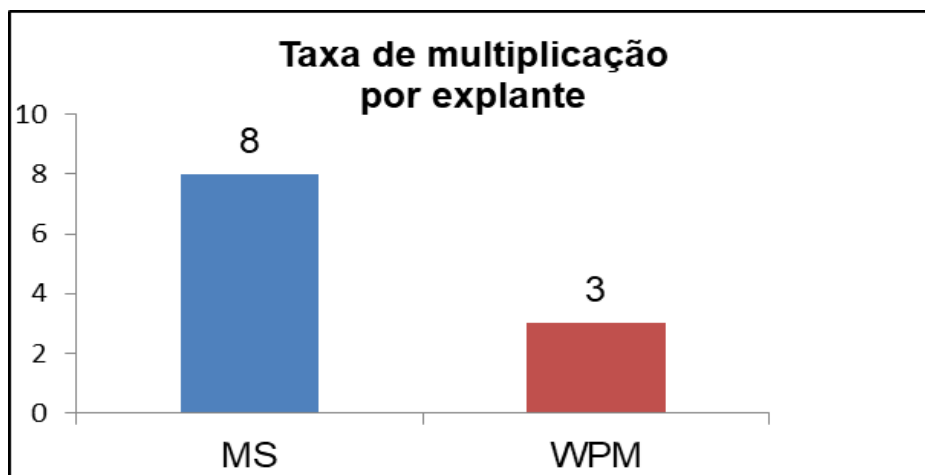


Figura 4.6 - Taxa de multiplicação da *Simaba cedron*, após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM.

HASSAN *et al.* (2012), relatam que ao trabalhar com *Eurycoma longifolia*, espécie da mesma família botânica da Simaba, obtiveram maior taxa de multiplicação em MS0 do que em WPM.

SILVA (2015) obteve taxa de multiplicação de 3,75:1 ao realizar o cultivo de *Quassia amara*, durante 60 dias em meio MS, enquanto as plântulas cultivadas em meio WPM geraram uma taxa de multiplicação de 3,05:1.

4.2.5 - Enraizamento

Quanto ao enraizamento das plântulas, a taxa máxima de enraizamento (75%) foi obtida em meio MS0. Já o meio WPM não promoveu enraizamento, em 60 dias de cultivo (Figura 4.7 e Tabela 4.1).

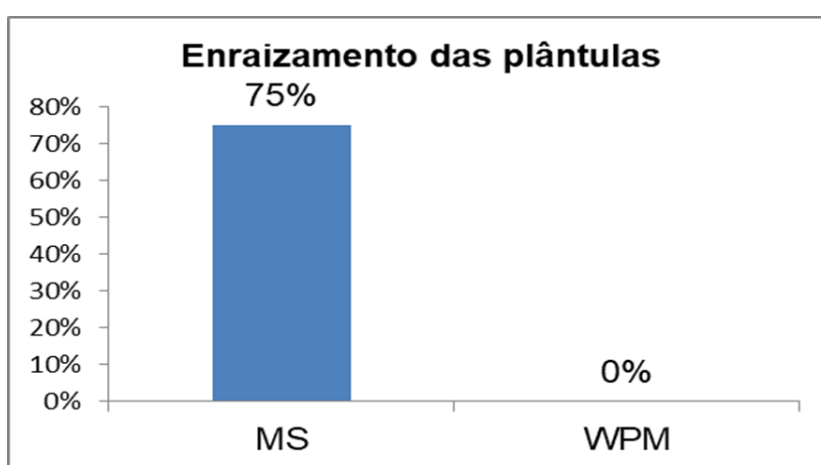


Figura 4.7 - Taxa de enraizamento *in vitro* de plântulas de *Simaba cedron*.

O enraizamento *in vitro* depende do genótipo da planta, podendo ocorrer naturalmente, durante o processo de micropropagação, de modo que o uso de reguladores de crescimento nos meios de cultura possa ser evitado (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). O meio MS ½ foi utilizado na análise do processo de enraizamento *in vitro* de *E. longifolia*, uma vez que foi observado que a concentração de sais minerais mais baixas auxiliam o aumento da percentagem de enraizamento, do comprimento e número de raízes em outras espécies.

No entanto, a reação pode variar entre cultivares da mesma espécie. Foi sugerido que a proporção de compostos de carbono / nitrogênio e nitrogênio no metabolismo das auxinas afeta o processo de enraizamento. Por outro lado, nutrientes limitados podem afetar a produção e desenvolvimento de todo o sistema radicular de plantas *in vivo* (KARHU, 1997).

SILVA (2015), ao trabalhar com *Q. amara*, obteve 25% de enraizamento ao utilizar o meio MS e nenhum indício de formação de raízes com a utilização do WPM.

A fonte e dose de açúcares no meio de cultura também podem interferir no desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies medicinais. No caso do marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), o enraizamento *in vitro* pode ser favorecido pela concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura (ERIG *et al.*, 2004).

4.2.6 - Calogênese

Quanto à formação de calos, ela ocorreu em todos os tratamentos testados, porém no meio WPM foi observada em 70% dos explantes (Figura 4.8 e Tabela 4.1). A referida taxa de calogênese pode ser atribuída à adaptação dos explantes às condições de cultivo *in vitro*, como relata OLIVEIRA *et al.* (2000).

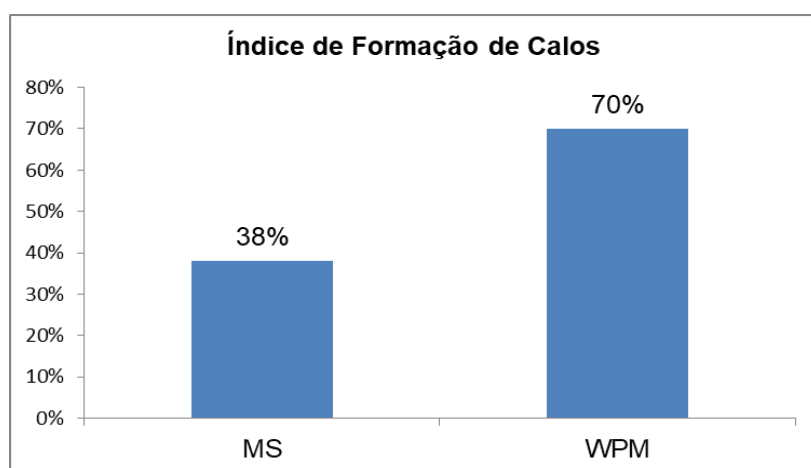


Figura 4.8 - Taxa de calogênese da *Simaba cedron*, após 60 dias de cultivo nos meios MS e WPM.

A etapa de estabelecimento *in vitro*, que antecede as fases do cultivo *in vitro* propriamente dito, é fundamental para o sucesso no desenvolvimento de um sistema de micropropagação, principalmente para espécies lenhosas nativas. A composição do meio de cultura, em relação aos macros e micro elementos e dos elementos orgânicos são fundamentais. Neste sentido, ao iniciar um processo biotecnológico com células vegetais, deve-se, em primeira instância, estabelecer a formulação adequada do meio que será utilizado (DRAPEAU *et al.*, 1986).

A micropropagação ou propagação *in vitro* tem a finalidade de produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária e tem contribuído para impedir a

extinção de muitas espécies vegetais (STANCATO *et al.*, 2001). Pelo fato das plantas trabalhadas serem geneticamente padronizadas, pode-se eliminar a interferência da variabilidade genética nos resultados. Consequentemente, os resultados obtidos são efeitos das variáveis introduzidas no processo pelo experimentador (SILVA e ASTOLFI FILHO, 2018).

Conforme defendido por GONÇALVES *et al.* (2013), o estudo da variação biométrica de sementes é fundamental para o conhecimento das informações das plantas visando a conservação e exploração da espécie. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo servem como base para auxiliar na escolha de genitores que tenham características para manutenção fitossanitária de espécies comerciais, como também para manutenção de futuros programas de melhoramento genético (SILVEIRA *et al.*, 2019).

No estudo desta planta, pode-se considerar que as sementes podem ser o meio principal de propagar esta espécie, bem como, o processo de estabelecimento de sobrevivência *in vitro* destas condições laboratoriais, pois, quanto maior o número de sementes por fruto, maior a probabilidade de deixar descendentes.

Apesar da importância econômica e ambiental da espécie em estudo, a espécie *Simaba cedron* é pouco estudada, mesmo para os parâmetros básicos das características morfológicas da planta é uma espécie recentemente descrita na literatura, com referências bibliográficas escassas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 - CONCLUSÕES

O processo de desinfestação utilizado garantiu a assepsia de 75% das sementes, porém é possível melhorar esta porcentagem, através de novos experimentos relacionados às concentrações e tempos de imersão nos agentes desinfestantes. O meio MS0 pode ser considerado o mais indicado para o desenvolvimento das demais etapas da micropropagação desta espécie, pois neste meio as plantas tiveram uma taxa de multiplicação de 8,0:1 e 75% de enraizamento dos explantes, aos 60 dias de cultivo.

5.2 - SUGESTÕES

Devido à demora no desenvolvimento de plantas lenhosas, sugere-se a continuidade destes estudos para o desenvolvimento de todo o ciclo que abrange o desenvolvimento de protocolo para produção de mudas micropropagadas da referida espécie. Neste sentido, são apresentadas, a seguir, algumas sugestões para a continuação do presente trabalho:

Devido à grande abrangência do assunto abordado neste estudo, são apresentadas, a seguir, algumas sugestões para a continuação do presente trabalho:

- Elaboração de protocolo de multiplicação *in vitro* de plântulas de *Simaba cedron*;
- Elaboração de protocolo de aclimatização de *Simaba cedron* ao ambiente *ex vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, v. 30, n. 4, pp. 935-951, 2007.

ALVES, L. A. B. S., *et al.* *Simaroubaceae* Family: botany, chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, pp. 481-501, 2014.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas, 2013, Niterói. **Rev. Virtual Quim.** Disponível em: <<http://rvq.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/414>>. Acesso em: 07 de outubro de 2019, 10h18min.

ALVIM, N. A. T. *et al.* O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-americana de enfermagem**, v. 14, n. 3, 2006.

ANDRADE, M. W. *et al.* Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, pp.174-80, 2000.

ARNALDOS, T. L. *et al.* Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v.113, n.3, pp.315-22, 2001.

BONTE, F.; MEYBECK, A.; DUMAS, M. 1994, 1995 e 1997. **Patente nº US 5676949; EP 0673237 e WO/1994/013259**. Use of a simaba extract to reduce patchy skin pigmentation, enhance the protective function of the skin or prepare a skin cell culture medium and resulting composition.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Centro de Informação das Nações Unidas para o Brasil. **Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**, última edição em 25 de setembro de 2015. Disponível em: <http://www.itamaraty.gov.br/images/ed_desenvsust/Agenda2030-completo-site.pdf>. Acesso em: 28 de setembro de 2019, 21h30min.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, pp. 87-132, 1998a.

CAVALCANTE, P.B. Revisão taxonômica do gênero *Simaba* Abul. (*Simaroubaceae*) na América do Sul. **Publicações Avulsas do Museu Paraense Emílio Goeldi**. 1983.

DEVECCHI, M.F. & PIRANI, J.R. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: *Simaroubaceae*. **Rodriguésia**. 67, n. 5 (Especial), pp. 1471-1476, 2016.

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, v. 107, n. 2, pp. 194-199, 2006.

DRAPEAU, D., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 28, pp. 1555-1563, 1986.

ELDIN, S., DUNFORD, A. **Fitoterapia: na atenção primária à saúde**. 1.ed. São Paulo: Manole, 2001.

ERIG, A. C. *et al.* Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. mc e adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v.5, n.1-2, pp.61-68, 2004.

FICK, T. A. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de Louro-Pardo. **Ciência Florestal**. v. 17. n. 4. pp. 343-349, 2007.

FIRMO, W. C. A. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, pp. 90-95, 2011.

FLORES, A. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

FORZZA, R. C. *et al.* Instituto de pesquisas jardim botânico do rio de janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, Rio de Janeiro. v. 2, 2010.

GEORGE, E.F., SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Exegetics, Bassingstokes. pp. 71- 83, 1984.

GONÇALVES, L.G.V. *et al.* Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, pp. 31-40, 2013.

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, CBAB/EMBRAPA, v. 1, pp. 183-260, 1998.

GUPTA, M.P. *et al.* Ethnopharmacognostic observations on Panamanian medicinal plants. Part. I. **Quarterly Journal of Crude Drug Research**, v.17, pp.115-130, 1979.

HASENCLEVER, L. *et al.* A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, 22(8), pp. 2559-2569, 2017.

HASSAN, N.H. *et al.* Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 26, p. 6818-6825, 29 March, 2012.

HITOTSUYANAGI, Y.; *et al.* Cedronolactone E, a novel C(19) quassinoid from *Simaba cedron*. *J. Nat. Prot.*, v. 64, n. 2, p. 1583-1584, 2001.

JAIME P. R. B. **Simaba Cedrón**. Propiedades médica y preparaciones farmacêuticas de dicha planta. Ed.119. Madri: Imprenta de F. Garcia Herrero, 1884.

KANEKO, K; MOROHASHI, Y. Effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. **Plant Science**, v. 164, p. 287-292, 2003.

KARHU, S. T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v. 48, p. 153-159. 1997.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. 2nd Ed., p. 519-531, 1999. Brasília: Embrapa, 1999.

LEME, C.L.D. Wood anatomy of seven species known as "pau-para-tudo" in Brazil. **Cerne**, v. 22, n. 3, p. 261-270, 2016.

LENCINA, K.H. *et al.* Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grábia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 1025-1030, jun, 2014.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1981.

MACIEL, M.A.M., *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, pp. 429-438, 2002.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MACKEE, R.A. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. **Revista Brasileira de Genética**, 1994.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: Centro de Pesquisas Florestais, UFSM, Serie Técnica, v. 12, pp.132, 1998.

MELO, N.F. de et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC). **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.1, p. 102-107, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. 2006, Brasília. **Série B. Textos básicos de saúde**. Brasília, 2006. Disponível em < https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/politica_nacional_fitoterápicos.pdf>. Acesso em: 15 de janeiro de 2020, 22h40min.

MORAIS, T. P. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MORETTI, C *et al.* Antimalarial activity of cedronon. *J. Ethnopharmacol.*, v. 43, n. 1, pp. 57-61, 1994.

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

MURGU, M. **Metodologia de Análise de Quassinóides: Cromatografia e Espectrometria de Massas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil. 1998.

NOLDIN, V.F. Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de *Simaba ferruginea* St. Hil. e avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isolados. 2005.

NUNOMURA, R. C. S. **Estudo fitoquímico de *Simaba polyphylla* (Cavalcante) Thomas e *Simaba guianensis* subesp. *ecaudata* (Cronquist)**. 2005. 247f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

NUNOMURA, R. C. S. *et al.* Constituintes químicos dos galhos de *Simaba guianensis* subesp. *ecaudata* (Cronquist). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2153-2158, 2012.

OLIVEIRA, R.P.; GOMES T.S.; VILARINHOS, A.D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 2329-2334, 2000.

OZEKI, A. *et al.* Cytotoxic quassinoids from *Simaba cedron*. J. Nat. Prod., v. 61, n. 6, p. 776-780, 1998.

PIRANI, J. R., THOMAS, W. W. Duas novas espécies de *Picramnia* (*Simaroubaceae*) para a flora do norte do Brasil. Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi. v. 20, pp.179-202, 1988.

PLANCHON, J.E. **Revue de la famille Simaroubées**. In. Hooker.Journ. Bot. 5. 560-567, 1846.

POLONSKY, J. **Fortschr. Chem. Org. Nat**, 1973, v. 30, 101p.

SARAIVA, R.C.G. *et al.* Triterpenes and a canthinone alkaloid from the stems of *Simaba polyphylla* (Cavalcante) W.W. Thomas (*Simaroubaceae*). **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 264-268, 2006.

SARAIVA, Sarah Raquel Gomes Lima *et al.* A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no brasil: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação**, v. 1, n. 1, 2015.

SILVA, S. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Scientia Amazonia**, v.4, n.2, 92-99, 2015.

SILVA, C.F.N. **Efeitos de substâncias elicitoras sobre o acúmulo de metabólitos secundários em plantas jovens de *picrolemma sprucei hook. F.* (simaroubaceae), uma espécie medicinal da Amazônia utilizada contra a malária.** 2009. 116f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2009.

SILVA, S.; ASTOLFI FILHO, S. Effect of indolebutyric acid on *in vitro* root production of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Fitos**, v. 12, n. 3: 218-226, 2018.

SILVEIRA, G. F. *et al.* Análise biométrica de frutos e sementes de *Passiflora cristalina* Vanderplank & Zappi. **Revista Nativa**, v. 7, n. 2, pp. 138-144, 2019.

SOUSA, R. M.; OLIVEIRA, J.S.; CHAVES, M. H. Prospecção científica e tecnológica do gênero *Simaba* Aubl. (Simaroubaceae). **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 6, n. 3, pp. 3343-3355, 2016.

SOUZA, L. M., SILVA, M.M.A., ARAUJO, J.S. Aclimatização de mudas de palma forrageira como fazer? **Instituto Nacional do Semiárido**. Campina Grande – PB, 18p., 2015.

STANCATO, G. C., BEMELMANS, P.F, VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.7, n. 1, pp. 25-33, 2001.

QUISEN, R. C., ÂNGELA, P.C.S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**, v. III, Título IV. Série. P.44., 2008.

TORRES, A. C. *et al.* **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 2, pp. 517, 1999.

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

VIEIRA, M. L. C. Conservação de Germoplasma in vitro. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, 2000.

VILLA, F. *et al.* Cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação *in vitro* de amoreira preta cv. Tupy. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 37-41, 2008.

VILLA, F. *et al.* Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1, modificado com fontes de boro e zinco. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 468-472, mar./abr., 2009.

WHO - World Health Organization. **Selected medicinal plants**. Volume 2. Geneva: Organização Mundial de Saúde, 2002.

ANEXO I

PROTOCOLO DE CERTIFICAÇÃO BOTÂNICA



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Plantas - Amazonas

INPA Nº 287796

SIMAROUBACEAE

n. vulg.: pau-pra-tudo

Simaba cedron Planch.

Arvoreta, caule fino sem ramificação. Folhas adensadas na parte terminal do caule, pecíolo dilatado na base; folíolos opostos, coriáceos, glabros em ambas as faces, estreito-oblongos, sésseis ou peciolulados, base obtusa ou assimétrica, ápice acuminado; inflorescência paniculada; flores dispostas em nódulos ao longo dos ramos da inflorescência, de pétalas cor amarelo-clara; cálice cupuliforme; brácteas na base do fascículo.

Brasil, Amazonas, Manaus, Centro de Biotecnologia da Amazônia: Área externa, em frente às casas de vegetação.

Terra firme.

3°13'81" S, 59°98'34" W Alt: 42m

Lira, M.S.F. 1

com: Padilha, F.J.; Assunção, L.M. & Pinheiro, E.N.

Data: 7 ago 2020

ANEXO II

REGISTRO DO ARTIGO DESTA DISSERTAÇÃO PUBLICADO

		
International Journal for Innovation Education and Research		
ISSN: 2411-2933		
		
Process of Establishment And In Vitro Development of Simaba Cedron Planch Seedlings. (Simaroubaceae)		
Abstract Marcia Santos de Freitas Lira; Simone da Silva; Fábio Leandro Calderaro; Jandecy Cabral Leite		
Abstract		
Simaba cedron, popularly known as "cedron", is largely used for fever and snake bites. Its seeds are used in the treatment of stomach problems and liver infections. The fruits are used for the treatment of pain and malaria while its bark is an antispasmodic. Simaba cedron is generally propagated through seeds, but with limited success, as the low viability of same restricts its propagation. In view of such difficulty, it becomes necessary the study for adequate conditions for the large scale production of these seedlings. Being it known that in several species, the use of micropropagation has made it possible to obtain a large amount of disease-free and more homogeneous seedlings, in reduced time and physical space, in comparison with conventional propagation methods, the objective of this work was to analyze the effect of two culture media on the production of aseptic parent plants as a first step in the development of a micropropagation protocol for Simaba cedron. The seeds were collected from a matrix plant located in the Amazon Biotechnology Center (CBA), in Manaus/AM. The experiment was installed at the Vegetable Tissue Culture Laboratory, where the explants were disinfested and grown in culture medium according to Murashige & Skoog (MS) and in Wood Plant Medium (WPM), during 60 days. The disinfestation rate obtained was 75% and, of the disinfested seeds, 100% germinated. The cultivation medium that was more favorable to the cultivation of simaba was the MS, where the multiplication rate was of 8.0: 1, whose seedlings reached, in average, 4.8 cm and 75% of rooting.		
Keyword: Plant tissue culture; Micropropagation; Plant production and Biotechnology.		
Published Date: 8/1/2020	Page: 748-759	Vol 8 No 08 2020
DOI: https://doi.org/10.31686/ijer.vol8.iss8.2585		

Process of Establishment And In Vitro Development of Simaba Cedron Planch Seedlings. (Simaroubaceae)

Abstract Marcia Santos de Freitas Lira

Federal University of Pará (UFPA),
Belém - PA, Brazil.

Simone da Silva

Amazon Biotechnology Center (CBA),
Manaus - Amazonas, Brazil.

Fábio Leandro Calderaro

Amazon Biotechnology Center (CBA),
Manaus - Amazonas, Brazil.

Jandecy Cabral Leite

Institute of Technology and Education Galileo Amazon (ITEGAM),
Manaus - Amazonas, Brazil.

Abstract

Simaba cedron, popularly known as "cedron", is largely used for fever and snake bites. Its seeds are used in the treatment of stomach problems and liver infections. The fruits are used for the treatment of pain and malaria while its bark is an antispasmodic. *Simaba cedron* is generally propagated through seeds, but with limited success, as the low viability of some restricts its propagation. In view of such difficulty, it becomes necessary the study for adequate conditions for the large scale production of these seedlings. Being it known that in several species, the use of micropropagation has made it possible to obtain a large amount of disease-free and more homogeneous seedlings, in reduced time and physical space, in comparison with conventional propagation methods, the objective of this work was to analyze the effect of two culture media on the production of aseptic parent plants as a first step in the development of a micropropagation protocol for *Simaba cedron*. The seeds were collected from a matrix plant located in the Amazon Biotechnology Center (CBA), in Manaus/AM. The experiment was installed at the Vegetable Tissue Culture Laboratory, where the explants were disinfested and grown in culture medium according to Murashige & Skoog (MS) and in Wood Plant Medium (WPM), during 60 days. The disinfestation rate obtained was 75% and, of the disinfested seeds, 100% germinated. The cultivation medium that was more favorable to the cultivation of *simaba* was the MS, where the multiplication rate was of 8.0: 1, whose seedlings reached, in average, 4.8 cm and 75% of rooting.

Keywords: Plant tissue culture; Micropropagation; Plant production and Biotechnology.

1. Introduction

The Simaroubaceae family consists of approximately 32 genera and 200 species, distributed in all tropical and subtropical regions of the globe. In Brazil it is represented by *Quassia* and *Picrolemma* genera in the Amazon region; *Castela* and *Picrasma*, in the South of the country; *Simaba* and *Simarouba* in almost all Brazilian (Hall *et al.*, 1983; Devecchi, 2018). *Simaroubaceae* usually appear as trees or shrubs, with a distinctive bitter flavor in their cortex (Kletter and Kriechbaum, 2001; Seth, 2003; Vermeulen, 2008). So, many species of this family (*Quassia amara*, *Picrasma excelsa*, *Jamaica quassia*) have been known for more than a century due their bitter substances denominated “quassina”, a name borrowed to all this class of composites structurally related, called quassinóides (Polonsky, 1973).

Simaba cedron Planch popularly known as cedron, it is widely used for the treatment of fevers and snake bites. Its seeds are used to treat stomach problems and liver infections (Kufer, 2005; Ocampo and Mora, 2011; Giovannini and Howes, 2017). The fruits are used for colic and malaria treatment, while the peel is used as an antispasmodic (Gupta, 1995). Ext *Simaba* extracts, from the species *Simaba cedron* (Planchon), *S. cuspidata* (Spruce), *S. moretii*, *S. multiflora* (Adr. Juss), *S. guyanensis* (Alblet Engl.) are used in the manufacture of cosmetic or pharmaceutical composition and, particularly dermatological, or in cell culture medium of the skin due to their significant activity on the depigmentation of the skin and in the differentiation of keratinocytes, and can be used in the treatment of skin disorders, in particular vitiligo and psoriasis (Bonte *et al.*, 1997).

Simaba cedron is generally propagated by seeds, which can bring about genetic variations that, consequently, influence the content of the active principles present in plants. For many forest species of economic importance or in danger of extinction, micropropagation has been a useful tool for obtaining more uniform seedlings on a large scale, in reduced time and space (Dousseau *et al.*, 2008). *In vitro* cultivation, through micropropagation, is a viable method for the multiplication of several native species, providing the formation of homogeneous plant populations, thus enabling the production of seedlings with high health and vigor. (Souza *et al.*, 2007).

Several criteria are important for the establishment of *in vitro* cultures, such as the choice of explant type and nutrient medium. Although, theoretically, any tissue can be used as a source of explant, some aspects must be considered and tested regarding the choice of the most suitable to the morphogenic processes of interest (Grattapaglia and Machado, 1998).

In micropropagation, the use of efficient methods of disinfection and germination, *in vitro*, of seeds, allows obtaining aseptic plants that supply contaminant-free propagules which can be used for multiplication and later rooting *in vitro* or *ex vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998). Several substances have been used for the disinfection of seeds of tree species, among which the hypochlorite (sodium or calcium) stands out, due to the ease of removing the tissue from the seeds during washing with water, by favoring germination due to the ability to stimulate α -amylase activity and, furthermore, by promoting the breaking of dormancy of the seeds of some species (Kaneko and Morohashi, 2003). As for nutritional means, there exist distinct formulations that must be adjusted to each species. The MS medium (Murashige & Skoog, 1962) and their dilutions are usually the most used. However, there are formulations specific to certain groups of plants, such as, for example, the WPM medium (Lloyd and McCown, 1981), more

common in woody species (Caldas *et al.*, 1998).

In an attempt to optimize the *in vitro* growth of plant tissues, several studies propose the reduction or increase of some macro and/or micronutrients that compose these culture media, better meeting the nutritional requirements of each species, such as the 23 modified media for black mulberry (*Rubus* sp.) and grapevine (*Vitis* sp.) (Villa *et al.*, 2008; Villa *et al.*, 2009).

Due to the importance of this plant for multiple purposes and the conventional method of propagation by seed germination, which can cause differences in the composition of its active principles, actions involving the production of standardized seedlings are essential to outline strategies aimed at conservation, management sustainable development and genetic improvement of this specie (Debnath and Bisen, 2006; Podile and Kishore, 2007; Chadwick *et al.*, 2013). The objective of this work was to evaluate the influence of the use of two different culture media on the establishment and *in vitro* development of *Simaba cedron* seedlings, as a first step in the development of a micropropagation protocol for the species (Ocampo and Mora, 2011).

2. Materials and Methods

Simaba cedron seeds collected from a parent plant at the Amazon Biotechnology Center, in Manaus/AM, were taken to the Plant Tissue Culture Laboratory, where they were washed with liquid detergent (of commercial origin) and running water and subsequently immersed in autoclaved distilled water for 24 hours. After this period, they were immersed in a commercial detergent solution for thirty minutes (under agitation) and, immediately afterwards, in autoclaved distilled water for twenty minutes.

Then, in a laminar flow chamber, they were disinfected with successive washes in 70% alcohol for 5 minutes, followed by immersion in sodium hypochlorite (2% active chlorine) for 30 minutes, and washed (three times) in sterile distilled water, for 5, 5 and 15 minutes. The seed coat was removed and they were inoculated in glass flasks (250 ml) containing 40 ml of basic culture medium of basic composition according to Murashige & Skoog (1962), without growth regulators (MS0), supplemented with 3% sucrose; 4.1 μM nicotinic acid; 0.6 mM myo-inositol; 2.4 μM pyridoxine-HCl; 1.5 μM thiamine-HCl and solidified with 2% phytigel. The pH was adjusted to 5.8 and the media were sterilized in an autoclave at 120 °C and 1.1 Kg/cm², for 15 minutes.

Cultures were kept in the dark, at 25 $\pm$ 1°C, for one week. After this period, they were kept under lighting, with fluorescent lamps (Sylvania, Phillips/daylight) with intensity of 30.0 $\mu\text{ moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and 16 hours of photoperiod. Daily observations were made, evaluating the development and the percentage of contamination. When the seedlings reached the maximum free height of the test tubes (8 cm), they were used as donors of explants for the tests with the culture media MS (Murashige & Skoog, 1962) and WPM (Lloyd & McCown, 1981) (Table 1). Each explant or phytomer consisted of a nodal region, without leaves, with an approximate size of 1 cm.

Table 1 - Composition of MS culture media.

Components	MS (mg/L)	WPM (mg/L)
Macronutrients		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	96
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556
KH ₂ PO ₄	170	170
KNO ₃	1900	-
K ₂ SO ₄	-	990
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
NH ₄ NO ₃	1650	400
Micronutrients		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
FeEDTA		
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	37,3
Orgânicos		
Nicotinic Acid	0,5	0,5
Glycine	2,0	-
Myo-inositol	100	100
Pyridoxine.HCl	0,5	0,5
Thiamine	0,1	1,0
Sucrose (g / L)	30	20

Source: Murashige and Skoog, (1962) and WPM (Lloyd and McCown, 1981).

The experimental design was completely randomized, with two treatments and three repetitions, using 30 explants for each treatment, which were performed in triplicate. The evaluations were performed after 60 days of cultivation. The data obtained regarding the effect of different culture media (MS and WPM) on the height of the seedlings, the number of shoots and nodal segments per shoot and the multiplication rate were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the averages were compared by the Tukey-Kramer test, at the 5% significance level.

These analyzes were performed using the *Graph Pad in Stat*, version 3.01. For the analysis of the germination and rooting percentages, according to the medium used, the difference test between percentages (p_1 and p_2) was used at the 5% level of significance using the Statistic for Windows™ software, version 5.0.

3. Results and Discussion

After five days of cultivation, it was observed that 75% of the seeds were aseptic, being used for the beginning of the culture, of which 100% germinated. The break in integumentary dormancy and pre-asepsis of the seeds allow the establishment *in vitro* of plants of *S. cedron*. The hypochlorite may have acted as a germination stimulant, due to the ability to stimulate α -amylase activity by increasing the amount of this enzyme in the seed, or even by promoting the breaking of seeds dormancy in some species (Kaneko and Morohashi, 2003).

For Silva(2015), when carrying out experiments with *Quassia amara*, obtained a disinfection rate of 28% and, of the disinfested seeds 83% germinated in MS0 medium.

Developmental evaluations in WPM were compared with those obtained from seedlings grown in MS medium. Significant differences occurred between the culture media MS and WPM for the length of the aerial part of *S. cedron*, because, when using the MS medium, seedlings with an average height of 4.8 cm were obtained, while those cultivated in WPM medium had a 2.4 cm growth (Figure 1 and Table 2).

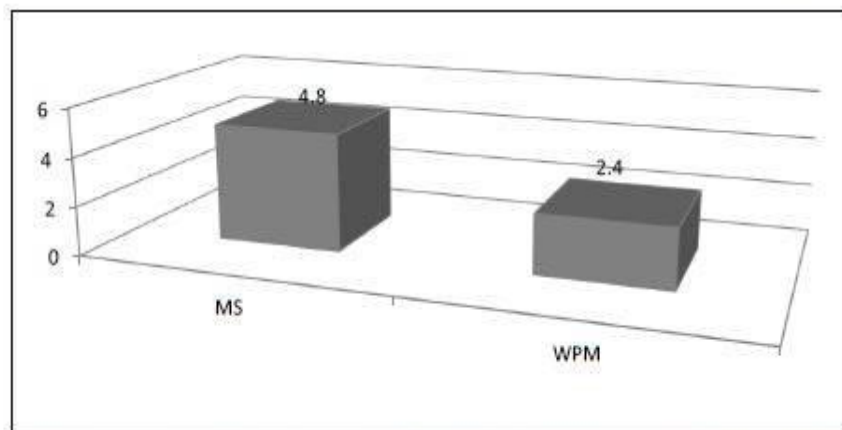


Figure 1 - Medium height of *Simaba cedron*, after 60 days of cultivation in MS and WPM media.

Source: Authors, (2020).



Figure 2 - *Simaba cedron*, after 60 days cultivation in MS medium.

Source: Authors, (2020).

Table 2 - Effects of MS and WPM culture media on in vitro cultivation of *Simaba cedron*.

Evaluated Parameters	MS	WPM
Height (cm)	4,8 ^a	2,4 ^b
Number of shoots	1,5 ^a	1,3 ^a
Number of nodal segments per shoot	8,0 ^a	3,0 ^b
Multiplication rate	8,0:1,0 ^a	3,0:1,0 ^b
Rooting rate (%)	75 ^a	0 ^b
Callogenesis rate (%)	38 ^b	70 ^a

Source: Authors, (2020).

When elaborating the tissue culture protocol of *Quassia amara* in MS medium, Silva (2015), obtained seedlings that reached an average of 5.23 cm, at 60 days of cultivation, while those cultivated in WPM medium originated seedlings with an average height of 1.39 cm.

Lencina *et al.* (2014), when carrying out experiments with grápia (*Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride) observed that there was no significant difference between the culture media WPM, MS and MS ½ for the length of the aerial part, number of leaves and length of the root, after 15 days of cultivation.

In plants of *Cordia trichotoma*, it was verified growth of the aerial part (1.6 cm) and of the root (7.3 cm) significantly higher in cultures in WPM medium, when compared to those carried out in MS ½ culture medium (0.7 and 1.3 cm respectively), at 28 days of evaluation (Fick, 2007).

Regarding sprouting, the results obtained with the MS and WPM medium were statistically similar, with an average production of 1.5 and 1.3 sprouts, per explant, respectively (Figure 3 and Table 2).

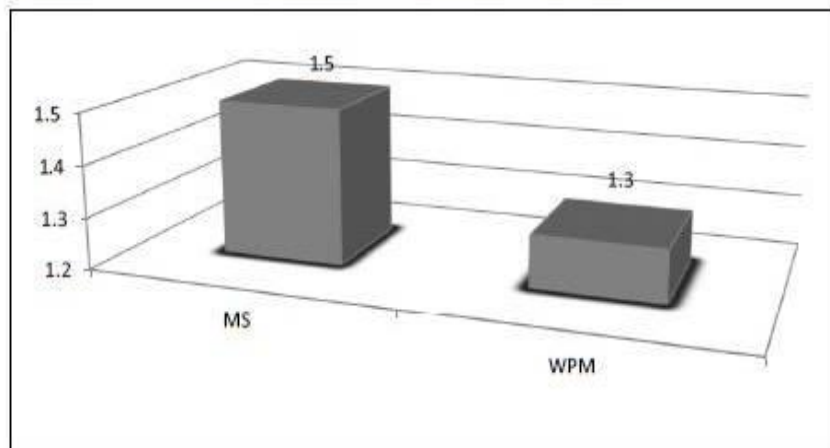


Figure 3: Average production of *Simaba cedron* shoots, after 60 days of cultivation in MS and WPM media.

Source: Authors, (2020).

In micropropagation, plants with a greater number of nodal segments or axillary buds are preferred, considering that these types of propagules have less somaclonal and epigenetic variation (Torres *et al.*, 1999). In this study, there was a significant difference between the MS and WPM culture media for the number of nodal segments (Table 2), indicating that the culture medium influenced the *in vitro* growth of *Simaba* seedlings, where the MS medium led to seedling development with, on average, 8 nodal segments, each. While WPM medium promoted the average development of 3 nodal segments per seedling. However, the WPM culture medium was used in the experiments because of its formulation, which was developed especially for woody species and presents 25% of the concentrations of nitrate and ammonia ions of the MS medium (Melo *et al.*, 1999), stimulating *in vitro* growth due to low concentrations of nitrogen in ammoniacal form (Grattapaglia & Machado, 1998). In addition, the WPM culture medium has a higher amount of vitamin thiamine - HCl, when compared to the MS culture medium (Table 1). Thiamine is identified as a beneficial substance for *in vitro* multiplication, allowing greater bud induction in explants of tree species (Mantovani & Franco, 1998), thus justifying its use in these experiments.

Compared to the MS culture medium, the WPM medium proved to be more suitable for the *in vitro* establishment of lash horse plants (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), in which a greater number of nodal segments per shoot was observed (4,9) and greater rooting of explants (66.8%), after 60 days of evaluation (Flôres, 2007).

Regarding the multiplication rate, the best result was obtained in seedlings grown in the MS0 medium, where the production of an average of 8.0 new seedlings per explant was observed, after 60 days of cultivation (Figure 4 and Table 2). Hassan *et al.*, 2012, report that when working with *Eurycoma longifolia*, a species from the same botanical family as *Simaba*, they obtained a higher multiplication rate in MS0 than in WPM.

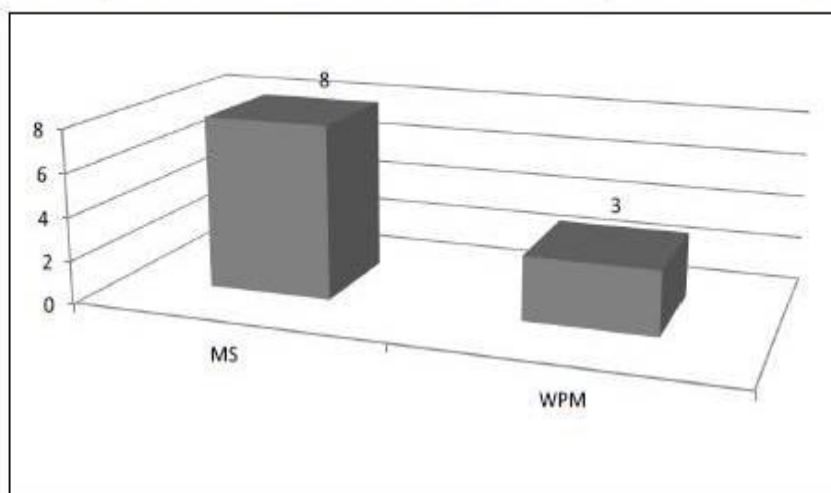


Figure 4: Multiplication rate of *Simaba cedron* after 60 days of cultivation in MS and WPM medium.

Source: Authors, (2020).

For Silva (2015), obtained a multiplication rate of 3.75: 1 when cultivating *Quassia amara*, for 60 days in MS medium, while seedlings grown in WPM medium generated a multiplication rate of 3.05: 1.

As for the seedling rooting, the maximum rooting rate (75%) was obtained in MS0 medium. The WPM medium did not promote rooting in 60 days of cultivation (Table 2). Rooting *in vitro* depends on the genotype of the plant, and can occur naturally during the micropropagation process, so that the use of growth regulators in the culture media can be avoided (George & Sherrington, 1984). The medium MS $\frac{1}{2}$ was used to analyze the *in vitro* rooting process of *E. longifolia*, since it was observed that the concentration of lower mineral salts helps to increase the percentage, length and number of roots in other species. However, the reaction can vary between cultivars of the same species. It has been suggested that the proportion of carbon/nitrogen and nitrogen compounds in auxin metabolism affects the rooting process. On the other hand, limited nutrients may affect the production and development of the entire plant root system *in vitro* (Karhu, 1997).

For Silva (2015), when working with *Q. amara*, obtained 25% of rooting when using the MS medium and no evidence of root formation, with the use of WPM.

As for callus formation, it occurred in all treatments tested, however, in WPM medium it was observed in 70% of explants (Figure 5 and Table 2). This rate of callogenesis can be attributed to the adaptation of explants to *in vitro* culture conditions, (Oliveira *et al.*, 2000).

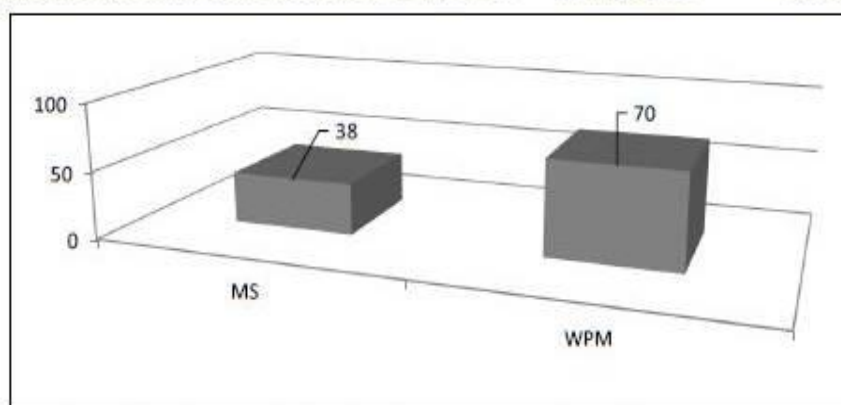


Figure 5: Callogenesis rate of *Simaba cedron*, after 60 days of cultivation in MS and WPM medium.

Source: Authors, (2020).

The stage of *in vitro* establishment which precedes the phases of *in vitro* cultivation itself is fundamental for the success in the development of a micropropagation system, mainly for native woody species. The composition of the culture medium, in relation to macro and micro elements and organic elements are fundamental. In this sense, when starting a biotechnological process with plant cells, one must, in the first instance, establish the appropriate formulation of the medium that will be used (Drapeau *et al.*, 1986).

Micropropagation or *in vitro* propagation has the purpose of producing seedlings of high genetic and phytosanitary quality and has contributed to prevent the extinction of many plant species. Because the plants worked are genetically standardized, the interference of genetic variability in the results can be eliminated. Consequently, the results obtained are effects of the variables introduced in the process by the experimenter (Silva and Astolfi Filho., 2018).

4. Conclusion

The disinfection process used guaranteed the asepsis of 75% of the seeds, however, it is possible to improve this percentage through new experiments related to the concentrations and immersion times in the disinfecting agents. The MS0 medium can be considered the most suitable for the development of the other micropropagation stages of this species, since in this medium the plants had a multiplication rate of 8,0: 1 and 75% of rooting of explants, at 60 days of cultivation.

5. Acknowledgments

To the Post-Graduate Program in Process Engineering at the *Institute of Technology of the Federal University of Pará (PPGEP/ITEC/UFPa)*. The *Institute of Technology and Education Galileo Amazon ITEGAM* and to the *Biotechnology Center of the Amazon (CBA/SUFRAMA)* for supporting research.

6. References

Bonte, F.; Meybeck, A.; Dumas, M19. 1997. Patente nº US 5676949; EP 0673237 e WO/1994/013259. Use

of a simaba extract to reduce patchy skin pigmentation, enhance the protective function of the skin or prepare a skin cell culture medium and resulting composition.

Caldas, L. S.; Haridasan, P.; Ferreira, M. E. Meios nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 87-132.

Chadwick, Martin et al. Sesquiterpenóides lactonas: benefícios para plantas e pessoas. Revista internacional de ciências moleculares, v. 14, n. 6, p. 12780-12805, 2013.

Debnath, Mousumi; Malik, CP; Bisen, Prakash S. Micropropagação: uma ferramenta para a produção de medicamentos à base de plantas de alta qualidade. Atual biotecnologia farmacêutica, v. 7, n. 1, p. 33-49, 2006.

Devecchi, Marcelo Fernando et al. Testing the monophyly of Simaba (Simaroubaceae): Evidence from five molecular regions and morphology. Molecular phylogenetics and evolution, v. 120, p. 63-82, 2018.

Dousseau, S.; Alvarenga, A.A.; Castro, E.M.; Soares, R.P.; Emrich, E.B. Anatomia Foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) Propagadas in vitro, in vivo e Durante a Aclimatização. Ciência Agrotécnica, v. 2, n. 6, p. 1694-1700, Nov./dez., 2008.

Drapeau, D.; Blanch, H. W.; Wilke, C. R. Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. Bioengineering and Biotechnology, v. 28, p. 1555-1563, 1986.

Fick, T. A. Estabelecimento e crescimento in vitro de plântulas de Louro-Pardo. Ciência Florestal, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

Flôres, A. Introdução ao cultivo in vitro de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, 2007, 73p.

George, E.F., Sherrington, P.D. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics, Basingstokes. 1984, p. 71- 83.

Giovannini, Peter; Howes, Melanie-Jayne R. Plantas medicinais usadas para tratar a picada de cobra na América Central: Revisão e avaliação de evidências científicas. Journal of ethnofarmacology, v. 199, p. 240-256, 2017.

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, CBAB/EMBRAPA. 1998, v. 1, p. 183-260.

Gupta, M. P. Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santafé de Bogotá: Andres Bello, p.515-516, 1995.

Hall, I. H.; Lee, K. H.; Imakura, Y.; Okano, M.; Johnson, A.; Journal of Pharmaceutical Science, v. 72, 1983, 1282p.

Hassan, N.H.; Abdullah, R.; Kiong, L.S.; Ahmad, A.R.; Abdullah, N.; Zainudin, F.; ISMAIL, H.; Rahman, S.S.A. Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets. African Journal of Biotechnology, v. 11, n. 26, p. 6818-6825, 29 March, 2012.

Kaneko, K; Morohashi, Y. Effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. Plant Science, v. 164, p. 287-292, 2003.

Karhu, S.T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. Plant Cell Tissue and Organ Culture. v. 48, p. 153-159, 1997.

Kletter, Christa; Kriechbaum, Monika (Ed.). Tibetan medicinal plants. CRC Press, 2001.

Kufer, Johanna Kathrin. Plantas usadas como remédio e alimento pelos Ch'orti'Maya: estudos etnobotânicos no leste da Guatemala . Universidade de Londres, University College London (Reino Unido), 2005.

Lencina, K.H.; Bisognin, D.A.; Kielse, P.; Pimentel, N.P.; Fleig, F.D. Estabelecimento e crescimento in vitro de plantas de grábia. Ciência Rural, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 1025-1030, jun, 2014.

Lloyd, G.; McCown, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society, v. 30, p. 421-327, 1981.

Mantovani, N.C.; Franco, E.T.H. Cultura de tecidos de plantas lenhosas. Santa Maria: Centro de Pesquisas Florestais, UFSM, 1998, Serie Técnica, v. 12, 132p.

Melo, N.F. de et al. Estabelecimento do cultivo in vitro de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC). Ciência e Agrotecnologia, v.23, n.1, p. 102-107, 1999.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. v. 15, p. 473-497, 1962.

Ocampo, Rafael; Mora, Gerardo. Etnomedicina de Quassia e plantas relacionadas na América Tropical.

Plantas Etnomedicinais: Revitalização do Conhecimento Tradicional de Ervas, p. 301, 2011.

Oliveira, R.P.; Gomes T.S.; Vilarinhos, A.D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 25, p. 2329-2334, 2000.

Podile, Appa Rao; Kishore, G. Krishna. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Em: Bactérias associadas a plantas . Springer, Dordrecht, 2007. p. 195-230.

Polonsky, J. Fortschr. Chem. Org. Nat, 1973, v. 30, 101p.

Seth, M. K. Trees and their economic importance. The Botanical Review, v. 69, n. 4, p. 321-376, 2003.

Silva, S. Estabelecimento e desenvolvimento in vitro de plântulas de Quassia amara L. (Simaroubaceae). Scientia Amazonia, v.4, n.2, 92-99, 2015.

Silva, S.; Astolfi Filho, S. Effect of indolebutyric acid on in vitro root production of Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes (Rubiaceae). Revista Fitos, v. 12, n. 3: 218-226, 2018.

Souza, J.A. DE; Schuch, M.W.; Silva, L.C. DA; Ferri, J.; Soares, G.C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação in vitro de pitangueira (Eugenia uniflora L.). Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v.13, n.1, p. 115-118, jan-mar, 2007.

Torres, A.C. et al. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, 1999, v. 2, 517p.

Vermeulen, Frans. The Rutaceae Family-Order Sapindales. Homœopathic Links, v. 21, n. 01, p. 27-31, 2008.

Villa, F. et al. Cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação in vitro de amoreira preta cv. Tupy. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 1, p. 37-41, 2008.

Villa, F. et al. Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1, modificado com fontes de boro e zinco. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 33, n. 2, p. 468-472, mar./abr., 2009.