

Estabelecimento *in vitro* de boldo-de-jardim (*Plectranthus ornatus*, Lamiaceae).

Passinho-Soares, Helna Célia^{1,3}; Meira, Paloma Ribeiro²; David, Jucení Pereira de Lima³; David, Jorge Mauricio⁴; Santana, José Raniere Ferreira de⁵

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UEFS), caixa postal 252-294, CEP: 44031-460, email: helna@ufba.br; ²IC/Bolsista AT3 FAPESB, Faculdade de Farmácia UFBA, Campus Universitário de Ondina, email: lubmel@yahoo.com.br; ³Professora da Faculdade de Farmácia da UFBA, Av. Barão de Geremoabo s/n Campus Universitário de Ondina, Salvador Bahia e-mail: juceni@ufba.br ; ⁴Professor da Faculdade de Química da UFBA, email:jmdavi@ufba.Br; ⁵ Professor do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, email: raniere@uefs.br

INTRODUÇÃO

O gênero *Plectranthus* L Her. pertencente à família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae, possui cerca de 300 espécies e inumeráveis híbridos pertencentes ao mesmo. Essas espécies encontram-se distribuídas por regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália e Ilhas do Pacífico. Algumas espécies de *Plectranthus* têm importância econômica por serem fontes de óleos essenciais aromáticos, sendo também cultivados como plantas ornamentais, comestíveis, condimentares e medicinais. No Brasil, as espécies medicinais do gênero *Plectranthus* são citadas em levantamentos etnobotânico sobre plantas medicinais (Alcântara, 2005) e são conhecidas popularmente como, boldo, boldo-de-jardim, boldo-do-Brasil, boldo-falso, dentre outras sinônimas. São utilizadas na medicina popular como antidiarréica, anti-reumática, carminativa, colagoga, colerética, estomáquica, hiposecretora gástrica, hipotensora, tônica, analgésica, dentre outras indicações (Fischman, 1991 ; Câmara, 1998; Câmara, 2003; Shultze, 2005).

A eficácia e segurança de muitas plantas medicinais já foram comprovadas cientificamente, o que valida esse recurso como terapêutico benéfico e indispensável para a humanidade (Tyler, 1994). Entretanto, existem problemas de vários níveis que limitam o seu uso, entre eles pode-se citar o fato de que algumas espécies sintetizam os metabólitos secundários em concentrações muito baixas o que exige processos de extração dispendiosos e elaboração de formulações farmacêuticas complexas; outras espécies apresentam enorme variabilidade genética com alterações quantitativas e qualitativas nos metabólitos secundários o que dificulta a obtenção de droga padronizada; existe ainda o fato de que as plantas muitas vezes estão sob forte pressão antrópica, expostas a erosão genética e redução drástica de populações endêmicas o que dificulta a utilização em escala comercial.

O estudo da micropropagação de espécies utilizadas na medicina popular tem sido intensificado nos últimos anos, devido ao crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos fármacos. Desse modo, a utilização de técnicas biotecnológicas em plantas, tais como, micropropagação, cultura de células e tecidos vegetais, pode resolver ou minimizar alguns dos problemas relacionados acima e visam também o aumento e o direcionamento da propagação de plantas medicinais e produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que por algum tipo de impedimento não podem ser produzidos por síntese (Debnath, 2006, Zhang, 2007; Zhao, 2005).

A utilização de substâncias reguladoras de crescimento apresenta importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, imprescindíveis para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (Kerbaui, 1999). Os reguladores de crescimento exercem sua ação por reconhecimento de receptores específicos, presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (Guerra et al., 1999).

O presente trabalho teve por objetivo promover o estabelecimento *in vitro* de *Plectranthus ornatus* Codd.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Os explantes foram obtidos a partir de segmentos nodais e internodais, excisados de brotações jovens, provenientes de plantas matrizes com 6 meses de idade, mantidas em canteiro.

A desinfestação foi realizada através da lavagem inicial das folhas em água corrente por 60 minutos. A seguir, em câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas inicialmente em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo) acrescida de 3 gotas de detergente neutro por 15 minutos. Em seguida, os segmentos foram lavados (3 vezes) em água destilada e estéril.

Os explantes com cerca de 1,5 cm de comprimento foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e diferentes combinações entre 6-Benzilaminopurina – BAP (1; 2; 4 mg.L⁻¹) e ácido naftalenoacético – ANA (0; 1; 2; 4 mg.L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1, utilizando-se KOH ou HCl 0,1N, antes da autoclavagem.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, a temperatura de 25 ± 3°C, sob fotoperíodo de 16 horas, com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de 30 μmol.m⁻².s⁻¹.

Após 60 dias da inoculação, foram avaliadas as seguintes variáveis: presença de calos no ápice e na base do explante, número de raiz, número de brotos e número de folhas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x4 (BAP x ANA) com 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por 10 tubos. Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância testando-se as médias pelo teste de Tukey. Os dados de percentagens foram transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$ e os números de contagem, em $\sqrt{x+1}$. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR, v 4.3, desenvolvido pela UFLA (Ferreira, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que a calogênese e a formação de brotos e raízes em *Plectranthus ornatus* é influenciada pelo balanço entre os reguladores de crescimento BAP e ANA.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos sobre a formação de calos na base do explante. Foi obtido até 100% de explantes responsivos para esse parâmetro na presença de 2 ou 4 mg.L⁻¹ de BAP e ausência de ANA, o que indica que não é necessária a adição de auxina para a indução de calogênese na base do explante em *P. ornatus*. Esses resultados diferem dos encontrados por Silva et al (2003) em carqueja, nessa espécie a presença de auxina em combinação com citocinina é essencial para a formação de calos.

Com relação a calogênese no ápice do explante, houve interação significativa entre os tratamentos utilizados. Para este parâmetro não houve diferença entre as concentrações de ANA, no entanto em meios sem ANA ou com 1 mg.L de ANA os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 2 mg.L de BAP diferindo significativamente da concentração 4 mg.L, o que indica que balanços auxina/citocinina favoráveis à auxina são benéficos para a formação de calo no ápice do explante da espécie em estudo.

Foram observadas interações entre os tratamentos para as variáveis enraizamento, número de brotos por explante e número de folhas por broto.

Os melhores resultados para o enraizamento foram obtidos em meio com 4 mg.L de BAP e ausência de ANA (67,5%).

TABELA 1- Valores médios para presença de calos na base do explante (CB), presença de calos no ápice do explante (CA), presença de raiz (R), número de brotos (NB) e número de folhas (NF) em *Plectranthus ornatus* em função de diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)					
	1,0		2,0		4,0	
	Médias originais	Médias transformadas	Médias originais	Médias transformadas	Médias originais	Médias transformadas
<u>Calos na base do explante</u>						
0,0	90,8	77,2a A ^z	100,0	90,0aA	100,0	90,0aA
1,0	100,0	90,0aA	96,4	84,2aA	87,5	78,7aA
2,0	100,0	90,0aA	100,0	90,0aA	100,0	90,0aA
4,0	100,0	90,0aA	93,7	82,5aA	100,0	90,0aA
<u>Calos no ápice do explante</u>						
0,0	30,8	32,2abA	41,5	40,6aA	12,5	11,2bA
1,0	33,3	31,9abA	50,0	45,0aA	8,3	8,7bA
2,0	50,0	44,9aA	25,0	26,2aA	34,8	36,0aA
4,0	32,0	34,5aA	31,2	37,5aA	13,7	18,7aA
<u>Presença de Raiz</u>						
0,0	12,5	14,8bB	3,1	5,0bA	75,0	67,5aA
1,0	24,9	26,2abAB	0,0	0,0bA	41,6	36,2aB
2,0	13,3	15,4aB	0,0	0,0bA	0,0	0,0aC
4,0	50,0	50,2aA	0,2	0,0bA	10,2	16,0bBC
<u>Número de brotos</u>						
0,0	1,4	1,5aAB	1,8	1,6aA	2,2	1,7aAB
1,0	1,3	1,5aB	1,3	1,5aA	3,1	2,0aA
2,0	3,1	1,9aA	0,9	1,3bA	1,0	1,4bB
4,0	0,8	1,3aB	0,9	1,3aA	1,2	1,4aB
<u>Número de folhas</u>						
0,0	5,2	2,4bA	7,1	2,8bA	12,3	3,6aB
1,0	3,8	2,1bA	5,4	2,5bAB	22,0	4,7aA
2,0	6,8	2,7aA	2,7	1,8bBC	3,9	2,2abC
4,0	3,3	2,0aA	0,5	1,1aC	3,4	2,1aC

^z - Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada linha e pela mesma letra maiúscula em cada coluna não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Obteve-se uma média de 0,9 a 2,0 brotos de *P. ornatus* nos tratamentos utilizados. As maiores médias foram obtidas em meios suplementados com 4 de BAP na ausência ou presença de 1mg.L de ANA.

Os melhores resultados observados para número de folhas foram obtidos com 4 mg.L de BAP na presença de 1 mg.L de BAP.

REFERÊNCIAS

- CÂMARA, C.C., Estudos farmacológicos e metabólicos do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Plectranthus barbatus* Benth. (malva-santa). Fortaleza: UFC, CCS, DFF, 1998 (Dissertação de Mestrado em Farmacologia).
- CÂMARA, Carlos C; NASCIMENTO, Nilberto R; MACEDO-FILHO, Carlos L; ALMEIDA, Fábio B; FONTELES, Manasses C. Antipasmotic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. **Planta Medica** 69(12), 1080-5 2003.
- DEBNATH M, MALIK CP, BISEN PS. Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology** 7(1): 33-49, 2006.
- FISCHMAN, L.A., SKORUPA, L.A., SOUCCAR, C., LAPA, A.J., The water extract of *Coleus barbatus* Benth decreases gastric secretion in rats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86 (Supl 02), 141-3, 1991.
- SHULTZE, Carla. Mecanismo celular da ação anti-secretora ácida gástrica de frações isoladas de *Plectranthus barbatus* (Andr.) Benth, São Paulo, USP, EPM, PR-PGP, 2002 (Dissertação de Mestrado em Farmacologia).
- TYLER, V.E. **Herbs of choice**. New York: Haworth, 1994.
- ZHANG, CH; FEVEREIRO, PS. The effect of heat shock on paclitaxel production in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures: Role of abscisic acid pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering** 96(3): 506-514, 2007.
- ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, ROBERT. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances** 23:283-333, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...**45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A C.; TEIXEIRA, J. G. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 2, p. 533-568. 1999.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 2, p. 519-531.
- PALAVRAS-CHAVES:
Plectranthus ornatus, Lamiaceae; organogênese