

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BALSAS - CESBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE -
PPGAA

ALLISON DANIEL FERNANDES COELHO SOUZA

CULTIVO *IN VITRO* DE BARBATIMÃO: PLANTA BRASILEIRA COM
PROPRIEDADES MEDICINAIS

Balsas - MA

2021

ALLISON DANIEL FERNANDES COELHO SOUZA

**CULTIVO *IN VITRO* DE BARBATIMÃO: PLANTA BRASILEIRA COM
PROPRIEDADES MEDICINAIS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Agricultura e Ambiente
– PPGAA/CESBA/UEMA, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Francisco
Eduardo Aragão Catunda Junior.

Co-Orientador: Prof. Dr. Diego
Silva Batista.

Balsas - MA

2021

Souza, Allison Daniel Fernandes Coelho.

Cultivo *in vitro* de barbatimão: planta brasileira com propriedades medicinais / Allison Daniel Fernandes Coelho Souza. – Balsas, MA, 2021.

53 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Agricultura e Ambiente, Centro de Estudos Superiores de Balsas, Universidade Estadual do Maranhão, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior.

Coorientador: Prof. Dr. Diego Silva Batista.

1.*Stryphnodendron adstringens*. 2.Propagação *in vitro*. 3.Metabólitos secundários. 4.Ácidos fenólicos. 5.Flavonóides.

CDU: 633.88(81)

ALLISON DANIEL FERNANDES COELHO SOUZA

**CULTIVO *IN VITRO* DE BARBATIMÃO: PLANTA BRASILEIRA COM
PROPRIEDADES MEDICINAIS**

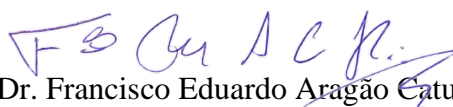
Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Agricultura
e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo
Aragão Catunda Junior

Co-Orientador: Prof. Dr. Diego Silva
Batista.

Aprovada em 29 / 10 / 2021

BANCA EXAMINADORA



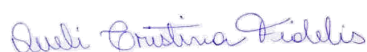
Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Junior

Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL)



Profª. Dra. Thais Roseli Corrêa

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)



Profª. Dra. Queli Cristina Fidelis

Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

*À Deus, pois sei que esta jornada foi guiada e preparada por Ele desde o seu 1º dia.
À minha mãe, Ana, por ser minha grande incentivadora de vida.
Ao Davi, que mesmo ainda no ventre, já é uma fonte inesgotável de inspiração e força.*

“...Seja forte e corajoso! Porque eu, o Senhor teu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!”

Josué 1 6-9.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Eterno, pela graça concedida de ter chegado até aqui, transformando tropeços em aprendizados, e desafios em conquistas, renovando a cada dia a esperança por uma sociedade mais justa e desenvolvida.

À minha esposa, Thalita, por ser minha companheira de vida e me acompanhar em cada desafio com todo amor e cuidado.

À minha família, fonte inesgotável de inspiração, amor e forças.

Aos meus amigos, por compreenderem os momentos de ausência e me incentivarem a sempre buscar novos desafios.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA/UEMA), pelas instalações cedidas, pela atenção dada a cada necessidade e por oportunizar o meu desenvolvimento neste programa tão renomado na região tocantina.

Ao professor Eduardo Aragão, pelo acompanhamento em cada etapa do mestrado e deste trabalho, e por todos os conselhos dados em diversos momentos.

À professora Cláudia Quintino, por ter sido uma grandiosa apoiadora do nosso trabalho, cedendo as instalações do Laboratório de Produtos Naturais do (CCET/UFMA) e pelas análises cromatográficas. Nossos mais sinceros agradecimentos.

À fiel escudeira, companheira de jornada e amiga Maria Luara Aragão Silva, por toda ajuda, cuidado e apoio durante todo o curso, e principalmente na execução deste trabalho.

Aos professores Fábio Afonso M. M. Figueiredo e Diego Batista, por terem sido apoiadores e acreditarem neste projeto desde o seu início, bem como por cederem o laboratório para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!

Ao professor Marcos Vinícius Marques Pinheiro, por ter me guiado e acompanhado em toda a jornada de experimentações e escrita deste trabalho, sempre com muita empatia e disposição em ajudar, para que o trabalho seja escrito da melhor forma possível. A você os meus mais sinceros agradecimentos.

A todos vocês, muito obrigado!

RESUMO

A *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, de nome popular barbatimão, é uma planta nativa do cerrado brasileiro, com destaque na medicina fitoterápica, devido às propriedades medicinais atribuídas pelos metabólitos secundários presentes na espécie. Neste estudo objetivou-se estabelecer a germinação *in vitro*, bem como verificar a produção de ácidos fenólicos e flavonóides do barbatimão. Foram estabelecidos dois experimentos: I – Cultivo *in vitro* e em condições de casa de vegetação e II – Análise química em CLAE. No primeiro experimento, realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos (UEMA), sementes de barbatimão foram germinadas em condições de casa de vegetação (controle) e *in vitro* utilizando como meios de cultivo: meio de cultivo Murashige e Skoog (MS) + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar (T1); Água destilada + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar (T2); MS + 11,09 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) + 0,54 µM de ácido naftaleno acético (ANA) (T3); MS + 1,44 µM de ácido giberélico (GA3) + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar (T4); MS + 11,09 µM BAP + 0,54 µM ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar + 1 g L⁻¹ de carvão ativado (T5). Após 60 dias de germinação, foram avaliadas as variáveis número de folhas (NF, unidades), altura da parte aérea (APA, cm), comprimento da maior raiz (CR, cm), diferença entre massa fresca e seca da parte aérea (MPA, g), diferença entre massa fresca e seca da raiz (MR, g) e largura média das folhas (LF, cm). Os dados foram submetidos ao teste de Dunnett a 5% de probabilidade. No segundo experimento, realizado no Laboratório de Produtos Naturais (CCET UFMA) foram obtidos os extratos metanólicos (hidromódulo 1:8) das folhas do barbatimão para os tratamentos controle e T1 a T5, e em seguida obtidos os perfis cromatográficos a partir das leituras dos extratos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE – DAD), onde foram verificados os espectros no UV para cada pico do cromatograma para identificação de ácidos fenólicos e flavonoides. Os resultados obtidos indicaram diferenças entre os tratamentos para as variáveis APA, CR e MR, onde o tratamento *in vitro* T5 (meio MS acrescido de BAP, ANA e mio-inositol em carvão ativado) foi superior no desenvolvimento da parte aérea e no comprimento radicular das plântulas. Os dados obtidos para a variável MR mostraram que os as condições *in vitro* não foram eficientes para a produção de massa radicular comparados ao controle. A condição de cultivo em T5 foi superior na produção de ácidos fenólicos e flavonoides comparados aos demais tratamentos *in vitro*, com resultados próximos ao controle, indicando resultados promissores para a produção de metabólitos secundários de interesse medicinal em condições homogêneas e de baixo impacto ambiental no barbatimão.

Palavras-chave: *Stryphnodendron adstringens*. Propagação *in vitro*. Metabólitos secundários. Ácidos fenólicos. Flavonóides.

ABSTRACT

Stryphnodendron astringens (Mart.) Coville, with the popular name barbatimão, is a plant native to the Brazilian cerrado, with prominence in herbal medicine, due to the medicinal properties attributed by the secondary metabolites present in the species. In this study it was aimed to establish the *in vitro* germination, as well as to verify the production of phenolic acids and flavonoids of barbatimão. Two experiments were established: I - *In vitro* cultivation and under greenhouse conditions and II - Chemical analysis in CLAE. In the first experiment, carried out in the Tissue Culture Laboratory (UEMA), barbatimão seeds were germinated in vegetation house conditions (control) and *in vitro* using as culture media: MS + 100 mg L⁻¹ of myo-inositol + 30 g L⁻¹ of sucrose + 6.5 g of agar-agar (T1); Distilled water + 30 g L⁻¹ of sucrose + 6.5 g of agar-agar (T2); MS + 11.09 µM of 6-benzylaminopurine (BAP) + 0.54 µM of naphthalene acetic acid (ANA) (T3); MS + 1.44 µM of gibberellic acid (GA3) + 0.54 µM of ANA + 100 mg L⁻¹ of myo-inositol + 30 g L⁻¹ of sucrose + 6.5 g L⁻¹ of agar-agar (T4); MS + 11.09 µM BAP + 0.54 µM ANA + 100 mg L⁻¹ of myo-inositol + 6.5 g L⁻¹ of agar-agar + 1 g L⁻¹ of activated carbon (T5). After 60 days of germination, the following variables were evaluated: number of leaves (NF, units), height of the aerial part (APA, cm), length of the largest root (CR, cm), difference between fresh and dry mass of the aerial part (MPA, g), difference between fresh and dry mass of the root (MR, g) and average width of the leaves (LF, cm). The data were submitted to Dunnet's test at 5% probability. In the second experiment, carried out in the Natural Products Laboratory (CCET UFMA), methanolic extracts (hydromodule 1:8) of barbatimão leaves were obtained for control and T1 to T5 treatments, and then the chromatographic profiles were obtained from the readings of the extracts by means of high-performance liquid chromatography (HPLC-PDA), where the representative peaks of the UV spectra for phenolic acids and flavonoids were verified. The results obtained indicated differences among treatments for the variables APA, CR and MR, where the *in vitro* treatment T5 (MS medium addicted BAP, ANA and myo-inositol on activated carbon) was superior in the development of the aerial part and root length of the seedlings. The data obtained for the variable MR showed that the *in vitro* conditions were not efficient for root mass production compared to the control. The cultivation condition T5 was superior in the production of phenolic acids and flavonoids compared to the other *in vitro* treatments, with results close to the control, indicating promising results for the production of secondary metabolites of medicinal interest in homogeneous conditions and low environmental impact in the barbatimão.

Keywords: *Stryphnodendron astringens*. *In vitro* propagation. Secondary metabolites. Phenolic acids. Flavonoids.

LISTA DE SIGLAS

OMS – Organização Mundial da Saúde

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de saúde

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

MS - Murashige e Skoog

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

BAP - 6-benzilaminopurina

ANA - ácido naftaleno acético

WPM - Wood Plant Medium

2,4-D - ácido diclorofenoxiacético

TDZ – tidiazuron

GA₃ – ácido giberélico

MNE – Modelagem de Nicho Ecológico

Aw - clima tropical subúmido segundo a classificação de Köppen

NF – Número de folhas

APA – Altura da parte aérea

CR – Comprimento da Maior Raiz

MPA - Diferença entre massa fresca e seca da parte aérea

MR - Diferença entre massa fresca e seca da raiz

LF - Largura média das folhas

CCET - Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Propagação in vitro de sementes de *Stryphnodendron adstringens* após 60 dias de cultivo. (a) controle (plantio em condição de casa de vegetação). (b) T1 (MS 0 + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar); (c) T2 (Água destilada + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); (d) T3 (MS + 11,09 µM de BAP + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); (e) T4 (MS + 1,44 µM de ácido giberélico (GA3) + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar); (f) T5 (MS + 11,09 µM BAP + 0,54 µM ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar + 1 g L⁻¹ de carvão ativado). Barras de escala a-f = 1 cm.....**32**

Figura 2 - Parâmetros morfológicos e de crescimento in vitro de *Stryphnodendron adstringens*. (a) Número de folhas (un); (b) Altura da parte aérea (cm); (c) Comprimento da maior raiz (cm); (d) Diferença entre massa fresca e seca da parte aérea (g); (e) Diferença entre massa fresca e seca da raiz (g); (f) Largura média das folhas (cm). Tratamentos: controle (plantio em condição de casa de vegetação); T1 (MS 0 + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar); T2 (Água destilada + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); T3 (MS + 11,09 µM de BAP + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); T4 (MS + 1,44 µM de ácido giberélico (GA3) + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar); T5 (MS + 11,09 µM BAP + 0,54 µM ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar + 1 g L⁻¹ de carvão ativado).....**34**

Figura 3 - Perfil obtido por CLAE - DAD do extrato metanólico do barbatimão a partir dos espectros no UV dos picos representativos.....**38**

Figura 4 - Cromatogramas dos extratos metanólicos de *Stryphnodendron adstringens* cultivados in vitro em comparativo ao cultivo em condições de casa de vegetação após 60 dias de cultivo. (a) controle (plantio em condição de casa de vegetação). (b) T1 (MS 0 (sem regulador de crescimento) + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar); (c) T2 (Água destilada + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); (d) T3 (MS + 11,09 µM de BAP + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); (e) T4 (MS + 1,44 µM de

ácido giberélico (GA3) + 0,54 μM de ANA + 100 mg L^{-1} de mio-inositol + 30 g L^{-1} de sacarose + 6,5 g L^{-1} de ágar-ágar); (f) T5 (MS + 11,09 μM BAP + 0,54 μM ANA + 100 mg L^{-1} de mio-inositol + 30 g L^{-1} de sacarose + 6,5 g L^{-1} de ágar-ágar + 1 g L^{-1} de carvão ativado).....**39**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes tratamentos utilizados para a propagação <i>in vitro</i> de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	27
Tabela 2 - Análises de variância em relação aos tratamentos experimentais.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. <i>Stryphnodendron adstringens</i>	17
2.2. Aplicações farmacológicas.....	18
2.3. Produção de metabólitos secundários.....	19
2.4. Metabólitos secundários presentes no barbatimão.....	20
2.5. Aspectos da propagação <i>in vitro</i>	22
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Material vegetal e condição de cultivo <i>in vitro</i>	27
4.2. Germinação em casa de vegetação.....	28
4.3. Variáveis analisadas.....	29
4.4. Avaliação química do barbatimão.....	29
4.5. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Parâmetros morfológicos e de crescimento <i>in vitro</i>	31
5.2. Prospecção fitoquímica.....	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Apesar do uso de plantas medicinais ocorrer desde a antiguidade, somente a partir do ano de 1978, o uso de medicamentos fitoterápicos tradicionais para finalidades profiláticas, diagnósticas ou curativas foi reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como parte dos cuidados da saúde humana, por meio da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde (OMS, 1978). Após este marco, em 2009, foi divulgado pelo Ministério da Saúde, a “Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde” (RENISUS), contendo 71 plantas medicinais potencialmente geradoras de produtos de interesse do SUS, incluindo a *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, de nome popular “barbatimão” (BRASIL, 2009), e em 2014 foi publicada pelo Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um documento trazendo informações relevantes acerca da descrição, características fitoquímicas e usos tradicionais da espécie na medicina popular (BRASIL, 2014).

O barbatimão é pertencente à família Fabaceae, e pode ser encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, sendo descrita para os domínios fitogeográficos Caatinga e Cerrado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A espécie se destaca pela alta quantidade de taninos e compostos fenólicos, encontrados em sua maioria nas cascas do caule (córtex) e folhas, tornando-a ricamente utilizada na medicina fitoterápica devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, cicatrizantes, no tratamento, prevenção de doenças sexualmente transmissíveis, e na prevenção da oxidação de alimentos (AGUIAR *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2021; LOPES; DRAGUNSKI; FRANCISCO, 2018; SIMAS PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2020).

As substâncias produzidas pelo barbatimão, de elevada atividade biológica, são oriundas do metabolismo secundário vegetal que, com alta fluidez genética e diversidade de combinações enzimáticas, é responsável por garantir adaptações flexíveis às variadas situações de exposição a fatores externos da natureza (OLIVEIRA *et al.*, 2011). No entanto, não é possível a obtenção de uma determinada substância sintetizada por espécies vegetais em um quantitativo específico, pois a presença e concentrações de metabólitos secundários geralmente são complexos e dependem de um conjunto de estímulos do ambiente e respectivas respostas (COSTA, 2017). Fatores como temperatura, estresse hídrico, radiação solar e ciclo circadiano podem influenciar a produção de metabólitos secundários, alterando a sua concentração ao longo do dia e dos meses (XAVIER, 2015). Em regiões onde as condições climáticas sejam

mais severas, como o semiárido brasileiro (estação de estiagem e de chuvas bem definidas), a produção de metabólitos secundários é fortemente alterada pelas condições sazonais do ambiente (CHAVES, 2012).

Além disso, é possível que haja diferenças entre os quantitativos de metabólitos secundários obtidos em diferentes matrizes da mesma espécie, quando submetidas a diferentes condições ambientais. Esta hipótese foi avaliada por Santos *et al.* (2006), que verificaram a influência de variações sazonais nos quantitativos de taninos e fenóis totais em cascas de barbatimão no bioma cerrado. Ainda, estes autores verificaram que em amostras coletadas durante estações chuvosas, possuem maiores teores de compostos fenólicos e taninos, quando comparadas a períodos de estiagem.

A produção de metabólitos secundários pode ter uma relação direta com o ambiente e as condições em que a planta está exposta, tais como o regime circadiano, sazonalidade e radiação, que variam ao longo do ano (SILVA *et al.*, 2018). Estas variações também são relatadas por Gobbo-Neto e Lopes, (2007), no qual verificaram variações de quantitativos de metabólitos secundários ocorridas em diferentes épocas do ano, horários de coleta de material biológico e do grau de desenvolvimento das espécies. Além disso, fatores como diversidade genética, altitude, temperatura, disponibilidade hídrica, e relações de macro e micronutrientes possuem íntima relação à geração de compostos biologicamente ativos em matrizes vegetais, afetando diretamente a capacidade de produção de compostos fenólicos com atividade antioxidante (PRETTI, 2018).

Jacobson *et al.*, (2005) verificaram a influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos em duas espécies do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* e *Stryphnodendron polyphyllum*), estabelecendo correlação entre os tipos de solo e a produção de compostos medicinais nas espécies. Ainda, estes autores observaram que as maiores taxas de produção de fenóis totais e taninos ocorreram durante o período chuvoso, devido à disponibilidade hídrica e as trocas iônicas com o alumínio estarem mais disponíveis nesta época do ano.

A presença de flavonoides nos extratos do barbatimão, principalmente das plantas que durante o outono, mesmo em concentrações abaixo das encontradas em taninos, sugerem uma via metabólica preferencial para a produção de compostos fenólicos no barbatimão (AUDI *et al.*, 2004). Os diferentes aspectos ambientais que podem influenciar na produção de metabólitos secundários, somado à demanda crescente de indústrias para a comercialização de produtos fitoterápicos, têm despertado interesse à comunidade científica para o desenvolvimento de

protocolos de cultura de tecidos, estabelecendo métodos mais práticos e eficientes de extração de metabólitos secundários com o controle de fatores ambientais locais, estabelecendo a produção de compostos que pouco se alterem ao longo do ano (SOUZA *et al.*, 2018). Dessa forma, visando obter condições ambientais homogêneas entre sistemas de cultivo de espécies vegetais, o uso das técnicas da cultura de tecidos, dentre estas a propagação *in vitro*, tem ganhado vasta notoriedade no meio científico através do cultivo de material vegetal em meio nutritivo asséptico e em condições ambientais homogêneas, sem a interferência de fatores sazonais, capazes de produzir metabólitos secundários de interesse (HANDA *et al.*, 2006).

A partir dos protocolos de micropropagação desenvolvidos para espécies vegetais, é possível obter uma escalabilidade na replicação de condições de cultivo, com vistas a viabilizar a produção homogênea de metabólitos secundários de interesse comercial e/ou medicinal, através da combinação de diferentes ferramentas biotecnológicas (MARCHEV, 2020), estabelecendo um processo sustentável de produção de compostos de interesse medicinal sem exercer pressão sobre ecossistemas naturais (THIYAGARAJAN, 2012; ZHANG, 2015).

Apesar da vasta notoriedade científica em seu estado *in natura*, são poucos os estudos recentes que relatem o desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* da *Stryphnodendron adstringens*, onde os quais se destacam a produção e proliferação de brotos, germinação de sementes, formação de raízes, produção de biomassa fresca e seca, produção de fenóis totais e o estudo da calogênese da espécie, utilizando como base as técnicas de culturas de tecidos (PASQUAL e BARROS, 1992; FRANÇA *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 2007; NICIOLI *et al.*, 2008; PORTO *et al.*, 2014)

Deste modo, a partir da aplicação dos conceitos da cultura de tecidos e os diversos trabalhos que norteiam os aspectos da propagação *in vitro* do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), propôs-se nesta pesquisa estabelecer a germinação *in vitro* do barbatimão, bem como verificar a produção de ácidos fenólicos e flavonóides na espécie e comparando-os às plântulas germinadas em condições de casa de vegetação, avaliando os respectivos perfis fitoquímicos obtidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Stryphnodendron adstringens*

A *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), conhecida popularmente como barbatimão, é uma planta pertencente à família *Fabaceae* e subfamília *Mimosoidae*, amplamente utilizado na medicina fitoterápica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A espécie é conhecida por nomes que podem variar conforme a região, como barbatimão, barba de timão, barbatimão-verdadeiro, barbatimão-vermelho, árvore-da-virgindade e aperta-mulher (GOULART, 2010). Apresenta-se na forma subarbustiva, arbustivas ou arbóreas, com folhas bipinadas, com a parte interna do cerne vermelha e rígida e sementes em formato de vagem, com endosperma desenvolvido e não aladas (SCALON, 2007).

É uma árvore de pequeno porte, com copa frondosa e baixa, com variação de altura entre 2 e 8 metros, de tronco curto, de 30 a 40 cm de comprimento, revestido com casca rugosa, de coloração castanho-acinzentada, que se solta facilmente do caule (FILHO e FELFILI, 2003). Possui madeira com densidade média de $0,80 \text{ g cm}^{-3}$, macia ao corte, de textura grossa e de boa resistência, indicada para a obtenção de lâminas (LORENZI, 2009).

É uma planta do tipo perenifólia, com presença de folhas em todas as épocas do ano, onde o ciclo de reprodução se inicia no período de floração, que ocorre nos primeiros meses do ano com maiores ocorrências de chuvas, onde brotam flores de coloração creme esverdeadas, dispostas em pequenas inflorescências com formato de espiga (QUEIROZ, 2014). O amadurecimento dos frutos - que ocorrem em formato de vagem secas e lenhosas, em formato cilíndrico e de coloração marrom - ocorre nos meses de junho a outubro, possibilitando a coleta das sementes após a queda espontânea (GOULART, 2010; LORENZI, 2009). Após o amadurecimento dos frutos e a queda espontânea das sementes, nos primeiros meses do ano estão os maiores índices de germinação espontânea das sementes, com o início das chuvas (LIMA, 2010). Além disso, a espécie apresenta preferência pelos solos de característica arenosa, e de rápida drenagem (FILHO e FELFILI, 2003).

O gênero *Stryphnodendron*, pertence à subfamília *Mimosoidae*, que é tipicamente de clima tropical e subtropical e apresenta área de dispersão limitada à América do Sul, com origem nos biomas cerrado e amazônico, e ocorrências em todas as regiões do país (LIMA *et al.*, 2016). O gênero compreende 32 táxons, sendo 29 espécies, 1 subespécie e 2 variedades, com distribuição geográfica característica, onde a maioria ocorrem na região amazônica

(OCCHIONI, 1990). A *Stryphnodendron adstringens* é uma espécie com ampla distribuição geográfica, com ocorrência desde o estado do Pará até o norte do Paraná (LIMA *et al.*, 2016).

2.2. Aplicações farmacológicas

O uso do barbatimão para finalidades medicinais é vastamente difundido entre o conhecimento popular (FERREIRA-LOPES *et al.*, 2021). Os compostos químicos que baseiam o uso medicinal desta espécie encontram-se, em sua maioria, na casca, entrecasca e no caule seco da planta, os quais contêm expressivas quantidades de taninos totais e condensados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Há mais de 200 artigos que relacionam o uso fitoterápico dos extratos do barbatimão, com mais de 200 artigos relatados nos diversos portais de periódicos. A maioria destas publicações são relativas às propriedades biológicas das espécies de barbatimão, principalmente no tratamento de infecções e doenças inflamatórias, bem como na avaliação de processos cicatrizantes, destacando os diversos usos etnofarmacológicos da espécie (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2018). As aplicações farmacológicas do barbatimão derivam do potencial anti-inflamatório, antioxidante e anti-carcinogênico dos extratos obtidos da espécie, principalmente das cascas do caule, auxiliando no tratamento de doenças como infecções, úlceras, traumas cutâneos, hematomas e inflamações (SABINO, 2018; SOUZA-MOREIRA, 2018; AUDI, 1999; HENRIQUES, 2016).

Os taninos presentes na casca do caule do barbatimão foram eficientes para o tratamento antifúngico de *Candida albicans* em camundongos infectados, onde verificou-se que os taninos condensados presentes nos extratos atuam através de mecanismos de inibição de proliferação de fungos (FREITAS *et al.*, 2018). Atividades semelhantes foram obtidas no combate a infecções fúngicas por *Pythium insidiosum* em análises *in vitro* e em coelhos com o extrato da casca do barbatimão, cuja ação direta antifúngica foi determinante para a redução do quadro inflamatório e para a cicatrização de feridas na pele (TROLEZI *et al.*, 2017). Da mesma forma, os taninos e proantocianidinas presentes nos extratos do barbatimão foram benéficos para o favorecimento do reparo tecidual em ratos diabéticos através do melhoramento da produção de tecidos ricos em colágenos e células precursoras de processos de cicatrização (queratinócitos) (PINTO *et al.*, 2015).

Dentre as várias atividades medicinais da *Stryphnodendron adstringens* já relatadas na literatura, os flavonóides e taninos presentes na espécie também foram determinantes para a

ação antiofídica, através da inibição da ação de envenenamento pela espécie de cobra jararacuçu (*Bothrops jararacussu*), através da inibição da coagulação sanguínea e da proteólise do veneno, bem como da inibição de hemorragias em testes feitos em camundongos (JUNIOR *et al.*, 2020). Carvalho *et al.*, (2020) verificaram o papel dos extratos do barbatimão na modulação da atividade de macrófagos M1 e M2 (precursores de respostas imunológicas a processos inflamatórios) utilizando células de medula óssea de camundongos, onde verificou-se que os extratos hidroalcoólicos do barbatimão possuem capacidade de modulação de macrófagos e podem ser utilizados no tratamento de distúrbios inflamatórios.

2.3. Produção de metabólitos secundários

Desde a antiguidade, os seres humanos utilizam-se de plantas para finalidades terapêuticas. Desde então, a ciência tem buscado elucidar as interações ambientais e a morfologia vegetal para a produção de compostos biologicamente ativos de alto interesse comercial e industrial, principalmente no ramo da medicina (EL-HAWARY *et al.*, 2012).

O metabolismo primário vegetal corresponde a processos energéticos capazes de produzir metabólitos primários como os açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e lipídios presentes intrinsecamente nos diferentes organismos e tecidos da planta, exercendo funções essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução, exercendo influência sobre a altura e formato dos órgãos (CASTRO-MORETTI, 2020; FANG *et al.*, 2018).

Os metabólitos secundários remetem às respostas aos diferentes estímulos ambientais, com vistas a garantir a adaptação das plantas frente às mudanças do ambiente a qual está inserida, possuindo papel fundamental na manutenção e proteção, bem como nas funções de polinização, sinalização entre organismos e efeitos alelopáticos (BASAID, 2021). São estruturas complexas, com baixo peso molecular e concentrações, característicos pelas atividades biológicas marcantes, úteis para finalidades médicas (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Após as fases iniciais de desenvolvimento vegetal, na qual a planta produz alta quantidade de metabólitos primários (carboidratos, lipídeos e aminoácidos), a fase de maturação da planta, onde há melhor adaptabilidade ao ambiente externo, a planta produz maiores índices de metabólitos secundários em relação aos primários, devido às interações constantes que a planta possui com o meio ambiente, sendo fundamentais para o desenvolvimento e propagação de espécies vegetais (NAMDEO, 2007). Estas interações resultaram na evolução de vias

metabólicas secundárias, permitindo a síntese de uma variedade de biomoléculas capazes de exercer funções eco-interativas no ambiente, prevenindo a autotoxicidade devido ao afastamento de tais compostos do metabolismo primário principal. (TETALI, 2018).

O metabolismo secundário vegetal ocorre com a produção de substâncias responsáveis pela defesa e proteção das plantas às diversas condições adversas encontradas na natureza e diferentes patologias, exercendo funções essenciais para o desenvolvimento da planta (PATRA *et al.*, 2013). A síntese de metabólitos secundários em espécies vegetais ocorre pela expressão coordenada de várias expressões genéticas, que a partir destas produzem enzimas para a biossíntese vegetal, podendo ocorrer tanto nos órgãos com maiores acúmulos ou transportado entre os diferentes órgãos vegetais (YAZAKI, 2006). Os metabólitos secundários presentes nas plantas podem ocorrer de forma constitutiva, estando presente na forma saudável e biologicamente ativa da planta, ou como resposta a danos nos tecidos ou do ataque de organismos patogênicos, como forma de proteção das plantas a estresses bióticos ou abióticos (JAIN *et al.*, 2019).

A complexidade que envolve a presença, composição, propriedades químicas e concentrações no ambiente impede a sua síntese em quantidades satisfatórias do ponto de vista comercial e medicinal, devido à indisponibilidade de um material uniforme para extração de metabólitos secundários, não sujeito às diversas variações do ambiente (ESPINOSA-LEAL *et al.*, 2018). Diante deste cenário, o método de micropropagação através da cultura de tecidos possibilita fornecer uma fonte contínua e uniforme de produção de metabólitos secundários aplicáveis no âmbito medicinal, sem interferências sazonais ou geográficas (RAMAWAT, 2021).

2.4. Metabólitos secundários no barbatimão

O crescente uso medicinal do barbatimão se correlaciona com os altos índices de compostos fenólicos, taninos, proantocianidinas, ácido gálico e flavonoides encontrados na espécie (GOMES *et al.*, 2021). Estes compostos estão ligados às atividades antioxidantes, quimioprevenção e quimioterapia, devido ao alto potencial de inibição do crescimento de células cancerígenas proporcionadas pela ação antioxidante dos metabólitos secundários (SABINO *et al.*, 2018).

A composição química do barbatimão inclui uma variedade de taninos condensados, principalmente proantocianidinas e ácido gálico, majoritariamente presentes em sua casca do

caule, quantificáveis pelo método cromatográfico (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2018). Semelhantemente, concentrações relevantes de flavonoides, compostos fenólicos, ácido gálico, catequinas, taninos condensados e ácidos fenólicos no barbatimão também foram identificados por Gomes *et al.*, (2021) através de cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas.

Quantidades significativas de fenóis totais, taninos condensados, compostos fenólicos e ácido gálico foram verificados nos extratos de cascas e folhas de três espécies de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron polyphyllum* e *Dimorphandra mollis*) através do método cromatográfico (SANTOS *et al.*, 2002; RICARDO *et al.*, 2018). Resultados semelhantes de teores de fenóis totais no barbatimão foram detectados em calos produzidos *in vitro* (CASTRO *et al.*, 2009).

A produção de taninos e compostos fenólicos no barbatimão pode sofrer variações em decorrência de fatores geográficos e do aumento do extrativismo na espécie, onde a prática de remoção das cascas do caule e de grandes frações do tronco da planta afeta o desenvolvimento e a produção de sementes e metabólitos secundários, revelando assim a necessidade de conservação da espécie (CORRÊA *et al.*, 2012).

Devido à grande relevância científica e social da espécie no contexto da medicina popular, um tema relevante tem sido as consequências do extrativismo do barbatimão, principalmente das cascas do caule e parte aérea, para a preservação e continuidade da espécie (FILHO e FELFILI, 2003). No estudo realizado por Feitosa *et al.*, (2014) sobre os níveis de extrativismo predatório do barbatimão na Floresta Nacional do Araripe, localizada na divisa entre os estados do Pernambuco e Ceará, verificou-se que 32% dos indivíduos amostrados em um dos sites apresentaram sinais de extrativismo independentemente do porte da planta.

A fim de reduzir os efeitos predatórios do extrativismo do barbatimão, foi elaborado em 2017 o “Caderno extrativista do barbatimão” pelo Ministério do Meio Ambiente, Agricultura e Pecuária, trazendo informações técnicas para fomentar o extrativismo de forma sustentável do barbatimão (BRASIL, 2017). Visando verificar os níveis de degradação ambiental das populações do barbatimão, têm-se aplicado ferramentas de geoprocessamento como a modelagem de nicho ecológico (MNE), que correlaciona as atividades antropogênicas crescentes da espécie e às mudanças climáticas, onde foi verificado um cenário pessimista quanto à continuidade da espécie para as futuras gerações (BARBOSA *et al.*, 2019).

Diante deste cenário, além de fomentar práticas para a redução do extrativismo exploratório do barbatimão, torna-se crucial a adoção de métodos de cultivo que possibilitem a

propagação, produção de compostos farmacologicamente ativos e a prática da conservação ambiental da espécie, dentre os quais destaca-se o método de propagação *in vitro* de culturas vegetais, que utiliza o ambiente controlado do laboratório para a germinação, crescimento e propagação vegetal, conservando assim o germoplasma da espécie e reduzindo a pressão sobre os ecossistemas naturais devido às práticas extrativistas (SILVEIRA *et al.*, 2009).

2.5. Aspectos da propagação *in vitro*

O processo de propagação *in vitro* é amparado inicialmente pela teoria da totipotência celular, postulada por Haberlandt (1902). Para tanto, diferentes estímulos químicos como vitaminas, macronutrientes, micronutrientes, aminoácidos, reguladores de crescimento, são fornecidos em um ambiente laboratorial, somados a fatores físicos controlados como temperatura e fotoperíodo, capazes de estimular o explante a promover a diferenciação e especialização celular, originando assim uma nova planta (FIGUEIREDO, 2019; STEWARD *et al.*, 1970).

Desde a década de 40 há relatos na literatura sobre a micropropagação de diversas espécies, como no estudo conduzido por Overbeek *et al.*, (1941) no desenvolvimento de um protocolo de cultivo *in vitro* da trombeta (*Datura stramonium*). Posteriormente, os métodos foram sendo aperfeiçoados, permitindo o desenvolvimento de outros protocolos para o cultivo de espécies contendo quantidades significativas de macro e micronutrientes que possibilitem o desenvolvimento meristemático de diversas espécies (SHAHZAD *et al.*, 2017). Resultados importantes para o desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* foram obtidos por (MURASHIGE e SKOOG, 1962) para o cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum*), e este meio tornou-se o meio basal mais amplamente utilizado nos trabalhos científicos envolvendo a técnica de cultura de tecidos das mais diversas espécies vegetais (PHILLIPS e GARDA, 2019).

Para que se obtenha sucesso na execução e replicação de protocolos de micropropagação de espécies vegetais, existem fatores determinantes que devem ser controlados de forma a favorecer o desenvolvimento das cultivares (OSENÍ *et al.*, 2018). Além do meio nutritivo, a idade e estrutura dos tecidos vegetais dos explantes, método de assepsia e desinfecção inicial utilizado podem determinar o sucesso ou o insucesso do estabelecimento de cultivares através da propagação *in vitro* (FIGUEIREDO, 2019).

Desde o estabelecimento dos protocolos, somados aos avanços da biotecnologia vegetal, tem-se visto a ocorrência e a crescente produção de publicações envolvendo as técnicas de

germinação e micropropagação de espécies vegetais. Este ramo tem se tornado importante para as indústrias farmacêuticas e de produtos naturais, de modo que o cultivo em laboratório permita a eliminação de doenças em plantas e o melhoramento genético, levando a produção de material vegetal de alta qualidade em um curto período e em um ambiente com fatores ambientais controlados (SOUZA *et al.*, 2018).

Dentre os diversos parâmetros que balizam o desenvolvimento de culturas sob as técnicas de Cultura de Tecidos, destacam-se o uso de reguladores de crescimento, que são substâncias sintéticas com propriedades de induzir efeitos semelhantes aos produzidos pelos hormônios naturais (CARVALHO *et al.*, 2006), como as auxinas e citocininas. As auxinas são essenciais no desenvolvimento vegetal, devido às modificações na parede celular promovidas no processo de divisão, permitindo a flexibilidade e alongamento celular, possibilitando a formação de novos tecidos (ALARCÓN *et al.*, 2019). As auxinas também são responsáveis por estimular respostas fisiológicas, quando utilizadas na indução de inflorescências e formação vascular (CHENG *et al.*, 2006). Ainda, as auxinas são fundamentais para o desenvolvimento do caule e do meristema apical nas plantas, estando localizadas em maiores quantidades nas extremidades da parte aérea (VERNOUX *et al.*, 2010).

As citocininas são responsáveis por viabilizar e estimular o processo de divisão celular, bem como na regeneração de brotos (WANG *et al.*, 2020). Maior eficiência na proliferação de brotações, bem como do número e comprimento de raízes foram verificados através do incremento de citocininas (BEKIRCAN *et al.*, 2018). No barbatimão, a presença de citocininas foi significativa para a produção de calos no barbatimão, induzidas através de 6-benzilaminopurina (BAP) em baixas luminosidades (CASTRO *et al.*, 2009).

Skoog e Miller (1957) demonstraram que as respostas do desenvolvimento de tecidos vegetais *in vitro* depende de um adequado balanço entre auxinas e citocininas, de modo que, aumentando a concentração de auxinas, desencadeia-se a formação de raízes, e aumentando a concentração de citocininas inicia-se um processo de formação de gemas adventícias, sendo que em um balanço intermediário, ocorre a formação de tecidos indiferenciados, como os calos, indicando assim a importância do controle de balanço hormonal entre as cultivares *in vitro*.

Além do uso de reguladores de crescimento, outras substâncias têm sido utilizadas com o objetivo de otimizar e melhorar os protocolos de propagação *in vitro*, como é o caso do carvão ativado, que tem sido acrescentado nos meios de cultivo. Como exemplo tem-se o estudo conduzido por Wang e Huang (1976), que verificou resultados satisfatórios no crescimento radicular e da parte aérea da orquídea borboleta (*Phalaenopsis*) *in vitro* quando adicionado de

3 g L⁻¹ carvão ativado no meio de cultivo, bem como no desenvolvimento radicular do gengibre (*Zingiber officinale*), *Cymbidium* spp e *Dendrobium*.

O desenvolvimento de diferentes métodos de propagação *in vitro*, com meios de cultura que otimizam o processo de regeneração de tecidos vegetais, possibilita a obtenção de compostos bioativos de interesse comercial de maneira uniforme (RAMAWAT, 2021). Desta forma, as técnicas de micropropagação tornam-se ferramentas promissoras na síntese de metabólitos secundários e produção de biomassa vegetal em ambiente homogêneo e a posterior extração de compostos de interesse, sem que ocorra a degradação de populações para obtenção de compostos com finalidades médicas ou comerciais (SOUZA *et al.*, 2018).

Costa *et al.*, (2012) verificaram a maior concentração de ácidos fenólicos e maior potencial antioxidante em cultivares de *Thymus lotocephalus* produzidos sob *in vitro*, permitindo a neutralização de radicais livres e protegendo o cérebro de camundongos contra a peroxidação lipídica. De modo semelhante, Appelhagen *et al.*, (2018) verificaram que a produção de antocianinas, pigmentos vegetais responsáveis pela coloração avermelhada a diversas espécies se flores e frutas e atuantes como corantes naturais nas indústrias de alimentos e cosméticos, ocorreu em maiores quantidades em tabaco (*Nicotiana tabacum*) através da propagação *in vitro*, sendo também aplicável para a *Arabidopsis thaliana*.

As ferramentas biotecnológicas que envolvem a produção de metabólitos secundários por meio das diversas técnicas da cultura de tecidos possibilitam a produção e extração de compostos biologicamente ativos, favorecidos pelo desenvolvimento de técnicas que explorem as capacidades biossintéticas e de regeneração celular, eliminando a presença de substâncias potencialmente interferentes que ocorrem nas plantas cultivadas no ambiente externo e fornecendo uma fonte contínua e confiável de produtos naturais por meio de técnicas escaláveis, contribuindo para um aumento considerável nas possibilidades de aplicação dos métodos de cultura de tecidos para o desenvolvimento de culturas e a produção de metabólitos secundários independentemente de condições ambientais e sazonais (JAIN *et al.*, 2019; FILOVÁ, 2014).

O papel desempenhado pela biotecnologia na produção de compostos biologicamente ativos de interesse industrial tem elevada relevância na redução da exploração de recursos naturais (ESPINOSA-LEAL *et al.*, 2018), ao passo em que o advento das técnicas de cultura de tecidos, tornou possível a obtenção de altos níveis de compostos biologicamente ativos em condições otimizadas, através da replicação de um meio de cultivo e de uma espécie de interesse, e o melhoramento dos protocolos de cultivo, atendendo ao objetivo de suprir a

demanda da indústria farmacêutica com menor pressão sobre os recursos naturais não renováveis (ISAH *et al.*, 2017).

Contudo, mesmo sabendo que o sistema de cultivo *in vitro* ofereça controle aos eventos e situações da natureza, ainda não está completamente claro se em todos os casos o sistema *in vitro* de espécies vegetais é mais vantajoso do que os sistemas de produção em casas de vegetação do ponto de vista de qualidade e de quantitativos da produção de metabólitos secundários (WYSOKIN e GRZEGORCZYK-KAROLAK, 2016). Desta forma, tem-se uma lacuna para se comparar as duas formas de obtenção extratos vegetais ricos em metabólitos secundários de interesse medicinal.

Com base nas evidências destacadas pela literatura nas pesquisas recentes envolvendo o cultivo e propriedades do barbatimão, é possível afirmar que se trata de uma espécie de elevado interesse medicinal, devido aos altos quantitativos de compostos fenólicos, taninos e flavonoides encontrados na espécie.

Considerando que o barbatimão é uma planta amplamente conhecida pelas suas propriedades e aplicações farmacológicas, favorecida pela alta produção e síntese de metabólitos secundários desta espécie, bem como os impactos ambientais causados pelo extrativismo predatório de uma planta nativa do cerrado, várias possibilidades podem ser inferidas quanto à utilização de compostos biologicamente ativos da espécie, sendo:

- i) A aplicação do método de propagação *in vitro* para a espécie favorece a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico?
- ii) O tipo de meio de cultura utilizado para a micropropagação do barbatimão exerce influência sobre a germinação e produção de metabólitos secundários?
- iii) Existem diferenças qualitativas na produção de metabólitos secundários no barbatimão quando cultivado em casa de vegetação frente à propagação *in vitro*?

3. OBJETIVOS

Estabelecer a germinação *in vitro* e verificar a produção de ácidos fenólicos e flavonóides no barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) comparando-a aos resultados com o cultivo em condições de casa de vegetação.

3.1. Objetivos específicos

- Analisar a germinação do barbatimão quando submetido à técnica de propagação *in vitro* e em casa de vegetação;
- Avaliar a influência do meio de cultura na germinação e produção de metabólitos secundários para a espécie;
- Fornecer informações relevantes sobre a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico do barbatimão por meio da técnica de propagação *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e condição de cultivo *in vitro*

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual do Maranhão, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual do Maranhão (LCT/UEMA), e em Casa de Vegetação. Os experimentos foram conduzidos entre os meses de novembro de 2020 e março de 2021.

Para a realização dos experimentos de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação, foram utilizadas sementes de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) extraídas de área nativa no sudoeste maranhense, provenientes do viveiro do consórcio operador da UHE Estreito - MA (Coordenadas 6°34'57.32"S; 47°26'40.21"O) - CESTE. A região sudoeste maranhense é composta pela transição entre a Floresta Amazônica e o Cerrado, na qual abrange uma porção territorial da Amazônia Legal Brasileira. Conforme a classificação de Köppen (1900), essa área apresenta clima tropical subúmido (Aw), com chuvas concentradas entre novembro e abril (NCB, 2021).

Em câmara de fluxo laminar, foram utilizados, como explantes, sementes de barbatimão, no qual foram desinfestadas em álcool 70% por dois minutos, seguido de hipoclorito de sódio (NaClO), na concentração de 2% de cloro ativo, adicionada de duas gotas de Tween[®], por 15 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas água destilada autoclavada por cinco vezes. Após esta desinfestação, realizou-se a quebra de dormência das sementes, com incisão ou corte transversal com bisturi ao lado oposto ao embrião da semente. Três sementes foram inoculadas em frascos contendo 30 mL dos diferentes tratamentos (Tabela 1). As condições de meio de cultura foram definidas com base nos últimos estudos envolvendo a germinação de sementes *in vitro*.

Tabela 1: Diferentes tratamentos utilizados para a propagação *in vitro* de *Stryphnodendron adstringens*.

Cod.	Tratamentos
Controle	Cultivo em casa de vegetação
T1	MS 0 (sem regulador de crescimento) + 100 mg L ⁻¹ de mio-inositol + 30 g L ⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar

T2	Água destilada + 100 mg L ⁻¹ de mio-inositol + 30 g L ⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar
T3	MS + 11,09 µM de BAP + 0,54 µM de ANA + 100 mg L ⁻¹ de mio-inositol + 30 g L ⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar
T4	MS + 1,44 µM de ácido giberélico (GA ₃) + 0,54 µM de ANA + 100 mg L ⁻¹ de mio-inositol + 30 g L ⁻¹ de sacarose + 6,5 g L ⁻¹ de ágar-ágar
T5	MS + 11,09 µM BAP + 0,54 µM ANA + 100 mg L ⁻¹ de mio-inositol + 30 g L ⁻¹ de sacarose + 6,5 g L ⁻¹ de ágar-ágar + 1 g L ⁻¹ de carvão ativado

Em todos os tratamentos o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 121°C sob pressão de 108 kPa por 20 min.

Inicialmente, foram inoculadas três sementes por frasco, e após cinco dias do início do experimento, foi mantido apenas uma semente por frasco em todos os tratamentos, para evitar a ocorrência de efeitos toxicológicos (alelopatia) durante a germinação das sementes. Os explantes foram mantidos por 60 dias em condições de sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, irradiância luminosa de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provenientes de lâmpadas tubulares do tipo diodos emissores de luz (LED, de cor branco).

4.2. Germinação em casa de vegetação

Para a germinação em casa de vegetação, foram utilizadas sementes selecionadas, excluindo sementes danificadas. Parte destas sementes foram germinadas em condições de casa de vegetação, foi aplicado o processo de escarificação mecânica, com fricção do lado oposto ao embrião da semente com lixa nº 220 durante 20 segundos (MARTINS *et al.*, 2008).

Foi utilizada uma semente escarificada por recipiente (tubete de polietileno de 10 cm de altura e diâmetro de 5 cm), com covas de 0,5 cm em uma proporção de areia e substrato comercial Quixaba[®] (composto orgânico) (proporção 2:1), mantidos em casa de vegetação com cobertura de telhas de polietileno transparente e cercada lateralmente com sombrite a 50% de luminosidade, com temperatura média do ar em 25°C , umidade relativa do ar média em 85%, submetido a irrigações automáticas de três vezes por dia por 5 minutos através de bomba com temporizador por nebulização (vazão 7 L/hora). As avaliações das plântulas ocorreram após 60 dias após semeadura.

4.3. Variáveis analisadas

Aos 60 dias de inoculação, foram avaliados número e folhas (NF, unidades), altura da parte aérea (APA, cm), comprimento da maior raiz (CR, cm), diferença entre massa fresca e seca da parte aérea (MPA, g), diferença entre massa fresca e seca da raiz (MR, g) e largura média das folhas (LF, cm), produção de metabólitos secundários.

Para as diferentes variáveis analisadas, as plântulas foram separadas por meio de corte transversal com bisturi, divididas entre parte aérea e sistema radicular, pesadas em balança analítica (precisão 0,001g), acondicionadas em sacos de papel e levadas a estufa de secagem e esterilização a 70 °C por um período de aproximadamente 72 h.

Após a pesagem das plântulas frescas (parte aérea e radicular), foram avaliadas as características de germinação, morfológicas e de desenvolvimento entre os tratamentos. Para as avaliações de altura da plântula e comprimento das raízes, as avaliações foram realizadas com paquímetro digital.

4.4. Avaliação química do barbatimão

A avaliação química dos tratamentos foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Centro de Ciência e Tecnologia (CCET) / Departamento de Química da Universidade Federal do Maranhão, campus São Luís, no período entre janeiro e fevereiro de 2021.

As análises de produção de metabólitos secundários entre os tratamentos foram feitas a partir da coleta da parte aérea (folhas frescas) das plântulas de barbatimão (nos diferentes tratamentos, T1 a T5) e das plântulas germinadas em condições de casa de vegetação, seguida por maceração manual por aproximadamente 10 min, compondo um hidromódulo com proporção 1:8 (1 parte de folhas para 8 partes de metanol). Posteriormente, as amostras foram dispostas em sonicador UltraCleaner 750® por 15 min, e então centrifugadas em centrífuga CentriBio® a 4.000 rpm por aproximadamente 10 min. Em seguida, foi feita a separação da parte líquida do extrato sobrenadante, e acondicionada em refrigerador a 5 °C.

Para a leitura das composições químicas foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA) da marca Shimadzu com detector PDA-SPD-20AT, Coluna Luna C18, 150 x 4,8 mm, e 5µ de partícula. Foi utilizado método gradiente exploratório de 5 a 100% de metanol em tempo de corrida de 30 min utilizando como fase móvel água e metanol. O fluxo foi de 1 mL / min, e a temperatura da coluna de 20 °C. O volume de injeção da amostra

foi de 20 µL. Inicialmente, foi obtido o perfil cromatográfico do extrato metanólico do barbatimão, onde foram verificados os picos representativos dos espectros no UV para ácidos fenólicos e flavonóides.

4.5. Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos a análise de variância entre tratamentos e controle, com magnitude dos efeitos mensurada por meio do coeficiente η^2 . Os parâmetros que apresentaram dados não normais foram submetidos à transformação matemática pelo modelo $Y' = \sqrt{Y + 0,5}$, conforme o coeficiente de verossimilhança de Box-Cox. Comparações entre as médias dos tratamentos e controle foram feitas pelo teste de Dunnett a 5% de significância. As análises foram conduzidas no software livre R Studio (R Studio Team, 2020).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de cultivo de *Stryphnodendron adstringens*, houve efeito significativo dos tratamentos nas variáveis altura da parte aérea (APA), comprimento da maior raiz (CR) e na diferença entre massa fresca e seca da raiz (MR; Tabela 2).

Tabela 2: Análises de variância em relação aos tratamentos experimentais

		QM	F	p	η^2
NF	Tratamentos	86,50	2,07	0,117 ^{ns}	0,365
	Resíduos	41,86			
	Total				
APA	Tratamentos	19,10	3,15	0,033*	0,466
	Resíduos	6,07			
	Total				
CR	Tratamentos	21,69	4,21	0,010**	0,539
	Resíduos	5,15			
	Total				
MPA	Tratamentos	0,018	0,47	0,794 ^{ns}	0,116
	Resíduos	0,037			
	Total				
MR	Tratamentos	0,010	9,67	0,000***	0,729
	Resíduos	0,001			
	Total				
LF	Tratamentos	19,85	1,98	0,130 ^{ns}	0,355
	Resíduos	10,01			
	Total				

“NF” = número de folhas, “APA” = altura da parte aérea, “CR” = comprimento radicular, “MPA” = diferença entre massa fresca e seca da parte aérea, “MR” = diferença entre massa fresca e seca da raiz, e “LF” = largura da folha; *, **, ou *** indicam significância estatística com 95%, 99% e 99.9% confiança, respectivamente; ^{ns} indica “não significante estatisticamente”.

5.1. Parâmetros morfológicos e de crescimento *in vitro*

Após o período de 60 dias de cultivo, verificou-se que houve germinação das sementes, tanto as submetidas ao tratamento controle (condições de casa de vegetação), quanto no cultivo *in vitro* (Figura 1).

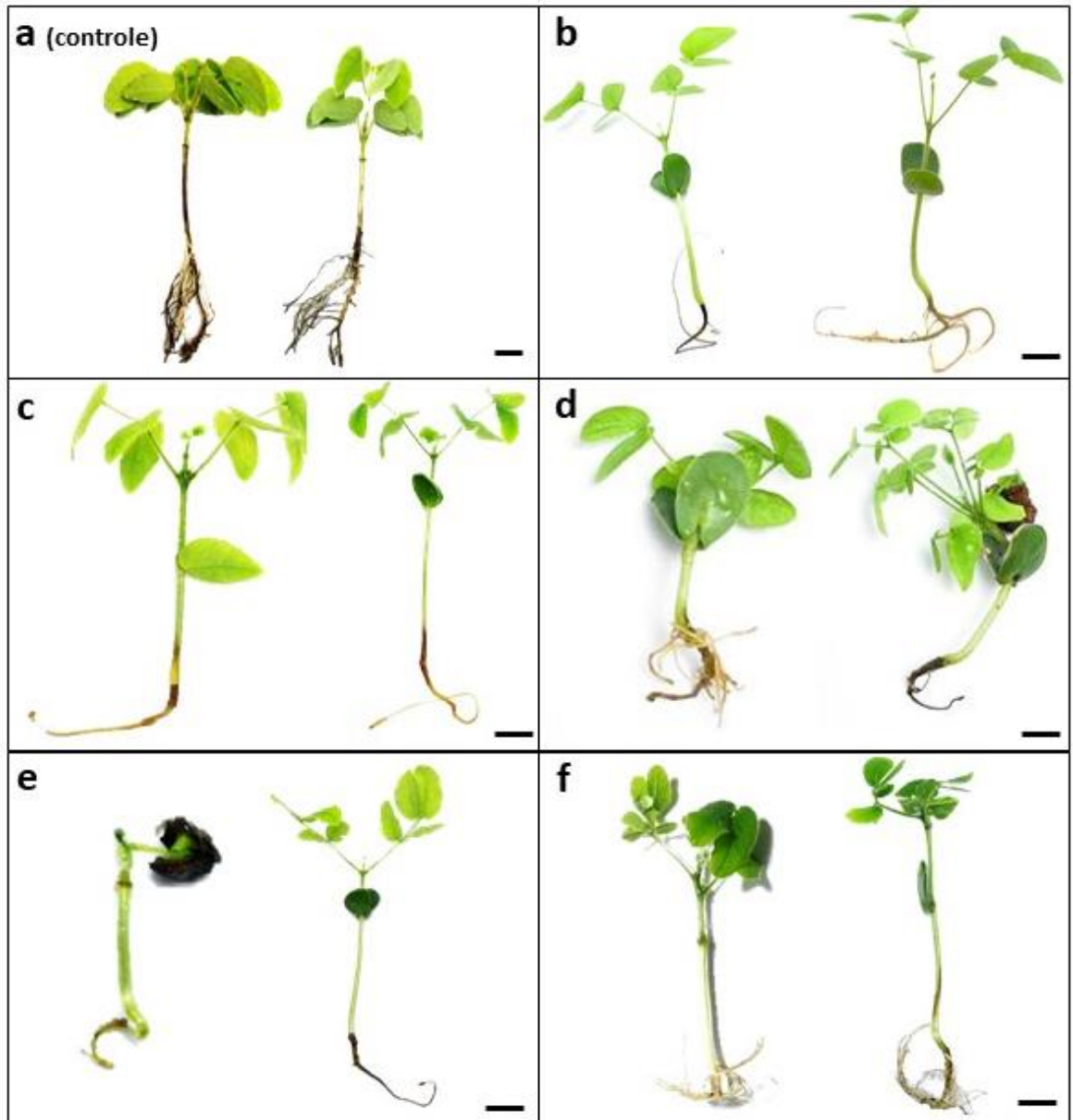


Figura 1: Propagação *in vitro* de sementes de *Stryphnodendron adstringens* após 60 dias de cultivo. (a) controle (plantio em condição de casa de vegetação). (b) T1 (MS 0 + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar); (c) T2 (Água destilada + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); (d) T3 (MS + 11,09 µM de BAP + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); (e) T4 (MS + 1,44 µM de ácido giberélico (GA₃) + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar); (f) T5 (MS + 11,09 µM BAP + 0,54 µM ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar + 1 g L⁻¹ de carvão ativado). Barras de escala a-f = 1 cm.

Para a variável número médio de folhas (NF), foi possível observar que as plântulas do tratamento controle (em condições de casa de vegetação), apresentaram valores superiores quando comparadas às cultivadas *in vitro*, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2a).

Para a variável altura da parte aérea (APA) as plântulas dos cultivos *in vitro* T1 e T5 apresentaram médias superiores ao controle e aos demais cultivos, havendo diferenças significativas entre as médias (Figura 2b). No entanto, as condições de cultivo em T5 proporcionaram o crescimento da parte aérea das plântulas com maior homogeneidade.

Para a variável comprimento da maior raiz (CR) verificaram-se diferenças significativas entre os tratamentos, onde as plântulas em condições de casa de vegetação (controle) apresentaram valores superiores quando comparado aos tratamentos *in vitro* (Figuras 1a e 2c).

Os resultados obtidos para a variável diferença entre a massa fresca e seca da parte aérea (MPA) foram similares entre as plântulas dos tratamentos controle e *in vitro*, não apresentando diferenças significativas. No entanto, a variável diferença entre a massa fresca e seca das raízes (MR) apresentou diferenças significativas, onde foram verificados resultados superiores para as plântulas em condições de casa de vegetação (controle) comparado às plântulas germinadas *in vitro* (Figuras 1a e 2e).

Com relação à variável largura das folhas (LF), os resultados obtidos para o parâmetro não apresentaram diferenças significativas, no entanto verificou-se que as plântulas submetidas às condições de cultivo em T5 obtiveram desempenho similar ao controle em condições de casa de vegetação (Figuras 1a e f; 2f).

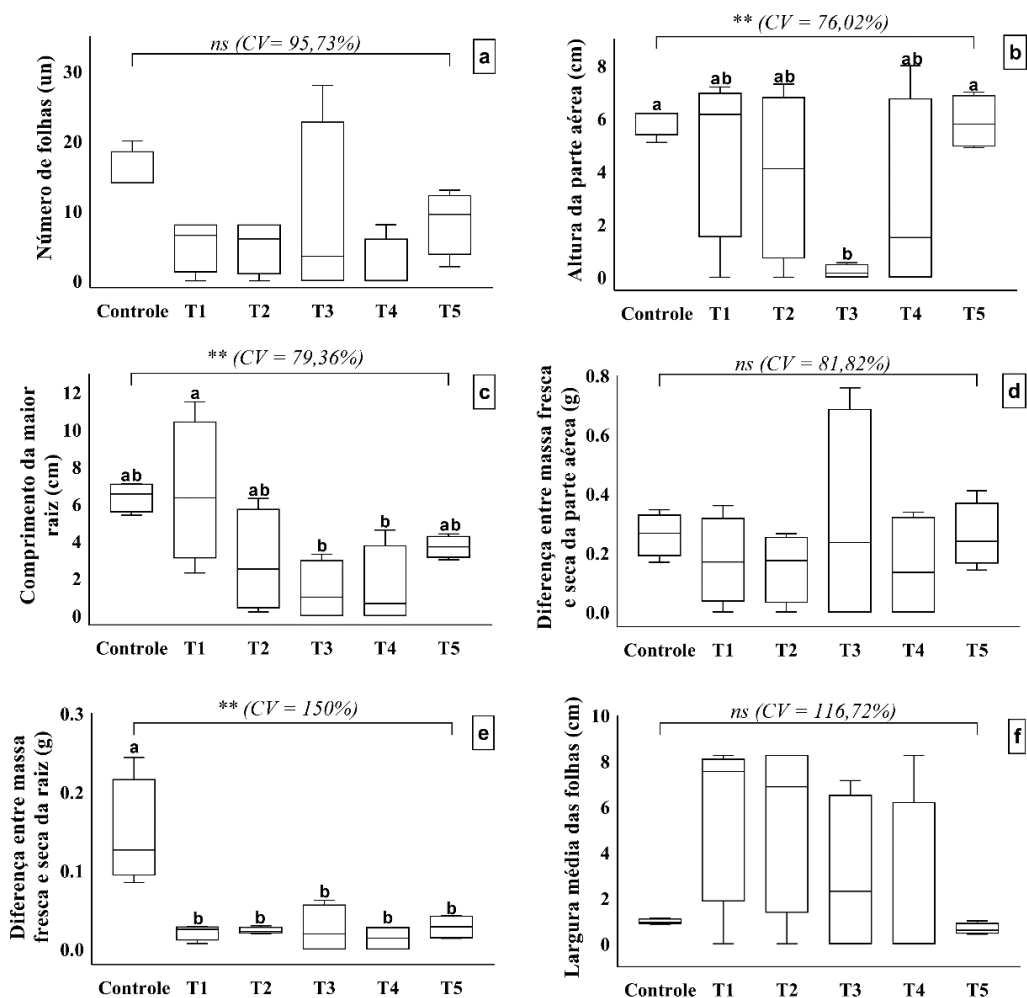


Figura 2: Parâmetros morfológicos e de crescimento *in vitro* de *Stryphnodendron adstringens*. **(a)** Número de folhas (un); **(b)** Altura da parte aérea (cm); **(c)** Comprimento da maior raiz (cm); **(d)** Diferença entre massa fresca e seca da parte aérea (g); **(e)** Diferença entre massa fresca e seca da raiz (g); **(f)** Largura média das folhas (cm). Tratamentos: controle (plantio em condição de casa de vegetação); T1 (MS 0 + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar); T2 (Água destilada + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); T3 (MS + 11,09 µM de BAP + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); T4 (MS + 1,44 µM de ácido giberélico (GA₃) + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar); T5 (MS + 11,09 µM BAP + 0,54 µM ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar + 1 g L⁻¹ de carvão ativado). Notas: Médias acompanhadas por letras iguais indicam indiferenças significativas pelo teste Dunnett ao nível de significância de 5%. O termo “ns” indica diferenças não significativas.

Para o parâmetro altura da parte aérea (APA), as concentrações de ANA presentes no meio de cultivo em T5 podem ter influenciado o desenvolvimento dos meristemas apicais das plântulas, promovendo uma maior homogeneidade no crescimento da parte aérea. As auxinas presentes no meio de cultura, induzem a correlações entre fatores de transcrição e síntese proteica, que impulsionam o desenvolvimento do meristema apical nas fases iniciais de desenvolvimento das plântulas, desempenhando um papel fundamental na regulação do crescimento vegetal (VERNOUX *et al.*, 2010). Associado às auxinas, as concentrações de sais presentes no meio de cultura podem desencadear um aumento da quantidade de nitrogênio disponível no meio, desencadeando o crescimento da parte aérea da planta (BANDINELLI *et al.*, 2013).

Estas interações foram abordadas por Ljung *et al.* (2001), que verificaram o transporte e a biossíntese de auxinas através da quantificação da sua concentração nas folhas, cotilédones e tecidos radiculares em *Arabidopsis thaliana*, concluindo que esta interação é fundamental para a regeneração de tecidos vegetais vinculados ao crescimento da parte aérea das plantas, além de também se comunicar com a síntese de citocininas. Ainda, Nakka e Devendra (2012) também avaliaram parâmetros de germinação *in vitro* em espécies de crotalaria (*C. prostrata*, *C. retusa* e *C. medicagenea*), e obtiveram resultados superiores para o crescimento aéreo das plântulas com o uso dos tratamentos combinados de ANA, quando comparados aos demais reguladores de crescimento.

Ikeuchi *et al.*, (2016) realizaram uma vasta revisão sobre a capacidade regenerativa de plantas quando há o equilíbrio entre auxinas e citocininas, e a sua importância no desenvolvimento vegetal bem como fatores determinantes para a organogênese *in vitro*, de modo que quando ocorrem altas taxas de auxinas à citocininas podem levar ao aumento da regeneração radicular, enquanto altas taxas de citocininas às auxinas tendem a promover a múltiplas brotações.

O uso do carvão ativado no tratamento T5 pode ter favorecido o desenvolvimento da parte aérea no barbatimão, cujos efeitos ocorrem principalmente devido ao potencial de adsorção de compostos inibidores no meio de cultura e reduzindo substancialmente os metabólitos com potencial de toxicidade e oxidação fenólica, estando diretamente envolvido em uma série de estímulos e atividades inibitórias, incluindo a liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão ativado que promovem o crescimento através da adsorção de vitaminas, facilitando também as trocas gasosas (THOMAS, 2008).

Tal hipótese é corroborada pelos resultados obtidos no estudo conduzido por Hunhoff *et al.*, (2018) com orquídeas das espécies *Aspasia variegata*, *Epidendrum viviparum* e *Schomburgkia gloriosa*, que concluiu que o meio de cultura adicionado de carvão ativado favoreceu a germinação *in vitro* nas espécies analisadas, atribuindo os efeitos benéficos do carvão ativado no meio de cultura ao potencial de adsorção de e nutrientes e de prevenção de oxidação desempenhado pelo material. Neste estudo, para os tratamentos que utilizaram como meio de cultivo MS adicionado de 0,3% de carvão ativado, os resultados observados foram superiores para o desenvolvimento da parte aérea frente aos tratamentos sem suplementação. Portanto, o não uso do carvão ativado no meio de cultura pode ter favorecido a ocorrência de efeitos oxidativos e atividades inibitórias na germinação *in vitro* do barbatimão para os demais tratamentos (T1 a T4).

Quanto à variável de crescimento da maior raiz, as plântulas submetidas às condições de cultivo do tratamento T5 apresentaram resultados superiores de alongamento da maior raiz frente aos demais tratamentos *in vitro*. De modo semelhante, no estudo conduzido por Dev *et al.*, (2015) para cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera* a aplicação do meio de cultura MS suplementado com 8,88 μM de BAP + 1,07 μM de ANA + 200 mg L^{-1} de carvão ativado obtiveram índices superiores de crescimento da maior raiz. No barbatimão, França *et al.*, (1995) obtiveram resultados superiores na formação de raízes quando em meio MS com metade das concentrações de macro e micronutrientes suplementado com 5,37 μM de ácido naftaleno acético (ANA) e 80 mg L^{-1} de floroglucinol (benzeno-1,3,5-triol), enquanto a proliferação de brotos a partir de segmentos nodais foi superior quando acrescidos de 13,3 μM de BAP. Pasqual e Barros (1992) também verificaram resultados significativos para a produção de brotos de barbatimão propagados *in vitro* a partir de segmentos nodais, quando induzidos em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 4,0 mg L^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP), e Nicioli *et al.*, (2008) avaliaram a indução de brotações e raízes a partir de segmentos nodais do barbatimão, inoculados em meio MS acrescidos de diferentes concentrações de cinetina (6-furo aminopurina), no qual resultados significativos de indução de gemas e brotos ocorreram quando acrescidas de 1 e 5 mg L^{-1} de cinetina, respectivamente, enquanto as maiores taxas de desenvolvimento radicular observaram em meio MS suplementado de 4 mg L^{-1} de ANA.

As auxinas desempenham papel fundamental na formação radicular (MUDAY, 1994). Quando em leves dosagens, as auxinas exógenas podem substancialmente estimular o alongamento da maior raiz (EVANS *et al.*, 1994). Já a redução da produção de raízes no

processo de micropropagação na cultura de tecidos tem sido relatada pela literatura devido à possível influência das concentrações de BAP utilizadas na fase de multiplicação celular, que pode estimular a inibição do alongamento radicular quando em concentrações não adequadas para o genótipo em estudo (VANKOVA *et al.*, 1991). Deste modo, como perspectivas para próximos estudos sobre a propagação *in vitro* do barbatimão, recomenda-se um maior aprofundamento sobre a concentração de citocininas nos meios de cultivo.

Os valores inferiores de produção de biomassa obtidos no experimento diferiram dos resultados obtidos por Castro *et al.*, (2007) no estudo da germinação de sementes e produção de biomassa no barbatimão através da propagação *in vitro*, onde verificaram-se resultados superiores na formação de matéria fresca e seca quando submetidas ao meio MS e Wood Plant Medium (WPM) completos. Como uma possível forma de mitigar os efeitos antagônicos do meio para a produção de biomassa entre os tratamentos, o estudo dos efeitos de diferentes concentrações do meio MS (1, ½ e ¼) *in vitro* foi conduzido por Rezali *et al.*, (2017) com vistas a avaliar o crescimento de *Typhonium flagelliforme*. Os resultados obtidos apontam produções superiores de biomassa seca na espécie o meio MS. Deste modo, buscando uma otimização dos protocolos de micropropagação do barbatimão para produção de biomassa seca, é importante avaliar meios de cultura que favoreçam tanto as brotações quanto o desenvolvimento aéreo e radicular das plântulas, aumentando os teores de biomassa obtidos.

5.2. Prospecção fitoquímica

A avaliação da produção de metabólitos secundários de interesse medicinal para a *Stryphnodendron adstringens* cultivada *in vitro* foi realizada com base nos cromatogramas de CLAE - DAD obtidos para os extratos metanólicos, onde os picos para ácidos fenólicos e flavonóides ocorreram nos tempos de corrida entre 5 e 10 min e entre 15 e 20 min, respectivamente (Figura 3).

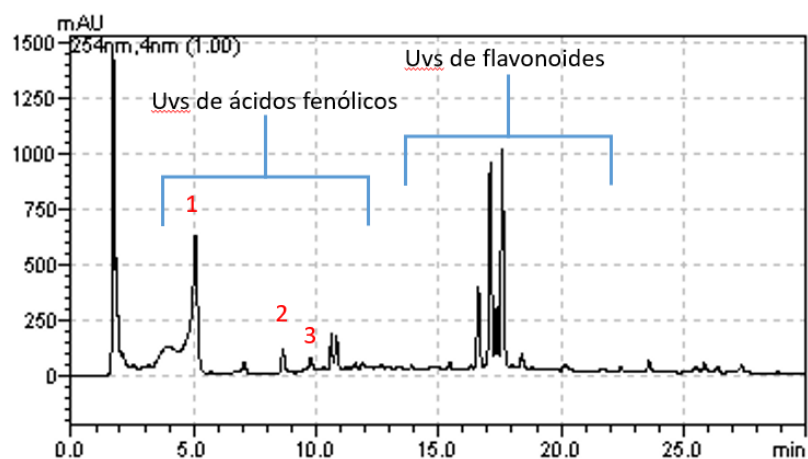


Figura 3: Perfil obtido por CLAE - DAD do extrato metanólico do barbatimão a partir dos espectros no UV dos picos representativos.

Foi possível observar que dentre os tratamentos *in vitro*, o tratamento T5 (MS + 11,09 μM BAP + 0,54 μM ANA + 100 mg L^{-1} de mio-inositol + 30 g L^{-1} de sacarose + 6,5 g L^{-1} de ágar-ágar + 1 g L^{-1} de carvão ativado) mostrou-se o mais eficiente para a produção de compostos fenólicos, cujos valores dos picos são próximos ao tratamento controle (casa de vegetação), principalmente quando comparados aos UVs de ácidos fenólicos (Figuras 4a e 4f). Os demais tratamentos *in vitro* (T1 a T4) foram semelhantes em termos de produção de ácidos fenólicos e flavonoides, quando comparados aos cromatogramas dos demais tratamentos (Figura 3 b-e).

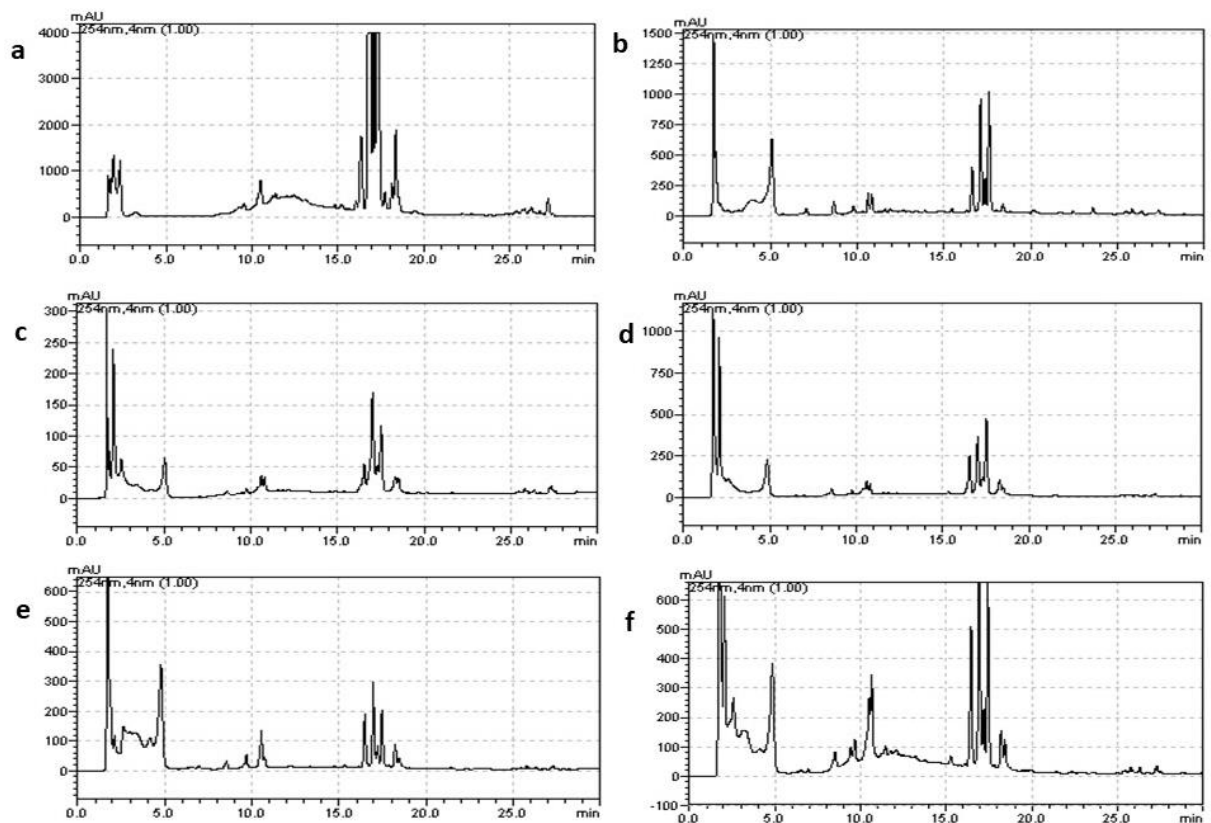


Figura 4: Cromatogramas dos extratos metanólicos de *Stryphnodendron adstringens* cultivados *in vitro* em comparativo ao cultivo em condições de casa de vegetação após 60 dias de cultivo. (a) controle (plantio em condição de casa de vegetação). (b) T1 (MS 0 (sem regulador de crescimento) + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar); (c) T2 (Água destilada + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); (d) T3 (MS + 11,09 µM de BAP + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g de ágar-ágar); (e) T4 (MS + 1,44 µM de ácido giberélico (GA₃) + 0,54 µM de ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar); (f) T5 (MS + 11,09 µM BAP + 0,54 µM ANA + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol + 30 g L⁻¹ de sacarose + 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar + 1 g L⁻¹ de carvão ativado).

Até o presente, não existem relatos na literatura que norteiam a produção de compostos fenólicos e flavonoides em folhas de *Stryphnodendron adstringens* germinadas *in vitro*. Entretanto, de modo similar, Porto *et al.*, (2014) obtiveram dados significativos para a produção de fenóis totais e produção de biomassa em calos de barbatimão *in vitro*, onde resultados superiores de produção de matéria fresca foram obtidos quando inoculados em meio MS adicionados de 0,5 mg L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) associado às concentrações de

0,5, 1 e 2 mg L⁻¹ de tidiazuron (TDZ), no entanto, para a produção de matéria seca resultados superiores foram obtidos na combinação de 0,5 e 2 mg L⁻¹ de TDZ na ausência de 2,4-D. Os resultados superiores obtidos para a produção de fenóis totais foram encontrados nos calos induzidos na suplementação com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2,0 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de Picloram.

Mesmo com a escassez de trabalhos envolvendo o estudo da produção de compostos fenólicos e flavonoides nas folhas do barbatimão após a germinação *in vitro*, é possível estabelecer uma correlação entre as abordagens químicas já realizadas pela comunidade científica para o barbatimão e os compostos verificados através do método cromatográfico.

Santos *et al.*, (2002) verificaram na fração foliar da *Stryphnodendron adstringens* a presença de flavonóides e compostos fenólicos, bem como no estudo conduzido por Junior *et al.*, (2020), onde de modo semelhante compostos fenólicos e flavonóides foram encontrados nos extratos do barbatimão, tendo sido fundamentais na inibição da atividade tóxica do veneno de *Bothrops jararacussu*, atribuindo à planta um potencial no combate aos efeitos tóxicos do veneno, possibilitando a criação de um protocolo que pode ser utilizado em comunidades indígenas ou rurais, combinado à soroterapia.

O extrato da fração foliar do barbatimão foi avaliado por Sabino *et al.*, (2018), com o objetivo de avaliar a composição química, atividade antioxidante e potencial antitumoral da espécie, dada a sua relevância no âmbito medicinal. O estudo verificou a presença de ácido gálico, dímero de procianidina B1 e epicatequina-3-O-galato na composição dos extratos, corroborando com a hipótese da atividade antioxidante e citotóxica do barbatimão. Também através do método de cromatografia líquida de alta eficiência, Gomes *et al.*, (2021) verificaram uma alta produção de derivados de ácidos orgânicos simples e oligômeros de taninos condensados, confirmando a atividade antibacteriana e antioxidante da espécie. Portanto, através destes estudos e dos perfis cromatográficos obtidos para o barbatimão propagado *in vitro*, nota-se que há uma continuidade na produção de metabólitos secundários já destacados de interesse medicinal, apontados na Farmacopeia Brasileira (2010) como pilares para o uso da espécie em finalidades fitoterápicas. Nestas, verifica-se através dos cromatogramas obtidos neste estudo que há uma produção superior destes compostos nas plântulas germinadas nas condições de cultivo do tratamento T5.

O desenvolvimento da parte aérea das plântulas no tratamento *in vitro* T5, em número de folhas, altura e massa das plântulas, indicaram um desempenho superior destas condições de cultivo quando comparado aos demais, e ao controle em condições de casa de vegetação. Os

dados morfológicos do experimento anterior foram confirmados a partir dos cromatogramas obtidos, onde houve produção superior de compostos fenólicos no barbatimão nas plântulas neste tratamento quando comparado aos demais tratamentos *in vitro*.

Este resultado pode indicar que o tratamento T5 (MS + 11,09 μM BAP + 0,54 μM ANA + 100 mg L^{-1} de mio-inositol + 30 g L^{-1} de sacarose + 6,5 g L^{-1} de ágar-ágar + 1 g L^{-1} de carvão ativado) obteve resultados promissores para a produção de metabólitos secundários de interesse medicinal *in vitro*, bem como para a produção de compostos químicos naturais fitoterápicos, de modo que os resultados obtidos neste tratamento obtiveram maior estabilidade nos resultados e remontam à possibilidade de produção de compostos fitoterápicos de forma homogênea e sustentável, sem exercer pressão sobre os ecossistemas naturais.

Contudo, existe alta complexidade ao se trabalhar com o desenvolvimento de metabólitos secundários a partir da propagação *in vitro*, devido às várias relações existentes e às várias respostas aos estímulos exógenos ocasionados pelos tratamentos *in vitro*, como os indutores de crescimento e o balanço hormonal existente nos meios de cultivo.

A fim de confirmar a hipótese de produção em elevadas quantidades de metabólitos secundários *in vitro* no barbatimão utilizando os indutores exógenos BAP e ANA, em meio MS acrescido de carvão ativado, para trabalhos futuros é necessário que haja um aprofundamento nos quantitativos em volume e concentração de metabólitos secundários produzidos através do método cromatográfico, bem como as respostas nos aspectos morfológicos do cultivo *in vitro*, avaliando parâmetros como as variações de trocas gasosas e irradiância luminosa, concentrações de indutores de crescimento (BAP e ANA) e da composição do meio (dosagens de carvão ativado, sacarose e macro e micronutrientes) a fim de apontar quais são as condições ótimas para a micropropagação e posterior produção de metabólitos secundários nestas condições. Desta forma, sugere-se uma avaliação quantitativa acerca da influência de cada variável aplicada no meio de cultivo (indutores de crescimento, composição e concentrações de sais) na produção de metabólitos secundários, de modo a elucidar o comportamento do barbatimão quando induzido pelo carvão ativado e pelo balanço citocininas/auxinas por meio da avaliação em cromatografia líquida de alta eficiência, tornando possível o entendimento e a visualização dos efeitos sobre a planta.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do presente trabalho que teve como objetivo verificar a influência do meio de cultivo na germinação e produção de metabólitos secundários do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), planta de elevado interesse devido à presença de compostos naturais com propriedades fitoterápicas da espécie, utilizando a técnica de propagação *in vitro* e comparando-a aos resultados com o cultivo em condições de casa de vegetação, complementando o conhecimento sobre a micropropagação da espécie e a produção de metabólitos secundários de interesse em condições homogêneas, sem exercer pressão nos ecossistemas naturais.

Com base nos experimentos realizados e dos resultados obtidos neste estudo, podem ser verificados abaixo os resultados mais satisfatórios encontrados em cada fase do cultivo do barbatimão.

Propagação *in vitro*

- Incremento na Altura da parte aérea (APA), comprimento da maior raiz (CR) e diferença entre massa fresca e seca da parte aérea (MPA) em plântulas de *Stryphnodendron adstringens* germinadas em meio MS, adicionado de 11,0 μM de BAP, 0,54 μM de ANA, 0,1 mg L^{-1} mio-inositol, 6,5 g de ágar-ágar, 30 g L^{-1} de sacarose e 1 g.L^{-1} de carvão ativado (T5), com resultados próximos ao controle (condições de casa de vegetação).

Produção de metabólitos secundários

- Maior produção de ácidos fenólicos e flavonóides em plântulas de *Stryphnodendron adstringens* germinadas em meio MS, adicionado de 11,0 μM de BAP, 0,54 μM de ANA, 0,1 mg.L^{-1} mio-inositol, 6,5 g de ágar gel, 30 g L^{-1} de sacarose e 1 g.L^{-1} de carvão ativado (T5), com valores acima do controle (condições de casa de vegetação).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P. DE S. *et al.* Benefits of *Stryphnodendron adstringens* when associated with hydrogel on wound healing in diabetic rats. **Clinical Phytoscience**, v. 7, n. 1, 2021.

ALARCÓN, M. V.; SALGUERO, J.; LLORET, P. G. Auxin Modulated Initiation of Lateral Roots Is Linked to Pericycle Cell Length in Maize. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. January, p. 1–10, 24 jan. 2019.

AOYAMA, E. M. *et al.* Evaluating the effectiveness of the propagation of *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivated *in vitro* and *ex vitro*. **Rodriguesia**, v. 63, n. 2, p. 321–331, 2012.

APPELHAGEN, I. *et al.* Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures. **Metabolic Engineering**, v. 48, n. June, p. 218–232, 2018.

ARMAS, I.; POGREBNYAK, N.; RASKIN, I. A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2017.

ARRUDA, A. L. **Protocolo De Micropropagação Para Morangueiro Cultivar Jonica**. [s.l.]. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2019.

AUDI, E. A. *et al.* Biological Activity and Quality Control of Extract and Stem Bark From *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 328–333, 2004.

BARBOSA, I. L. B. D. *et al.* Geographical distribution of *Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville (Fabaceae): modeling effects of climate change on past, present and future. **Revista Brasileira de Botanica**, v. 42, n. 1, p. 53–61, 2019.

BASAIID, K. *et al.* Biological activities of essential oils and lipopeptides applied to control plant pests and diseases: a review. **International Journal of Pest Management**, v. 67, n. 2, p. 155–177, 2021.

BANDINELLI, M. G; *et al.* Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, p. 242–247, 2013.

BEKIRCAN, T. *et al.* Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. shoots. **Biotech**, v. 8, n. 3, p. 1–9, 2018.

BESSON, J. C. F. *et al.* Revista Brasileira de Biociências Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 8, n. 1, p. 9–13, 2010.

BHANDARI, A. *et al.* *In vitro* propagation and cytological analysis of *Sophora mollis* Royle: an endangered medicinal shrub. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 2021.

BRASIL, **Caderno do extrativista: Boas práticas para o extrativismo sustentável orgânico Caderno do extrativista**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2017.

BRASIL. Monografia da Espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasília, 2014. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/25/Vers--o-cp-Stryphnodendron.pdf> Acesso em 20/06/2021.

BRASIL. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. DAF/SCTIE/MS, fev/2009. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf> Acesso em 20/06/2021.

CAOVILA, L. É.; GIANINI, P. F.; DE MORAES, C. P. Concentração de sacarose e índices de pH no crescimento *in vitro* de oncidium flexuosum SIMS. (*orchidaceae*). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 531–545, 2016.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. DE A.; MEDEIROS, M. J. L. Fatores Inerentes À Micropropagação. **Embrapa**, p. 28, 2006.

CASTRO, A. H. F. *et al.* Cultivo *in vitro* e aspectos da anatomia foliar de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville FABACEAE - PAPILIONOIDEAE]. **Plant Cell Cult.**, v. 3, n. 2, p. 61–68, 2007.

CASTRO, A. H. F. *et al.* Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciênc. agrotec.**, v. 33, n. 2, p. 385–390, 2009.

CHAVES, T. P. **Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro**. [s.l.]. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual da Paraíba, 77p, 2012.

CHENG, Y.; DAI, X.; ZHAO, Y. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. **Genes and Development**, v. 20, n. 13, p. 1790–1799, 2006.

COELHO, M. C. F. *et al.* Germinação de sementes de sucupira-branca [*pterodon pubescens* (benth.) benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 38–48, 2001.

CORRÊA, V. S. *et al.* Geographical variation and quality assessment of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville within Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 7, p. 1349–1356. 2012.

COSTA, F. V. **Influência de fatores ambientais na produção de metabólitos secundários de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. (Asteraceae)**. [s.l.]. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), 128p, 2017.

COSTA, P. *et al.* Thymus lotocephalus wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1253–1260, 2012.

DAVIES, P. J. The Plant Hormone Concept: Concentration, Sensitivity and Transport. **Plant Hormones**, p. 13–38, 1995.

CARDOSO, A. A. S. *et al.* Seed morphometry, *in vitro* germination and vegetative propagation in sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 3, p. 1–7, 2018.

SOUZA, A. V. *et al.* Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciênc. agrotec.**, v. 35, n. 1, p. 92–98, 2011.

DEV, R. *et al.* Comparative *in vitro* multiplication of some grape (*Vitis vinifera*) genotypes. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 85, n. 11, p. 1477–1483, 2015.

EL-HAWARY, S. S. *et al.* Bioactivities, phenolic compounds and *in vitro* propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. **Bulletin of faculty of pharmacy**, cairo university, p. 10–15, 2012.

ERST, A. A.; NUZHDINA, N. S. *In vitro* propagation of endemic species *Hedysarum chajyrakanicum* (Tuva Republic, Russia) and its widespread congener, *H. gmelini* (Fabaceae). **Bio Web of Conferences**, v. 24, p. 00021, 2020.

ESPINOSA-LEAL, C. A.; *et al.* *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 1–18, 2018.

FEITOSA, I. S. O. *et al.* Knowledge and extractivism of *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. in a local community of the Brazilian Savanna, Northeastern Brazil. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 10, p. 64, 2014.

FERRARI, P. DE S. M. *et al.* Evaluation of new protocols to *Curcuma longa* micropropagation: A medicinal and ornamental specie. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 25, p. 367–376, 3 jul. 2016.

FERREIRA-LOPES, R. D. M. *et al.* Conhecimento popular de plantas medicinais no município de São Tomé das Letras-MG. **Ethnoscintia**, v. 6, n. 1, p. 77, 2021.

FIGUEIREDO, J. M. T. **Sistemas de propagação *in vitro* e análise de compostos da *Salicornia* spp. utilizando técnicas cromatográficas Versão final após defesa.** [s.l.]. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade da Beira Interior, 82p, 2019.

FILHO, H. C. B.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Revista Árvore**, v. 27, n. 5, p. 735–745, 2003.

FLORES, R. *et al.* Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 429–437, 2015.

FRANÇA, S. C. *et al.* Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (Barbatimão). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, n. 3, p. 291–293, 1995.

FREITAS, A. L. D. *et al.* Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against fluconazole-resistant *Candida* spp. and treat vaginal candidiasis. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. DE. **Plant propagation by tissue culture 3rd edition**. [s.l.: s.n.]. v. 1

GIFFONI DE CARVALHO, J. T. *et al.* Hydroethanolic stem bark extracts of *Stryphnodendron adstringens* impair M1 macrophages and promote M2 polarization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 254, n. October 2019, 2020.

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

GOELZER, A. *et al.* Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 2, p. 1280–1291, 2019.

GOMES, P. W. P. *et al.* Chemical composition and antibacterial action of *Stryphnodendron pulcherrimum* bark extract, “barbatimão” species: Evaluation of its use as a topical agent. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 6, 2021.

GOULART, S. L. **Características anatômicas, químicas e densidade do Barbatimão**. [s.l.]. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de Lavras, 118p, 2010.

GRZEGORCZYK-KAROLAK, I.; KUŹMA, Ł.; WYSOKIŃSKA, H. In vitro cultures of *Scutellaria alpina* as a source of pharmacologically active metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 1, p. 7, 2016.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. D. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**. v. 35, n. 1, p. 29–33, 2005.

HABERLANDT, G. Experiments on the culture of isolated plant cells. **The Botanical Review**, v. 35, n. 1, p. 68–88, 1902.

HUNHOFF, V. L. *et al.* Nutritional requirements for germination and *in vitro* development of three Orchidaceae species in the southern Brazilian Amazon. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 2, p. 87–94, 24 maio 2018.

IAREMA, L. ***Lippia filifolia* mart. (verbenaceae) cultivada *in vitro*: anatomia foliar, efeito de irradiâncias e de fitorreguladores**. [s.l.]. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de Viçosa, 85p, 2004.

IKEUCHI, M. *et al.* Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms.

Development (Cambridge), v. 143, n. 9, p. 1442–1451, 2016.

INSANI, H. *et al.* The effect of coconut water and benzyl amino purine (BAP) addition to the growth of pineapple from Sipahutar North Sumatera *in vitro* condition. **International Journal of Biological Research**, v. 6, n. 2, p. 29, 2018.

ISAH, T. *et al.* Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures : strategies , approaches , and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, n. 2, p. 239-265, 2018.

ITOO, H. *et al.* *In vitro* plant regeneration of grape cv. Perletle through axillary bud and shoot tip explants. **Indian Journal of Horticulture**, v. 70, n. 2, p. 185–189, 2013.

JACOBSON, B. *et al.* Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 5, p. 163–169, 2005.

JANG, B. K. *et al.* A methodology for large-scale *Athyrium shearerii* gametophyte proliferation and sporophyte production using tissue culture. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 5, p. 519–526, 2019.

JÚNIOR, R. F. G. *et al.* Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 127–134, 2013.

KÖPPEN, W. Versuch Einer Klassifikation Der Klimate, Vorzugsweise Nach Ihren Beziehungen Zur Pflanzenwelt. (Schluss). **Geographische Zeitschrift**, v. 6, n. 12, p. 657–679, 1900.

LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; CAMPELO, M. F. Protocolo para obtenção de plantas de *Cedrela odorata* L. através da cultura de tecidos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2020.

LAZO-JAVALERA, M. F. *et al.* Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.

LEITZKE, L. N. *et al.* Influência do meio de amoreira-preta e framboeseira. **Ciênc. agrotec.**, v. 34, n. 2, p. 352–360, 2010.

LIMA, A. B. Estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (Barbatimão). **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual Paulista, 53p, 2010.

LIMA, C. S. M. *et al.* Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 669–671, 2007.

LIMA, N. K. *et al.* Plant Growth Regulators in the *in vitro* cultivation of *Acmella oleracea* (L.). **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 2, p. 774, 2020.

LIMA, T. C. D. *et al.* Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de

Stryphnodendron adstringens utilizada na Amazônia . **Revista Fitos**, v. 10, n. 3, p. 329–338, 2016.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 18, n. 1, p. 100–127, jan. 1965.

LJUNG, K. *et al.* Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. **Plant Journal**, v. 28, n. 4, p. 465–474, 2001.

LOPES, A. R. *et al.* Conservação de goiabas com revestimentos comestíveis de amido e caseína com extrato de barbatimão. **Revista Engenharia Na Agricultura - Reveng**, v. 26, n. 4, p. 295–305, 2018.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Plantarum ed. [s.l: s.n.]. v. 03, 2009.

MACÊDO, C. E. C. *et al.* Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 501–504, 2003.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. Application of IBA on *in vitro* and *ex vitro* rooting microcutting of *Lavandula angustifolia* Miller. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 153–161, 2013.

MARTINS, C. C. *et al.* Métodos de superação de dormência de sementes de barbatimão. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 381–385, 2008.

MENDES, P. D. S. *et al.* Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. **Revista Agro@mbiente on-Line**, v. 9, n. 2, p. 202, 2015.

MUDAY, G. K.; HAWORTH P. Tomato root growth, gravitropism, and lateral development: correlation with auxin transport. **Plant Physiol Biochem**. v. 32(2):193-203, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.

NAKKA, S.; DEVENDRA, B. N. a Rapid *In vitro* propagation and estimation of secondary metabolites for *in vivo* and *in vitro* propagated crotalaria species, a *fabaceae* member. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. vol. 10, p. 897–916, 2012.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 69–79, 2007.

NICIOLI, P. M. *et al.* Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 3, p. 685–689, 2008.

NORMAIS CLIMATOLÓGICAS DO BRASIL. *Instituto Nacional de Meteorologia*. Consultado em 21 de maio de 2021.

OCCHIONI, E. M. DE L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 2 suppl 1, p. 153–158, 1990.

OLÁH, R. The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. **Vitis - Journal of Grapevine Research**, v. 56, n. 4, p. 161–171, 2017.

OLIVEIRA, G. S. W. *et al.* Germinação, crescimento inicial e estresse oxidativo em plântulas de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini cultivadas *in vitro* com alumínio. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 43541–43556, 2021.

OLIVEIRA, L. M. *et al.* Estabelecimento *in vitro* e crescimento inicial de *Physallis angulata* (Solanaceae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p1-5, 2013.

OLIVEIRA, L. S. *et al.* Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da reserva biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 17, p. 54–74, 2011.

OLIVEIRA, R. C. **Cultivo *in vitro* e ex vitro de cultivares de manjeriço (*ocimum basilicum* L.)**. [s.l.]. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de Uberlândia, 176p, 2020.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Informe de la Conferencia Internacional sobre Atención Primaria de Salud Ginebra: OMS; 1978**. Disponível em <https://medicinaysociedad.files.wordpress.com/2011/06/declaracion-de-alma-ata.pdf>. Acesso em 20/06/2021.

OSENI, O. M. *et al.* A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 07, p. 3778–3786, 2018.

OVERBEEK, J. V. *et al.* Factors in coconut milk essential for growth and development of very young datura embryos. **Science**, v. 94, n. 2441, p. 350–351, 1941.

PASQUAL, M; BARROS, I. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville). **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 27, n. 7, p. 1017–1019, 1992.

PATRA, B. *et al.* Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 11, p. 1236–1247, 2013.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 3, p. 242–257, 2019.

PIERINE, F. R.; GIANINI, P. F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. *In vitro* germination and

seedling growth of *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) in different culture medium. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 74, n. 4, p. 1–4, 2019.

PINHAL, H. F. **Fitorreguladores no cultivo *in vitro* de gabirobeira (*campomanesia* spp.) e baruzeiro (*dipteryx alata* vog.).** [s.l.]. **Tese (Doutorado)** Universidade Federal de Uberlândia, 64p, 2017.

PINTO, S. *et al.* *Stryphnodendron adstringens*: clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v. 81, n. 12/13, p. 1090–1096, 2015.

PORTO, J. M. P. *et al.* Induction and determination of total phenols of callus of barbatimão. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 8, n. 13, p. 709–713, 2014.

PRETTI, I. R. **Influência da diversidade genética, de fatores ambientais e da fenologia sobre o metabolismo secundário de *tithonia diversifolia* hemsl. (asteraceae).** [s.l.]. **Tese (Doutorado)** Universidade Federal do Espírito Santo, 139p, 2018.

PULIDO-RUEDA, E. E.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A.; NEGRELLE, R. *In vitro* germination and growth of *Vriesea incurvata* Gaudich. (Bromeliaceae). **Acta Agronômica**, v. 67, n. 1, p. 142–147, 2018.

QUEIROZ, I. R. **Produção de mudas de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville] em substrato contendo lodo de esgoto.** [s.l.]. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal de Minas Gerais, 70p, 2014.

RAMAWAT K.G. An introduction to the process of cell, tissue, and organ differentiation, and production of secondary metabolites. In: RAMAWAT K.G. *et al.* **Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites.** Reference Series in Phytochemistry. Springer, p1-22, 2021.

REZALI, N. I. *et al.* The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on *in vitro* growth of *Typhonium flagelliforme*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 151–156, 2017.

RICARDO, L. M. *et al.* Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: the case studies of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) barks and *Copaifera* spp. (copaíba) oleoresin in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. DA. Multiplicação *in vitro* da ameixeira “Santa Rosa”: efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 365–367, 2003.

SABINO, A. P. L. *et al.* *Stryphnodendron adstringens* (“Barbatimão”) leaf fraction: chemical characterization, antioxidant activity, and cytotoxicity towards human breast cancer cell lines. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1375–1389, 2018.

SANTOS, S. C. *et al.* Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 552–556, 2006.

SANTOS, S. C. *et al.* Tannin composition of barbatimao species. **Fitoterapia** v. 73, n. 4, p.

292–299, 2002.

SANTOSO, R. D.; SOBIR, . Pertumbuhan planlet nenas (*Ananas comosus*l. Merr.) Varietas smooth cayenne hasil kultur *in vitro* pada beberapa konsentrasi bap dan umur plantlet. **Buletin Agrohorti**, v. 1, n. 1, p. 54, 2013.

SCALON, V. R. **Revisão Taxonômica do gênero Stryphnodendron Mart. (Leguminosae-Mimosoideae)**. [s.l.]. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, p.262, 2007.

SCHNEIDERS, D. *et al.* Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185–191, 2012.

SHAHZAD A. *et al.* Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. In: ABDIN M., *et al.* **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer, Singapore, p1-36, 2017.

SHOJI, T.; YAMADA, Y.; HASHIMOTO, T. Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 7, p. 831–839, 2000.

SILVA, F. J. *et al.* *In vitro* cultivation of purple basil *Ocimum basilicum* L. “red rubin” at different levels of salts, charcoal, sucrose and potassium iodine. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 9, p. 1137–1145, 2017.

SILVA, S. G. *et al.* Planting and seasonal and circadian evaluation of a thymol-type oil from *Lippia thymoides* Mart. & Schauer. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 113, 12 dez. 2018.

SILVEIRA, D. G. *et al.* Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 923–932, 2009.

SIMAS PEREIRA JUNIOR, L. C. *et al.* The plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville as a neutralizing source against some toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 186, n. August, p. 182–190, 2020.

SKOOG F.; MILLER C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. 1957; 11:118-130, 1957.

SOUSA, C. M.; MIRANDA, R. M. Otimização do balanço entre auxina e citocinina para multiplicação *in vitro* de *Gerbera jamesonni* var. ‘ornela’. **Revista Agronomia**, v. 40, n. 1, p. 66–72, 2006.

SOUZA, J. C. *et al.* Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 269, 29 out. 2018.

SOUZA-MOREIRA, T. M. *et al.* *Stryphnodendron* Species Known as “Barbatimão”: A Comprehensive Report. **Molecules**, v. 23, n. 910, p. 1–25, 2018.

STEWART, F. C. *et al.* Growth and development of totipotent cells: Some problems, procedures, and perspectives. **Annals of Botany**, v. 34, n. 4, p. 761–787, 1970.

SUZUKI, R. M. *et al.* Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 657–666, 2009.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 1–8, 2019.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 618–631, 2008.

TROLEZI, R. *et al.* *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum* : *in vitro* and *in vivo* studies. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 1–7, 2017.

UNEMOTO, L. K. *et al.* Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de (Gesneriaceae). **Acta Sci. Agron**, v. 28, n. 4, p. 503–506, 2006.

VANKOVA, R. *et al.* Effects of synthetic cytokinins on levels of endogenous cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells in suspension. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 10, n. 1, p. 197–199, 1991.

VERNOUX, T. *et al.* Auxin at the shoot apical meristem. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 4, p. 1–15, 2010.

WANG, L. X. *et al.* Cytokinins affect shoot regeneration and modulate the expression of IPT and CKX genes of *in vitro* cultured *Eleocharis dulcis* (Brum.f.) Trin. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 330–337, 2021.

WANG, P. J.; HUANG, L. C. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. **Society for In Vitro Biology**, v. 12, n. 3, p. 260–262, 1976.

XAVIER, R. M. **Variações mensais dos metabólitos secundários de duas espécies de plantas medicinais conhecidas como guaco: mikania glomerata sprenguel e mikania laevigata schultz, ao longo de um ano.** [s.l.]. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Estadual de Campinas, 76p, 2015.

YAZAKI, K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. **FEBS Letters**, v. 580, n. 4, p. 1183–1191, 2006.