

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

OCORRÊNCIA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ampelozizyphus*  
*amazonicus* Ducke. E *Piper peltatum* L. AO LONGO DOS RIOS  
SOLIMÕES E AMAZONAS E ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO *EX*  
*SITU* DE GERMOPLASMA POR TÉCNICAS *IN VITRO*,  
TEMPERATURAS SUB ZERO E CRIOGÊNICAS

ALDECINEI BASTOS SIQUEIRA

MANAUS  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

ALDECINEI BASTOS SIQUEIRA

OCORRÊNCIA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ampelozizyphus*  
*amazonicus* Ducke. E *Piper peltatum* L. AO LONGO DOS RIOS  
SOLIMÕES E AMAZONAS E ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO *EX*  
*SITU* DE GERMOPLASMA POR TÉCNICAS *IN VITRO*,  
TEMPERATURAS SUB ZERO E CRIOGÊNICAS

Tese apresentada ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal  
do Amazonas, como requisito para a  
obtenção do título de Doutora em  
Biotecnologia, área de concentração  
Biotecnologias para a Área  
Agroflorestal.

Orientador: JONNY EVERSON SCHERWINSKI-PEREIRA

Co-Orientador: Prof. Dr. EDUARDO OSSAMU NAGAO

Co-Orientador: Prof. Dra. DORIANE PICANÇO RODRIGUES

Co-Orientador: Prof. Dr. ARI DE FREITAS HIDALGO

MANAUS  
2010

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Siqueira, Aldecinei Bastos

**S6180** Ocorrência de populações naturais de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. E *Piper peltatum* L. ao longo dos rios Solimões e Amazonas e estratégias de conservação *ex situ* de germoplasma por técnicas *in vitro*, temperaturas sub zero e criogênicas / Aldecinei Bastos Siqueira. - Manaus: UFAM, 2010.

123 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao

Co-orientador: Profª. Dra. Doriane Picanço Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Ari de Freitas Hidalgo

1. Caapeba 2. Cerveja-de-índio 3. Saracura-mirá 4. Plantas medicinais I. Scherwinski-Pereira, Jonny Everson II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 633.88(811.3)(043.3)

ALDECINEI BASTOS SIQUEIRA

OCORRÊNCIA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ampelozizyphus*  
*amazonicus* Ducke. E *Piper peltatum* L. AO LONGO DOS RIOS  
SOLIMÕES E AMAZONAS E ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO *EX*  
*SITU* DE GERMOPLASMA POR TÉCNICAS *IN VITRO*,  
TEMPERATURAS SUB ZERO E CRIOGÊNICAS

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologias para a Área Agroflorestal.

Aprovada em 11 de Junho de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Jonny Everson Scherwinski-Pereira (Presidente)  
Embrapa Recursos Genéticos em Biotecnologia

---

Ana Cristina da Silva Pinto  
Fundação Paulo Feitoza/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Eva Maria Cavalcante Atroch  
Universidade Federal Amazonas

---

Ernesto Oliveira Serra Pinto  
Universidade Federal Amazonas

---

Carlos Frederico Nogueira Silva  
Centro de Biotecnologia da Amazônia

Aos meus amados pais Francisco Siqueira (*in memoriam*) e Maria Delza Bastos Siqueira pela vida, e, pelo exemplo de vida.

*In memoriam* ao meu amado pai, que acreditava, torcia, educava, protegia, defendia e que honradamente criou seus filhos, sempre comemorando a conquista individual de cada um.

À minha querida mãe, pelo apoio mesmo nas horas mais difíceis e inexplicáveis, mesmo na distância ou na ausência de compreensão, mesmo estando tão longe, esteve presente nesta fase importante da minha vida.

*In memoriam* à minha mana Maria Auxiliadora, a primeira de sete irmãs a trilhar os caminhos da academia, exemplo e estímulo à minha busca pessoal pelo conhecimento.

*In memoriam* a minha querida tia-madrinha Marta Siqueira Teles, que sempre me incentivou a seguir meus sonhos.

Com amor.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS pelas horas de dificuldade e agonia em que senti sua proteção. A DEUS pela companhia nos momentos de alegria e reflexão.

Aos meus antepassados pela energia contínua na minha existência que me impulsiona a seguir em frente.

À minha mãe por todo amor, orações, bênçãos, carinho e por acreditar sempre que eu sou capaz.

Às minhas irmãs Maria Auxiliadora, Aldenora, Aldecir, Aldecinora, Alzanira, Aldecimar, Amanda e ao meu irmão Amarildo, grandes personalidades, cada qual com suas particularidades, pelos conselhos, risadas, lágrimas, sonhos e realizações que dividem comigo ao longo de nossas vidas.

Ao meu orientador, Jonny Everson Scherwinski-Pereira pela oportunidade, apoio, compreensão e orientação cirúrgica.

Aos co-orientadores Eduardo Ossamu Nagao, Doriane Rodrigues Picanço e Ari de Freitas Hidalgo pelos ensinamentos, incentivo e apoio durante todo o trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas, em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelos ensinamentos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CENARGEN, pela estrutura fornecida, para a realização de parte deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos doutores Spartaco Astolfi Filho e Luiz Antônio de Oliveira pelo crédito, amizade e assistência incondicional.

Ao técnico e amigo Silo da Silva pelo precioso auxílio em campo sem os quais não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Marco Antônio de Freitas Mendonça pela assistência logística durante as coletas na Fazenda da FCA/UFAM.

Ao secretariado do PPGBIOTEC, em especial à Joelma, Elzimar e Nubiane pela dedicação.

À Grace e esposo pelo auxílio, dedicação e carinho com o qual me socorreram no momento mais difícil de minha vida, aos quais não tenho como retribuir.

Aos senhores Oliveira, Cassiano, Rivelino e Rogério e suas famílias por permitirem as coletas das plantas em seus terrenos, sem as quais não poderia realizar este trabalho.

Aos amigos pesquisadores, David Santana, Daniela Koshikeni, Salvador Rojas, Isabel, Francisca, Carlos Frederico, Renilto, Jaqueline Batista, Kyara Formiga, Renata Schmitt e Madalena, pela amizade e incentivo.

A todo o pessoal do Lab. de Cultura de Tecidos Vegetais - UFAM, Dra. Eva Maria Atroch, Sonia Araújo, Tatiana Calderaro pela saudável convivência e apoio, especialmente ao técnico Sr. Valdemir pela amizade, incentivo, auxílio e atenção.

A todo o pessoal do Laboratório de Evolução Aplicada, Karine, Laura, Michelly, Vanessa, Ydrielly, Alessandro, Djair e Gabriel.

À amiga Tatiana Loureiro pelo carinho, incentivo e pela colaboração com os experimentos no EMBRAPA-CENARGEN.

Ao amigo Dr. Edinbergh Caldas pela amizade, carinho, apoio e pelo cafezinho delicioso ao fim da tarde.

Aos meus eternos amigos: Andréa Nogueira, Tatiana Castilho, Dorinha, Márcia Neiva, Andréa Amâncio e Yoann Goska, Ana Cristina e Luis Vilmar, Maria Ducarmo (Duka), Sidney Lins, Andréa Oliveira, Deyla, Mikaela, Danielson, Quesia, Jaqueline e Lena, pois apesar das diferenças de personalidades me apoiaram acompanhando,

opinando, comemorando, rindo ou chorando, mas principalmente praticando o verdadeiro sentido da palavra ‘amizade’.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e CAM, Gilberto Schwertner, Roberto Bussons, Anilton Filho, Rogério Neves, André Silva, Andréa Listik, Elza, Dinah e a todos que convivi durante a realização do doutorado.

À Iza e Marili Noronha, em especial a Alexandre Alves Carlos, amigos disponíveis que me cercaram de incentivo, carinho e orações para que eu pudesse concluir este trabalho.

Aos meus ‘Filhotes’ Raphael Cidade, Janderson Dalazen, Rafael e Marcelo e ‘Filhota’ Valdezangela, pelo entusiasmo, carinho e amizade incondicional.

Ao amigo André Arruda por confeccionar os mapas, pelo apoio e carinho nos momentos difíceis.

Ao casal Rean e Janiffe pelo apoio, carinho, incentivo e amizade na medida e hora exata necessária.

Aos alunos Ana Carolina, Janaína, Maisa, Guilherme, André Belota, Rodrigo Pinheiro, Rodrigo Oliveira, Jackson e Anilton Neto, em especial a Tatiana Marialva, pela assistência na pesquisa, companheirismo e boas risadas.

Aos novos amigos Anderson, Tilde e Rafaela pela amizade, apoio e companheirismo.

A todos os meus amados sobrinhos Igor, Hugo, Janaína, Tainá, Gabriel, William, Watson, Lucas, Samadhy, Isaías, Jonnathan e em especial a Jenniffer e Jade pela assistência e agradável companhia no laboratório.

À família ‘bando de loucos’ Humberto, Vanuza, Douglas e Yusne cuja fiel amizade é notória, por todo carinho, cuidado e apoio incondicional.

Ao amigo Denis Paraguassu que entre uma viagem ou outra, fez da distancia



espaço nulo, se fez presente, por todo o carinho que trouxe mansidão aos dias difíceis, pela companhia agradável, amizade e apoio incondicional.

Ao querido Nicolas Jr. por todo cuidado, carinho, estímulo e companhia que trouxe ânimo e alegria aos dias difíceis, pelas agradáveis horas de refúgio regadas à boa música nas quais eu refletia soluções para os entraves deste trabalho.

Ao amigo China (baterista), pelas batidas ritmadas ao compasso da emoção, pelas poucas palavras que sublinharam a razão, pela sensibilidade às minhas perdas e aos risos quando vitoriosa na realização deste trabalho.

Ao casal Carlão e Nadir pela amizade de longos anos, durante os quais, encontro sempre braços abertos a um abraço sorridente e palavras de incentivo e carinho.

Aos amigos franceses Josephan, Stephan e Rémy e aos amigos da UNIVALI, UNISC, EPAGRI, Ex-alunos da Fundação Mathias Machiline e INPA que embora muito distantes ou muito ocupados dedicam amizade, carinho, apoio e dos quais guardo boas lembranças.

E a todos que de uma maneira ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!!!**

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

***Fernando Pessoa***

## RESUMO

*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae) e *Piper peltatum* L. (Piperaceae) são espécies que possuem características medicinais importantes comprovadas cientificamente, dentre essas a ação contra a malária. Ambas são usadas como medicinais pelas populações da Amazônia, que as obtêm exclusivamente pela prática do extrativismo. As espécies são pouco conhecidas sob o ponto de vista científico e devido ao potencial que estas apresentam, são necessários estudos a respeito de metodologias para a conservação dos recursos genéticos e domesticação destas espécies. Este trabalho teve por objetivo localizar populações naturais de *Ampelozizyphus amazonicus* e *Piper peltatum* ao longo dos rios Solimões e Amazonas, caracterizar por meio de observações nas áreas de coleta e informações de bases de dados as condições ambientais das populações, e desenvolver estratégias para a conservação de germoplasma por técnicas de crescimento mínimo, temperaturas sub zero e criogênicas. Para a conservação *in vitro* utilizaram-se técnicas de conservação *in vitro* por crescimento mínimo. Foi avaliada a manutenção de microestacas de *Piper peltatum* sob diferentes temperaturas (10 °C, 20 °C e 25 °C) e o cultivo em diferentes concentrações dos sais do meio de cultura MS. Microestacas de *Ampelozizyphus amazonicus* e *Piper peltatum* foram submetidas a diferentes concentrações de sacarose, manitol e sorbitol (1%, 2% e 3%). Em outro ensaio microestacas de *Piper peltatum* foram cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose, manitol e sorbitol (1%, 2% e 3%) adicionado ou não de ácido salicílico (AS). Foram realizados ensaios de conservação de sementes de *Piper peltatum*, estas foram submetidas a conservação por temperaturas sub zero (-20 °C) e criogênicas (-196 °C). Para a conservação de sementes sob temperatura sub zero, inicialmente as sementes foram dessecadas por 0h, 24h e 48h e conservadas por 0, 90 e 180 dias, a -20 °C de temperatura. Para a criopreservação, as sementes foram testadas quanto à tolerância a imersão por 24 horas em Nitrogênio líquido (NL) e quanto ao uso ou não de diferentes tipos de crioprotetores. As observações ambientais realizadas e as informações das bases de dados demonstram que a maior parte das áreas de coleta visitadas está sob ação antrópica de desmatamento. A manutenção *in vitro* de microestacas de *Piper peltatum* a 20 °C de temperatura foi a mais eficiente na conservação *in vitro* sob diferentes temperaturas. O uso do manitol para a conservação *in vitro* resultou no aumento das taxas de mortalidade das microestacas de ambas as espécies estudadas. Para a conservação *in vitro* de *P. peltatum* em função da sacarose, manitol e sorbitol e diferentes concentrações de AS, os melhores resultados das culturas sobreviventes são obtidos na ausência de AS. A conservação de sementes de *Piper peltatum* apresentou taxa de germinação satisfatória quando dessecadas por até 48 horas e conservadas por até 180 dias à -20 °C de temperatura. As sementes foram tolerantes à criopreservação independentemente do uso de crioprotetores. Conclui-se que é possível a conservação *in vitro* de *P. peltatum* por até 180 dias pela redução da temperatura de crescimento. A adição de manitol e sorbitol, nas concentrações testadas, são inadequadas para a conservação *in vitro* de microestacas de *A. amazonicus*. O sorbitol pode ser usado na conservação de *P. peltatum* em intervalo de 1% a 2% da concentração adicionado ao meio de cultura de MS. As sementes de *Piper peltatum* são tolerantes à dessecação e à exposição às temperaturas sub zero e criogênicas, sugerindo que se trata de semente do tipo ortodoxa.

**Palavras chave:** Caapeba, cerveja-de-índio, saracura-mirá, plantas medicinais, Amazônia, conservação, recursos genéticos, criopreservação, fisiologia de sementes.

## ABSTRACT

*Piper peltatum* (Piperaceae) and *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae) are species that have important medicinal features proven, for example, the action against malaria. Both are used as medicinal by the Amazonian peoples, and are obtained exclusively by the practice of extraction. These species are not scientifically well-known, and, due to their potential, studies about methodologies for the conservation of genetic resources and the domestication of these species are necessary. The objectives of this study were to locate and characterize, based on field observation and environmental data base, the natural populations of these species along the Amazon River, and developing strategies for conservation of *Ampelozizyphus amazonicus* and *Piper peltatum* germplasm by minimum growth techniques and sub-zero and cryogenic temperatures. For *in vitro* conservation minimum growth techniques were used. The maintenance of *P. peltatum* microshoots was evaluated under different temperatures (10 °C, 20 °C and 25 °C) and different salts concentrations in MS medium. Microshoots of *P. peltatum* and *Ampelozizyphus amazonicus* were subjected to different concentrations of sucrose, mannitol and sorbitol (1%, 2% and 3%). Microshots of *P. peltatum* were also subjected to culture media with different concentrations of sucrose, mannitol and sorbitol (1%, 2% and 3%) with or without salicylic acid (SA). Seeds conservation of *Piper peltatum* were evaluated under sub-zero (-20 °C) and cryogenic (-196 °C) temperatures. For seeds preservation under sub-zero temperatures, the seeds were desiccated for 0h, 24h and 48h and maintained for 0, 90 and 180 days in temperature of -20 °C. For cryopreservation, seeds were immersed in liquid Nitrogen for 24h, and stored with or without other cryoprotectors. Field observation and the data base demonstrate that most of sampling areas visited are under anthropic deforestation. The *In vitro* maintenance of *P. peltatum* microshoots was more efficient in the temperature of 20 °C. The use of mannitol for conservation *in vitro* resulted in high mortality rates of the microshoots of both species. *In vitro* conservation of *P. peltatum* in function of sucrose, mannitol e sorbitol and different concentrations of SA, the best results are obtained in the absence of AS. Germination rates were satisfactory when the seeds of *Piper peltatum* were dried for up to 48 hours and stored for up to 180 days at -20 °C. The seeds were also tolerant to cryopreservation, regardless of the use of cryoprotectants. It is possible the conservation of the species *in vitro* for up to 180 days by reducing the growth temperature. The addition of mannitol and sorbitol, for the concentrations tested, are inadequate for *in vitro* conservation of *A. amazonicus* microshoots. Sorbitol may be used in *P. peltatum* conservation in concentrations between 1% and 2% in MS medium. *Piper peltatum* seeds are tolerant to desiccation and exposure to subzero and cryogenic temperatures, suggesting that *Piper peltatum* seeds are orthodox.

**Key words:** *Caapeba*, *cerveja-de-índio*, *saracura-mirá*, medicinal plants, Amazonia, conservation, genetic resources, cryopreservation, seed physiology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. (A) Plântula em mata de terra firme, área de baixo. Fonte: A. F. Hidalgo, UFAM. Detalhe de ramos com flores; (B) Ramo de saracura-mirá de cor vermelha. Fonte: Flora da Reserva Ducke. (C) Ramo de saracura-mirá de cor branca. Fonte: A. Gentry, Missouri Botanical Garden. Em: <http://www.mobot.org>..... 24
- Figura 2: Planta *Piper peltatum* L. UFAM, Manaus, 2010. .... 29
- Figura 3: Sobrevivência de microestacas de *A. amazonicus* conservadas *in vitro* em meio de Murashige e Skoog (1962) adicionado de diferentes fontes de carboidratos, após 180 dias de cultivo..... 70
- Figura 4: Conservação *in vitro* por 180 dias de microestacas de *Ampelozizyphus amazonicus*, sob diferentes concentrações de sacarose, manitol e sorbitol: A) Aspecto de microestaca de *A. amazonicus* viva, cultivada em meio de cultura contendo 3% de sacarose; B) Microestaca de *A. amazonicus* morta cultivada em meio de cultura contendo 2% de manitol e sorbitol, respectivamente..... 72
- Figura 5: Conservação *in vitro* por 180 dias de microestacas de *P. peltatum*, sob diferentes concentrações de sacarose e sorbitol: A) Aspecto das plantas de *P. peltatum* vivas, cultivada em meio de cultura contendo 3% de sacarose; B) Plantas *P. peltatum* com coloração verde medindo tamanho aproximado de 1,5 cm e 0,9 cm, conservadas em meio de cultura de MS contendo 2% de sorbitol. .... 75
- Figura 6: Percentagem de sobrevivência de microestacas de *P. peltatum* cultivadas em meio de Murashige e Skoog (1962) adicionado de sacarose, manitol ou sorbitol e diferentes concentrações de ácido salicílico após 180 dias de cultivo. .... 77
- Figura 7: Conservação *in vitro* por 180 dias de microestacas de *P. peltatum*, sob diferentes concentrações de ácido salicílico e 2% de sacarose, manitol ou sorbitol: A) Aspecto da planta de *P. peltatum in vitro*, medindo tamanho aproximado de 3,9 cm, cultivada em meio de cultura contendo 3% de sacarose; B) Microestacas de *P. peltatum* mortas, cultivadas em meio de cultura contendo 2% de manitol; C) Microestaca de *P. peltatum* com coloração verde medindo tamanho aproximado de 1,3 cm, conservada em meio de cultura contendo 2% de sorbitol. .... 78
- Figura 8: Conservação *in vitro* por 180 dias de microestacas de *P. peltatum*, sob diferentes temperaturas. A) Sobrevivência (%) de microestacas de *P. peltatum*; B) Altura média (cm) de microestacas de *P. peltatum*; C) Número de gemas formadas em microestacas de *P. peltatum*; Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. .... 80
- Figura 9: Sementes de *P. peltatum* criopreservadas e germinadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contido em placa de petri. .... 85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos com diferentes concentrações de ácido salicílico e reguladores osmóticos adicionados ao meio de cultura. ....	59
Tabela 2: Tratamentos de dessecação e conservação à -20 °C realizados em sementes de <i>P. peltatum</i> .....	61
Tabela 3: Efeito dos reguladores osmóticos na conservação <i>in vitro</i> de microestacas de <i>A. amazonicus</i> , após 180 dias de cultivo. ....	70
Tabela 4: Conservação <i>in vitro</i> de microestacas de <i>P. peltatum</i> utilizando sacarose, manitol e sorbitol, aos 180 dias de cultivo.....	73
Tabela 5: Conservação <i>in vitro</i> de microestacas de <i>P. peltatum</i> em razão da fonte de carboidrato e de diferentes concentrações de ácido salicílico (AS), após 180 dias de cultivo. ....	76
Tabela 6: Efeito de tratamentos de dessecação de sementes e do ambiente de germinação na percentagem de germinação de <i>Piper peltatum</i> .....	82
Tabela 7: Percentagem de germinação de sementes de <i>P. peltatum</i> em diferentes ambientes após tratamentos de dessecação por 0, 24 e 48 horas e tempo de conservação por 0, 90 e 180 dias em temperatura de -20 °C.....	83
Tabela 8: Tolerância de sementes de <i>Piper peltatum</i> a criopreservação em função da época de avaliação da germinação e de tratamentos com substâncias crioprotetoras.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AIA:** Ácido indolilacético

**AIB:** Ácido indol-3-butírico

**BAP:** 6-Benzilaminopurina

**MS:** Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog, 1962

**MS1/2:** Concentrações de sais do meio de MS diluídas pela metade

**NL:** Nitrogênio Líquido

**PVS2:** Solução de vitrificação para plantas

**WPM:** Woody Plant Medium

**AS:** Ácido salicílico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
<b>2.1 A espécie <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke - Rhamnaceae</b> .....	22
2.1.1 Usos na medicina popular e estudos relacionados .....	24
<b>2.2 A espécie <i>Piper peltatum</i> L. - Piperaceae</b> .....	26
2.2.1 Usos na medicina popular e estudos relacionados .....	29
<b>2.3 Características dos ecossistemas amazônicos</b> .....	35
<b>2.4 Conservação de recursos genéticos de plantas</b> .....	38
<b>2.5 Cultura de tecidos vegetais</b> .....	40
2.5.1 Regeneração de plantas via organogênese .....	41
<b>2.6 Técnicas de conservação <i>in vitro</i></b> .....	43
2.7.1 Conservação sob sistemas de crescimento lento .....	44
<b>2.7 Conservação de sementes a longo prazo</b> .....	47
2.7.1 Criopreservação de sementes .....	50
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	54
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	54
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	54
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
<b>4.1 Localização, coleta e caracterização das áreas de quatro populações naturais de <i>A. amazonicus</i> e <i>P. peltatum</i></b> .....	55
<b>4.2 Efeito da sacarose, manitol, sorbitol no crescimento e desenvolvimento das culturas <i>in vitro</i> de <i>A. amazonicus</i> e <i>P. peltatum</i></b> .....	57
<b>4.3 Efeito da sacarose, manitol, sorbitol e do ácido salicílico no crescimento e desenvolvimento das culturas <i>in vitro</i> de <i>P. peltatum</i></b> .....	59
<b>4.4 Conservação <i>in vitro</i> de <i>P. peltatum</i> sob diferentes temperaturas e concentrações de meio de cultura Murashige e Skoog (1962)</b> .....	60
<b>4.5 Conservação <i>ex situ</i> de <i>P. peltatum</i> pelo uso de temperaturas subzero e criogênicas</b> .....	60
4.5.1 Dessecação e conservação à temperatura subzero (-20 °C) de sementes de <i>P. peltatum</i> .....	60
<b>4.6 Conservação <i>ex situ</i> de <i>P. peltatum</i> sob condições criogênicas</b> .....	62
<b>4.7 Análises Estatísticas</b> .....	64
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>5.1 Localização e caracterização das áreas de coleta de quatro populações naturais de <i>A. amazonicus</i> e <i>P. peltatum</i></b> .....	65



5.1.2 Caracterização das áreas de coleta .....	65
<b>5.2 Efeito da sacarose, manitol, sorbitol no crescimento e desenvolvimento das culturas <i>in vitro</i> de <i>A. amazonicus</i> e <i>P. peltatum</i> .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3 Efeito da sacarose, manitol, sorbitol e do ácido salicílico no crescimento e desenvolvimento de culturas <i>in vitro</i> de <i>P. peltatum</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>5.4 Conservação <i>in vitro</i> de <i>P. peltatum</i> sob diferentes temperaturas .....</b>	<b>79</b>
<b>5.5 Conservação <i>ex situ</i> de <i>P. peltatum</i> pelo uso de temperaturas subzero e criogênicas .....</b>	<b>81</b>
5.5.1 Dessecação e conservação à temperatura subzero (-20 °C) de sementes de <i>P. peltatum</i> .....	81
<b>5.6 Conservação <i>ex situ</i> de <i>P. peltatum</i> sob condições criogênicas .....</b>	<b>85</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>91</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>109</b>
<b>Anexo 1:</b> Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Benjamin Constant, Amazonas, Brasil. ....	110
<b>Anexo 2:</b> Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Fonte Boa, Amazonas, Brasil. ....	111
<b>Anexo 3:</b> Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Coari, Amazonas, Brasil. ....	112
<b>Anexo 4:</b> Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Manaus, Amazonas, Brasil. ....	113
<b>Anexo 5:</b> Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Juruti, Pará, Brasil. ....	114
<b>Anexo 6:</b> Localização das áreas de coleta de <i>A. amazonicus</i> no município de Benjamin Constant, AM, Brasil. ....	115
<b>Anexo 7:</b> Localização das áreas de coleta de <i>P. peltatum</i> no município de Benjamin Constant, AM, Brasil. ....	116
<b>Anexo 8:</b> Localização das áreas de coleta de <i>A. amazonicus</i> no município de Fonte Boa, AM, Brasil. ....	117
<b>Anexo 9:</b> Localização das áreas de coleta de <i>P. peltatum</i> no município de Fonte Boa, AM, Brasil. ....	118
<b>Anexo 10:</b> Localização das áreas de coleta de <i>P. peltatum</i> no município de Coari, AM, Brasil. ....	119
<b>Anexo 11:</b> Localização das áreas de coleta de <i>A. amazonicus</i> no município de Manaus, AM, Brasil. ....	120
<b>Anexo 12:</b> Localização das áreas de coleta de <i>P. peltatum</i> no município de Manaus, AM, Brasil. ....	121
<b>Anexo 13:</b> Localização das áreas de coleta de <i>A. amazonicus</i> no município de Juruti,	

PA, Brasil.....	122
<b>Anexo 14:</b> Tabela dos resultados da conservação <i>in vitro</i> de microestacas de <i>P. peltatum</i> sob diferentes temperaturas durante 180 dias. ....	123

# 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais há séculos são a principal fonte de medicamentos da humanidade. Portanto, a descoberta de novas substâncias naturais com atividade terapêutica constitui uma meta da humanidade desde os tempos históricos (Mongelli *et al.*, 1999; Viegas Jr *et al.*, 2006). As plantas medicinais e suas formas derivadas constituíram durante séculos a base da terapêutica (Scheffer, 1992). Aos poucos, com a evolução da química, substituíram-se os compostos naturais por quimioterápicos, que têm um elevado custo até a fabricação em escala e exigem um alto nível tecnológico para sua produção. Contudo, atualmente as plantas medicinais passaram a ser cogitadas como recurso terapêutico viável, devido aos altos preços e à falta de acesso aos quimioterápicos por grande parcela da população (Luz, 2001). No entanto, o extrativismo desenfreado de plantas nativas pode levar à extinção de espécies importantes (Correia Júnior *et al.*, 1994).

Em todo mundo, o impacto do crescimento populacional e dos processos de exploração inadequados levam à destruição das áreas florestadas, principalmente das florestas tropicais (Peixoto *et al.*, 1995). Neste contexto, muitas espécies vegetais com potencial utilização pelo homem estão sob forte pressão antrópica, expostas a erosão genética e reduções drásticas em suas populações naturais, especialmente pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação delas na floresta (Reis, 1996).

Estima-se que o número de espécies vegetais superiores descritas variam de 250 mil a 500 mil e, dessas espécies, cerca de 5% foram estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor estima-se que tenha sido avaliada sob aspectos biológicos. Da diversidade da flora brasileira que é equivalente a 30% das florestas tropicais do planeta estima-se entre 40 a 200 mil espécies, destas em torno de 10 mil são medicinais (Cechinel Filho e Yunes, 1998). O aumento de 60% no número de espécies vegetais

classificadas como criticamente ameaçadas, apenas no período de 1996 a 2004 (IUCN, 2004) é um dado alarmante e mostra a gravidade da situação e a necessidade urgente de medidas conservacionistas adequadas.

A diversidade da flora Amazônica é foco de inúmeras pesquisas na busca de conhecimento sobre plantas de valor sócio-econômico, principalmente em plantas que apresentam propriedade alimentícia, farmacêutica e/ou cosmeceutica. Contudo, são muitas as espécies amazônicas de valor sócio-econômico que ainda não são estudadas. Dentre as espécies medicinais, por exemplo, pouco se sabe sobre a diversidade e distribuição de espécies desta categoria na região Amazônica, e muitas ainda não possuem suas atividades medicinais validadas. Estudos que identifiquem taxonomicamente a espécie medicinal, as áreas de ocorrência e tratam da diversidade e da distribuição de populações naturais de plantas, bem como, os estudos sobre a biologia reprodutiva, e a validação de suas propriedades medicinais são necessários para a conservação dessas espécies. A viabilidade de estudos desta amplitude é baixa pelo grande desafio de se localizar o número de indivíduos a contento com o método de amostragem, de forma a representar a diversidade da região amazônica adequadamente.

Para este estudo foram selecionadas duas espécies medicinais popularmente conhecidas na Amazônia: *Piper peltatum* L. Syn. *Pothomorphe peltata* (L.) Miq.-Piperaceae e *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke - Rhamnaceae. Ambas são usadas como medicinais pelas populações da Amazônia, que as obtêm exclusivamente pela prática do extrativismo. Desta forma, estas importantes espécies da medicina tradicional das populações da Amazônia, correm risco de desaparecer, à medida que estas plantas são obtidas pelo extrativismo não planejado causando diminuição de populações nas áreas de ocorrência. Em *A. amazonicus* o caule e a raiz são as partes visadas. Já no caso de *P. peltatum* toda a planta é comercializada. Assim, a intensidade de coleta e a não

preocupação com a reposição das plantas podem levar ao desaparecimento da espécie naquela localidade ou região.

Existem poucos estudos sobre estas espécies e menos ainda a respeito da conservação *ex situ*. Os estudos existentes, em grande parte, tratam de levantamentos etnobotânicos relacionados à utilização no que diz respeito às indicações de uso, modo de preparo e a parte usada das plantas. Outros estudos limitam-se a caracterização fitoquímica a fim de comprovar os efeitos das plantas e validar as suas aplicações medicinais. Entretanto, esses estudos não incluem dados acerca das áreas de ocorrência de populações naturais destas plantas, uma vez que estas são extraídas sem conhecimento da propagação e aspectos produtivos destas espécies.

Diversos motivos para evitar coleta indiscriminada de plantas medicinais podem ser citados, como a existência de uma grande variabilidade química em material de uma mesma espécie, quando não há constância na sua oferta, podendo ocorrer confusões com trocas de espécies botânicas, e ainda, a qualidade do material pode ser questionada. Há espécies intensamente coletadas que correm o risco de extinção, bem como, as áreas naturais em declínio com a perda de suas características fitofisionômicas, em vias da legislação ambiental não obedecida. Enfim, toda uma situação que justifica o cultivo dessas espécies. No entanto, não é o que ocorre, o extrativismo ainda é a forma mais utilizada para obtenção do material vegetal usado para fins medicamentosos (Ming *et al.*, 2003).

Uma alternativa tecnológica é a utilização de ferramentas da biotecnologia que permitem, por exemplo, obter plantas fáceis de transportar sem preocupações com introdução de novas doenças ou ainda, conservar propágulos para melhoramento ou recuperar espécies em vias de extinção.

Este estudo fornece conhecimento a respeito da conservação *ex situ* destas plantas e contribui para formação de coleções de germoplasma *in vitro*, que poderão principalmente servir de base para estudos de seleção de genótipos de interesse.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A espécie *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke - Rhamnaceae

*Ampelozizyphus* é um gênero monoespecífico, originalmente descrito por Ducke (1935), que o incluiu na tribo Zizyphae. Posteriormente, Suessenguth (1953) *apud* Lima, (2006) considerando a morfologia do fruto, o transferiu para a tribo Rhamnaceae. Mais recentemente, Richardson *et al.* (2000), estudando a filogenia da família Rhamnaceae, com base em seqüenciamento molecular, propuseram a inclusão de uma nova tribo nesta família, a tribo Ampelozizyphae, para melhor posicionar este gênero.

*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, é uma espécie da família Rhamnaceae, por muito tempo considerada a única espécie do gênero *Ampelozizyphus* (Paulino-Filho *et al.*, 1979). Porém estudos morfológicos recentes descreveram a espécie *Ampelozizyphus guaquirensis*, uma nova espécie dentro do gênero que é endêmica da cordilheira da costa venezuelana. As espécies diferenciam-se no tipo de hábito lianoso em *A. amazonicus* e arborescente em *A. guaquirensis*, pela inflorescência pedunculada em *A. amazonicus* e subséssil em *A. guaquirensis*, lobos do cálice no fruto persistentes em *A. amazonicus* e decíduos em *A. guaquirensis*, e a ausência de nectários na base das lâminas foliares em *A. amazonicus* e presença em *A. guaquirensis* (Meier e Berry, 2008).

Além de saracura-mirá, seu nome mais divulgado, esta liana ou arbusto escandente é, também, denominada saracuramuirá, cerveja-do-mato, cerveja-de-índio, cervejeira, cervejinha e curupira-mirá (Santos *et al.* 2005).

*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Figura 1) é uma liana robusta, inerme e sem gavinhas. O caule é cilíndrico, estriado, de cor ferrugínea com lenticelas acastanhadas. As folhas são grandes, com disposição alternada, pecioladas, ovaladas a oblongas, e são coriáceas. A lâmina foliar mede de 10 a 22 cm de comprimento e 6,2 a 11 cm de largura,

sendo a base arredondada ou obtusa, com ápice agudo, margem inteira, revoluta, com face adaxial glabra e abaxial pubérula a glabrescente, possui 3 (a 5) nervuras proeminentes nas duas faces, partindo 0,3 a 0,5 cm da base. O pecíolo 1,3 a 2,5 cm de comprimento é cilíndrico, sulcado ventralmente. As estípulas laterais, precocemente decíduas. Possui inflorescências multifloras, de cor ferrugínea, em tirsos laxos, axilares ou terminais, com raque medindo de 42 a 50 cm comprimento. As brácteas folhosas, medindo 2,7 a 6,3 cm de comprimento e 1,3 a 3,3 cm de largura, com pecíolo 0,4 de 1 cm comprimento, pubérulas. As flores crassas, são monoclinas, de 3 a 4 mm de comprimento com pedicelo de 1 a 2 mm de comprimento e sépalas de 1,1 a 1,5 mm de comprimento e 1,2 a 1,4 mm de largura. As pétalas cerca de 1,5 mm de comprimento, conchiformes, unguiculadas, unhas laminares, longas, de 0,4 a 0,5 mm de comprimento. Os estames cerca de 1 mm de comprimento, possui filetes crassos, achatados. As anteras cerca de 0,3 mm de comprimento. O disco nectarífero é crasso, crenado e glabro. O ovário é semi-ínfero, com três carpelos, três lóculos e três óvulos, um em cada lóculo. Possui 3 estiletos, crassos, curtos, livres apenas no ápice. Os estigmas são obtusos. Os frutos capsulares são obovados, angulosos e glabros. Os frutos imaturos cerca de 2 cm comprimento, pedicelo cerca de 0,5 cm comprimento. Sementes ovaladas, castanhas, brilhantes, com 1,2 a 1,3 de largura com 1 cm de comprimento (Lima, 2006).

O caule de *A. amazonicus* com casca vermelha soltando-se em lâminas, possui um forte cheiro de salicilato de metila. A raiz é depurativa e o pó das folhas é detergente e cáustico (Silva, 1977).





**Figura 1:** *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. (A) Plântula em mata de terra firme, área de baixio. Fonte: A. F. Hidalgo, UFAM. Detalhe de ramos com flores: (B) Ramo de saracura-mirá de cor vermelha. Fonte: Flora da Reserva Ducke. (C) Ramo de saracura-mirá de cor branca. Fonte: A. Gentry, Missouri Botanical Garden. Em: <http://www.mobot.org>

Há poucos estudos sobre dados ecológicos de *A. amazonicus*. Um estudo realizado na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas com plantas jovens coletadas relata que estas se mostraram intolerantes à mudança brusca de ambiente, como de floresta para viveiro. Porém, após a aclimação de mudas coletadas em áreas próximas às matrizes estudadas, as quais foram transplantadas para sacos de polietileno e mantidas no ambiente natural da espécie, apresentaram sobrevivência de 90% (Hidalgo *et al.*, 2005a).

### 2.1.1 Usos na medicina popular e estudos relacionados

A planta é utilizada pela população amazônica no combate a problemas digestivos, diarreia (Rocha e Scarda, 2003) e resfriados, também como depurativo (Ribeiro *et al.*, 1999). É usada como estimulante, energética, “que aumenta a resistência” de uso tradicional entre os índios e caboclos da região do rio Negro e também em outras

áreas da Amazônia, incluindo alguns centros urbanos. O caule e a casca são usados tanto para prevenção da malária quanto para tratar os sintomas da doença (Milliken, 1997; Krettli, *et al.* 2001). De acordo com a população ribeirinha, tem que ser feito diariamente antes do banho, uma colher das raízes secas em um e meio copo de água. A infusão da raiz da planta é chamada “cerveja” por causa da intensa espuma que produz quando as raízes são agitadas na água, esta possui alta quantidade de saponinas, chegando a 10% do extrato aquoso de raízes (Krettli, *et al.* 2001). Desta forma preparada, também é aplicada como um anti-séptico sobre feridas. O infuso de suas raízes é usado popularmente no tratamento contra picada de cobra e na prevenção da malária (Brandão, 1991), também no tratamento de picadas de insetos e como depurativo (Ducke e Vazquez, 1994; Milliken, 1997).

No que se refere aos efeitos causados pelo uso de *A. amazonicus*, em estudo realizado por Meyer (2002) foi observado que o tratamento crônico, durante 5 dias, com o extrato etanólico das raízes de *A. amazonicus*, o aumento do fluxo urinário em ratos mantidos em gaiolas, indicando que esta planta possui substâncias com atividade diurética. Lima *et al.*(2003) investigou o efeito do extrato bruto de “cerveja de índio” sobre a ingestão de água e fluxo urinário em ratos Wistar. Os resultados indicam que o extrato bruto de “cerveja de índio” pode afetar a diurese por algum mecanismo não relacionado à expansão do volume extracelular resultante de um aumento na ingestão de água. Além disso, *A. amazonicus* é popularmente usada para induzir diurese.

Das raízes de *A. amazonicus* já foram isoladas saponinas triterpênicas bem como outros compostos triterpênicos como Lupeol, ácido betulínico, betulina, ácido melaleico e ácido diidroxilup-20(29)-em-28β-oico. Esses últimos cinco compostos também são amplamente distribuídos em outras plantas (Diniz, 2006).

Andrade-Neto *et al.* (2008) mostraram que o extrato das raízes da *A. amazonicus*

é ativo contra os esporozoítas (forma infectante do agente etiológico da malária que são protozoários do gênero *Plasmodium* encontrados nas glândulas salivares do mosquito vetor) do *Plasmodium gallinaceum* e/ou contra os protozoários que se encontram nos estágios iniciais do ciclo de vida parasitário, desenvolvido nas células do parênquima hepático (esquizogonia tecidual). *A. amazonicus* reduziu o parasitismo tecidual em galinhas inoculadas com o protozoário. Estas observações justificam o uso popular das raízes dessa planta na profilaxia da malária.

Outros estudos testaram a atividade antimalárica de *A. amazonicus* sobre esporozoítas isolados de *P. gallinaceum*, este experimentalmente infectado pelo mosquito *A. fluviatilis*. Os esporozoítas isolados foram injetados em frangos anteriormente tratados oralmente com “cerveja de índio” a 200 mL/kg do corpo, durante 5 a 8 dias. Os resultados mostraram que o extrato etanólico reduziu o parasitismo tecidual em 67%, comparável a primaquina (não testada) ou a sulfadiazina matando formas exoeritracíticas (EE) (Ferrari 1997; Carvalho *et al.* 1997).

Lopez *et al.* (2001) verificou que 22 µg/mL do extrato das folhas de *A. amazonicus* apresentou atividade contra HSV-1. Extratos metanólicos e aquosos de folhas de *A. amazonicus* encontradas no Estado do Amazonas, apresentaram efeitos de letalidade sobre larvas de *Artemia franciscana* na concentração teste de 500 µg/mL tendo sido observado que ambos os extratos apresentaram 31% e 11% de letalidade, respectivamente (Quignard *et al.*, 2003).

## **2.2 A espécie *Piper peltatum* L. - Piperaceae**

As espécies pertencentes à família Piperaceae apresentam distribuição pantropical (Joly, 1998; Figueiredo e Sazima, 2000). Nesta família encontram-se plantas de porte arbustivo, herbáceo ou arbóreo de mais de 3 m. O caule é articulado e nodoso,

as folhas são inteiras, dorsiventrais, alternas, raramente opostas ou verticiladas, pecioladas com estípulas (Hutchinson 1973).

As estimativas quanto ao número total de piperáceas variam desde 1.400 (Rorig e Posser, 1991; Moreira *et al.*, 1995) até 2.000 espécies (Tucker, 1972; Evans, 1996). Com referência ao número de gêneros da família Piperaceae, conforme Yuncker (1972; 1973; 1975) a Flora Brasileira abriga 5 gêneros, a saber: *Ottonia* Spreng., *Peperomia* Ruiz e Pav., *Piper* L., *Pothomorphe* Miq. e *Sarcorrhachis* Trel.. Entretanto, atualmente por uma mudança na classificação taxonômica as espécies pertencentes ao gênero *Pothomorphe* Miquel retornaram à anterior classificação no gênero *Piper* Linneu (Wanke *et. al.*, 2007).

*Piper* L. é descrito como arbusto, subarbusto ou arvoreta, com 1-10 m de altura, ocasionalmente escandente. Caule comumente nodoso, com folhas alternadas; lâmina com base freqüentemente assimétrica, glabra ou pilosa, glandulífera, às vezes rugosa ou bulada; pecíolo comumente vaginado-sulcado na base ou até o ápice, formando expansões aladas. Inflorescência em espiga, oposta às folhas. Flores densamente congestas ou laxas; bractéolas glabras ou mais comumente pilosas ou fimbriadas; O número de estames varia entre 2 e 5, sendo o ovário glabro ou com tricomas, geralmente com 3 estigmas, sésseis ou não. O fruto é séssil, de forma variável e pericarpo pouco espessado.

O gênero é amplamente distribuído em regiões tropicais e temperadas de ambos os hemisférios (Ichaso *et al.* 1997, Guimarães e Giordano 2004). Com aproximadamente 1000 espécies distribuídas pantropicalmente, o gênero *Piper* (Soltis *et al.*, 1999) apresenta alta diversidade de espécies em forma de arbustos, ervas, cipós sendo comuns em florestas de várzea úmida. A maior diversidade de espécies de *Piper* ocorre nos trópicos americanos (700 spp.), seguido pelo Sudeste da Ásia (300 spp.), o

local de origem das espécies economicamente importantes *Piper nigrum* L. (pimenta preta) e *P. betle* L. (betel vine). Os padrões de distribuição das espécies de *Piper* variam, desde localmente endêmicas para ampla distribuição. Existem várias espécies restritas a um centro de diversidade específica (por exemplo, Andes, na América Central) e outros ocorrem em toda a região Neotropical ou Paleotropical. *Piper* é muitas vezes um elemento dominante nas florestas tropicais de vegetação secundária. Espécies de *Piper* são de grande importância ecológica e são consideradas "espécies-chave" quanto a sua associação com morcegos frugívoros (Fleming, 1981, 1985; Bizerril e Raw, 1998).

*P. peltatum* L. é uma espécie arbustiva que alcança até 2 m de altura. As folhas são peltadas, com pecíolo entre 9 e 20 cm de comprimento, glabro e com bainha alada. A lâmina foliar é ovado-cordada ou arredondado-cordada, medindo entre 12-25 x 12-25 cm, com base aguda e ápice acuminado, provida de pontos translúcidos, palmatiforme; com 13-15 pares de nervuras. As espigas medem 5-10 cm de comprimento, cada uma apresentando pedúnculo entre 1 e 1,5 cm de comprimento, dispostas em pedúnculo comum, de 4-7 cm de comprimento, glabro. As bractéolas são peltadas e fimbriadas na margem. A drupa possui forma obpiramidal-trigonal (Guimarães e Giordano, 2004) (Figura 2).



**Figura 2:** Planta *Piper peltatum* L. UFAM, Manaus, 2010.

No Brasil as espécies *P. peltatum* L. e *P. umbellatum* L. são conhecidas pelos mesmos nomes populares e, em alguns casos, apresentam o mesmo uso na medicina popular (Pinto, 2002).

Popularmente conhecida na Amazônia como caapeba, caapeba-do-norte, capeba-verdadeira, capeba-branca (Braga, 1953; Van Den Berg, 1993). Em Cuba é conhecida como “caisimon”, em Porto Rico como “basquina”, no México como “mano de zopilote” (Roig e Mesa, 1988) e no Peru é conhecida como “santa maría” (Desmarchelier *et al.*, 1996).

### **2.2.1 Usos na medicina popular e estudos relacionados**

Praticamente todas as partes de *P. peltatum* são empregadas na medicina tradicional, principalmente no preparo de chás, sucos (das folhas e raízes) ou emplasto, usado como antiblenorrágico, diurético, tônico, resolutivo, vermífugo, para combater inflamações internas e externas, lenitivo para machucaduras e queimaduras (Van Den Berg, 1993). As folhas frescas são úteis para as dores hepáticas, quando cozidas e

moídas são emolientes e empregadas como cataplasmas sobre tumores. São importantes ainda no tratamento do herpes e erupções cutâneas; quando maceradas com azeite são aplicadas sobre ventre inflamado (Braga, 1953; Van Den Berg, 1993), as folhas e os amentilhos frescos são diuréticos e anti-gonorréicos; toda a planta fornece suco que é útil nas queimaduras (Correa, 1926; Gonzales *et al*, 1995).

A raiz de *P. peltatum* é estimulante e diurética, útil para as obstruções do fígado (Correa, 1926; Roig y Mesa, 1988; Gonzales *et al*, 1995; Matos, 1997), afecções do baço (Correa, 1926; Gonzales *et al*, 1995; Matos, 1997), anti-gonorréica (Correa, 1926; Gonzales *et al*, 1995), emenagoga, emoliente (Gonzales *et al*, 1995), e encerra um principio ativo aromático, ocre, estimulante do sistema linfático, de efeito benéfico contra a opilação e infarto de vísceras abdominais. Também é usada em forma de emplastos, contra dor de cabeça e de estômago (Correa, 1926).

Nos países da região Amazônica *P. peltatum* é amplamente usada como agente antiinflamatório (De Feo, 1991; Di Stasi, *et al.*, 1994; Desmarchelier *et al.*, 1996); e no tratamento externo de úlceras no local das infecções (Desmarchelier, *et al.*, 1995; Desmarchelier, *et al.*, 1996). Na América Central é empregada como emoliente na inflamação dos testículos e para tumores (Roig e Mesa, 1988).

Apesar de sua importância comercial e medicinal, *Piper* recebeu apenas limitada atenção científica. O gênero tem sido investigado principalmente na Ásia, sendo as espécies de *Piper* de ocorrência na Índia bem analisadas (como *P. nigrum*, *P. longum*, *P. cubeba*, *P. betle* e *P. methysticum*). No novo mundo, apenas algumas espécies de *Piper* têm sido objeto de investigação em profundidade, incluindo o amplamente distribuído *Piper aduncum* L., e também *Piper hispidum* Sw., *Piper auritum* HBK, *Piper peltatum* L., *Piper umbellatum* L., e *Piper amalago* L. Existe pouca informação sobre a fitoquímica e atividade biológica de espécies neotropicais, menos ainda se sabe

sobre a diversidade genética das espécies (Wadt *et al.*, 2004).

Em estudo da análise dos óleos voláteis de espécies da família Piperaceae realizado por Mesquita *et al.* (2005) com combinação das técnicas de Cromatografia de Fase Gasosa (CG) e de Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) foi constatado que a porcentagem de identificação dos constituintes nas análises dos óleos voláteis de *Piper aduncum*, *P. amalago*, *P. vicosanum*, *P. submarginalum* e *P. umbellata* atingiu valores superiores a 80%. Houve predominância de compostos de natureza sesquiterpênica nas composições químicas das espécies analisadas, com exceção de *P. hispidum*, *P. submarginalum* e *P. vicosanum* onde a predominância na composição foi de monoterpenos. Pelos dados apresentados observou-se que, dentre os compostos majoritários, os mais freqüentes, nas nove espécies estudadas, foram  $\beta$ -pineno e espatulenol, seguidos por *E*-cariofileno, oxido de cariofileno, germacreno D,  $\alpha$ -pineno e limoneno. Pela primeira vez se relata a composição dos óleos voláteis de *P. submarginalum* e *P. vicosanum*.

Estudos têm demonstrado que diferentes extratos de folhas de *P. peltatum* exercem *in vitro* significativa atividade antioxidante contra radicais livres (Desmarchelier *et al.*, 1997a; Desmarchelier *et al.*, 1997b). Desmarchelier *et al.*, (2000) verificaram que o extrato de folhas de *P. peltatum* exibe significativa atividade antiinflamatória *in vivo* que sustenta o uso da planta na medicina tradicional de populações do trópico Sul (região Amazônica) e da América Central. Os dímeros de 4-NC (Peltatóis) isolados das folhas dessa mesma planta, mostraram atividade inibitória contra HIV-I (Gustafson *et al.*, 1992) e citotoxicidade contra células tumorais em proliferação (Mongelli *et al.*, 1999).

Alguns estudos verificaram atividade antimalárica de extratos de *P. peltatum in vivo* e *in vitro*. Sala-Neto *et al.* (1992) por meio de uma nova metodologia, avaliaram a



atividade de extratos aquosos das cascas, folhas e raízes de *P. peltatum* quando administrados em ratos, após 30 minutos, estes foram sangrados e os soros foram adicionados a microculturas de *Plasmodium falciparum*, as quais apresentaram 49% de inibição do parasita. Contudo, em estudos *in vivo* para atividade antimalárica de extratos hexânicos e metanólicos realizados por Ferreira-da-Cruz *et al.* (2000), a mesma atividade não foi observada contra uma linhagem de *Plasmodium berghei* por teste *in vivo* em roedores.

Amorim *et al.* (1988) relataram eficácia antimalárica *in vivo* do tratamento oral e subcutâneo com extratos etanólicos de folhas de *P. umbellatum*, embora o extrato de *P. peltatum* não tenha a atividade detectada. Adami *et al.* (1998) relataram atividade antimalárica *in vitro* de extratos hexânicos e metanólicos de folhas de *P. peltatum* e *P. umbellatum* contra três linhagens de *Plasmodium falciparum*, sendo os extratos metanólicos mais ativos na inibição do crescimento do parasita.

Pinto (2002) em estudo fitoquímico e biológico de *P. peltatum* realizou *screening* dos extratos da planta para atividade biológica associada ao estudo fitoquímico do extrato da raiz de *P. peltatum*. Os extratos metanólico e etanólico da raiz apresentaram letalidade para larvas de *Artemia franciscana* e atividade antitumoral na inibição *in vitro* do crescimento de células de tumor de mama humano, de células de tumor de pele e de células de tumor de cólon humano. O extrato clorofórmico apresentou letalidade para larvas de *A. franciscana* e de *Aedes aegypti* em 100% para ambos, na concentração de 500 µg/mL. A fração clorofórmica do extrato etanólico da raiz apresentou letalidade para larvas de *A. franciscana* e *A. aegypti* bem como inibição de células de tumor de mama e de pele, e o extrato aquoso da raiz apresentou inibição do crescimento *in vitro* de formas sanguíneas de *Plasmodium falciparum*. Nos extratos etanólicos e metanólicos, foram detectados fenóis, alcalóides e flavonóides, dentre

outras classes de substâncias. Do extrato etanólico da raiz, o metabólito 4-NC apresentou atividade *in vitro* contra as larvas de *A. franciscana* (CL50  $8 \pm 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), letalidade às larvas de *A. aegypti* (CL50  $26 \pm 3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), inibiu o crescimento de *P. falciparum* (CL50  $9 \pm 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) *in vitro*, e apresentou atividade inibidora (CL50  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) das linhagens de células tumorais (B16, HCT-8 e MCF-7). O diacetil 4-nerolidicatecol mostrou-se letal para as larvas de *A. franciscana* (CL50  $33 \pm 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e não apresentou atividade para as três linhagens de células tumorais (CL50  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Barros *et al.* (2005) verificaram a toxicidade aguda e subcrônica e do extrato etanólico da raiz seca de *P. umbellatum*. O extrato foi administrado por via oral em camundongos Swiss e ratos Wistar adultos e o potencial mutagênico foi avaliado. Os resultados demonstraram que o extrato não é tóxico. Valadares *et al.* (2007) avaliaram a mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato de raiz de *P. umbellatum* e do 4-NC, em células da medula óssea de camundongos utilizando o teste micronúcleo. Camundongos Swiss machos foram tratados por 4 dias com extratos de *P. umbellatum* (50, 100 ou 200 mg/kg/dia) ou 4-NC (50, 25 ou 12,5 mg / kg / dia) antes da exposição com uma única dose (200 mg / kg) de ciclofosfamida, 24 h após o término do tratamento. Os resultados demonstram que *P. umbellatum* e 4-NC não apresentam qualquer efeito mutagênico em células da medula óssea de camundongos, e mais importante, houve um efeito protetor contra a genotoxicidade induzida por ciclofosfamida. Devido à sua capacidade de prevenir danos cromossômicos, com aparente toxicidade e baixo custo, *P. umbellata* ou 4-NC puro abrem um campo de interesse sobre a sua possível utilização em aplicações clínicas.

Em estudo sobre a produção de biomassa e de 4-NC em raízes de *P. peltatum* Pinto *et al.* (2010) avaliaram plantas cultivadas ao longo de um ciclo de vida completo.

As mudas foram produzidas em estufa e em seguida transplantadas. O peso seco das partes da planta foi avaliado em intervalo de 60 dias após o transplante (DAT). Os extratos foram preparados utilizando 1:1 etanol e clorofórmio com auxílio de ultra som. O melhor rendimento de 4-NC por hectare foi obtido pela colheita entre 350 a 400 (DAT), com o rendimento médio de 27 kg /ha de 4-NC. As análises mostram também que no momento da produção máxima de biomassa de raízes aos 470 (DAT), houve uma diminuição na produção de 4-NC (23,8 kg/ha), provavelmente devido ao início da senescência.

Em estudo de semi-síntese de 4-NC realizado por Pinto *et al.* (2009) novos derivados foram testados *in vitro*. Éteres Mono-*O*-Metil, *O,O*-Dibenzil e *O,O*-dibenzoil inibiram o crescimento de linhagens de células tumorais humanas HCT-8 (carcinoma de cólon), SF-295 (sistema nervoso central), LH-60 (leucemia mielóide humana) e MDA/MB-435 (melanoma). Em geral, os derivados *O,O*-dibenzil e *O,O*-dibenzoil foram mais estáveis à luz, ar, pH e à temperatura ambiente que o precursor 4-NC. O estudo forneceu pistas para o desenvolvimento de uma nova classe de antimaláricos com propriedades químicas e farmacológicas maiores.

O estudo da atividade citotóxica contra linhagens celulares de melanoma o 4-NC apresentou atividade citotóxica para todas as linhagens de células de melanoma testadas ( $IC_{50} = 20-40 \mu M$ , 24 h para a linhagem de células tumorais;  $IC_{50} = 50 \mu M$  para linhagem células de fibroblastos) associado a capacidade de induzir apoptose. Além disso, esta é a primeira vez que o 4-NC é descrito como um inibidor de células invasivas, principalmente devido a parada na fase G1 do ciclo celular e inibição da atividade de MMP-2 (matriz de metaloproteinases) em linhagens de células de melanoma (Brohem *et al.* 2009).

## 2.3 Características dos ecossistemas amazônicos

Os ecossistemas amazônicos apresentam as mais diversas características de relevo, solo e grande diversidade de animais, vegetais e microorganismos. A Amazônia possui o equivalente 80% de sua cobertura primordialmente por formações florestais de terra firme e de várzea (ou inundáveis) de acordo com MMA 2007, usando como base para uma classificação primária as características de relevo (Pires e Prance, 1985). Na classificação de vegetação proposta por Veloso *et al.* (1991) e utilizada no RADAMBRASIL, a caracterização do relevo é parte integrante da especificação das formações vegetais, como aluviais, de terras baixas, submontana, montana e outras.

Estudos mostram que a heterogeneidade das condições do solo na Amazônia é freqüentemente ligada à topografia e exerce uma notável influência sobre a composição, a estrutura e os padrões de diversidade da floresta (Lescure e Boulet, 1985; Pelissier *et al.*, 2001). A topografia da Amazônia Central é fortemente correlacionada com a textura do solo (Chaveul, *et al.*, 1987), e estes fatores são os maiores condicionantes da distribuição de espécies vegetais e da estrutura de suas comunidades, em escalas local e regional (Sollins, 1988; Lieberman *et al.*, 1985; Kubota *et al.*, 2004).

A Floresta Ombrófila Densa é dividida em cinco formações: altomontana, montana, submontana, terras baixas e aluvial. Esta formação ocorre em climas tropicais de alta temperatura com média de 25°C e de alta precipitação bem distribuída durante o ano, variando de 0 a 60 dias secos. São mais exuberantes nas áreas de clima tropical chuvoso de floresta (Af), onde não há estação seca, como no domínio da floresta amazônica ocidental ou na mata atlântica de parte do litoral sudeste do Brasil. No entanto, também estão presentes em áreas de influência do clima tropical de monção e de climas temperados chuvosos quentes.

Na Amazônia a Floresta Ombrófila Densa ocupa maior parte da bacia

hidrográfica do rio Amazonas, nos estados do Amazonas, Pará, Acre, Amapá, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, num área estimada de 1.762.700 km<sup>2</sup> (Probio, 2007). Apresenta dossel de 30-40m, com árvores emergentes que podem chegar até 60m, subdossel de 5-20 metros e submata com espécies arbóreas e arbustivas de 2 a 5 metros (Rizzini, 1997). Ressaltam-se em sua flora a andiroba (*Carapa guianensis*), a castanheira (*Bertholettia excelsa*), a sapucaia (*Eschweilera grandiflora*), o mogno (*Swietenia macrophylla*), a seringueira (*Hevea brasiliensis*) a ucuuba (*Virola surinamensis*), a maçaranduba (*Manilkara huberi*), a sumaúma (*Ceiba pentandra*), o freijó (*Cordia goeldiana*), o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), a itaúba (*Mezilarus itauba*), entre outras (Mantovani, 2003).

Inicialmente a denominação Floresta Ombrófila Aberta foi utilizada pelo Projeto RADAMBRASIL para a vegetação de transição entre a floresta amazônica e as áreas extra amazônicas (Veloso, 1992). A principal característica reside no gradiente climático com mais de 60 dias secos por ano, referente ao clima tropical de monção, tipo Am, com 2 a 4 meses de estação seca, e na presença de quatro fisionomias específicas ou fasciões, que alteram a fisionomia da Floresta Ombrófila Densa, com formações de clareiras ocupadas com palmeiras, cipós, bambus ou sororocas. O mapeamento realizado pelo Probio (2007) constatou-se que as áreas dessa floresta ocupam cerca de 884.681 km<sup>2</sup> no domínio da Amazônia e apenas 2.604 km<sup>2</sup> no domínio Mata Atlântica.

A Floresta Ombrófila Aberta Terras Baixas com palmeiras conforme IBGE (1992) é uma formação vegetacional compreendida entre 4° latitude Norte e 16° latitude Sul, em altitudes que variam de 5 até 100 m acima do nível do mar, e segundo Veloso *et al.* (1991) apresenta predominância da faciação com palmeiras. Esta formação é caracterizada por feição mista de palmeiras e árvores latifoliadas, sempre verdes e bem espaçadas, de altura irregular (entre 15 e 25m), com grupamentos de babaçu e patauá,

principalmente nos interflúvios do Terciário. Nos vales de fundo chato, de encharcamento constante ocorre concentração de buriti (*Mauritia flexuosa*), em povoamentos puros (RADAMBRASIL, 1978). A formação de floresta com palmeiras predomina nos terrenos areníticos do Cenozóico e do Terciário de toda a Amazônia. Algumas palmeiras nessa formação indicam sítios arqueológicos e evidenciam o uso intensivo e o manejo da área por sociedades indígenas no passado, é o caso do Inajá (*Maximiliana regia*) do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e do caiaué (*Elaeis olerifera*) (Morán, 1990)

Endêmica da América do Sul a espécie *Ampelozizyphus amazonicus*, segundo Lima (2006) está distribuída na Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, expandindo-se até o Equador. No Brasil, ocorre nos estados do Amazonas, Pará e Roraima, sendo encontrada em florestas de terra firme. Em estudo botânico de Hidalgo *et al.* (2005b) trata-se de um cipó lenhoso que ocorre em área de baixio em florestas de terra firme onde a maior concentração de indivíduos é dentro do raio de alcance da planta matriz. Possivelmente trata-se de espécie bianual cuja dispersão de sementes se dá por gravidade ou pela água. Suas plântulas apresentam ao longo do seu desenvolvimento diferenças morfológicas na folha.

A espécie *P. peltatum* é nativa das regiões neotropicais, sua distribuição abrange a América Central, Antilhas e América do Sul. De acordo com Correa (1926) é originária da Amazônia e no Brasil ocorre nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Ceará e Mato Grosso, e cresce como vegetação secundária em lugares úmidos, com altitudes inferiores a 1400 m, às vezes se encontra como pouco maleável e invasiva (Gonzales *et al.*, 1995).

## 2.4 Conservação de recursos genéticos de plantas

A conservação da biodiversidade constitui um componente essencial para o desenvolvimento sustentável e para a própria manutenção da diversidade genética das espécies com importância sócio-econômica atual e potencial (Ministério do Meio Ambiente, MMA, 2009). As principais ameaças à biodiversidade global são, em primeiro lugar, a perda de habitats (resultante da expansão de terras cultiváveis, cidades e estradas), seguida pela introdução de espécies exóticas. Os habitats podem ser ainda danificados pelas cheias, falta de água, alterações do clima, e outras variações ambientais, quer sejam de causas naturais ou provocadas pela intervenção do homem (Federação Europeia de Biotecnologia, 2001). A perda de biodiversidade pode ser medida pela perda de espécies individuais, grupos de espécies ou pela diminuição do número de organismos. Como resultado, a alta taxa de erosão dos recursos genéticos, aliada a perda de componentes da biodiversidade tem levado vários países a realizarem pesquisas voltadas à conservação dos recursos biológicos de acordo com o MMA.

O termo *conservação* atualmente é usado para designar um conjunto de políticas e programas para o resgate, armazenamento e a disponibilização de recursos genéticos (Hamann, 1985). Conforme definido por Valois *et al.*, (1996) a conservação de recursos genéticos vegetais é o armazenamento e a guarda do germoplasma em condições ideais permitindo a manutenção de sua integridade. E o *germoplasma* é um arquivo vivo da hereditariedade, a qual é transmitida de uma geração para outra através de células reprodutivas.

A conservação se baseia na conservação *in situ* e *ex situ* do germoplasma. Segundo Withers e Williams (1998), a conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural. Já a conservação *ex situ* baseia-se na conservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, através de coleções de

plantas no campo (conservação *in vivo*), em câmaras de conservação (-20 °C ou criopreservação), ou em coleções *in vitro*.

O termo 'Banco de germoplasma' é usado para designar a unidade conservadora de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro, onde não ocorre o descarte de acessos, o que os diferencia das "coleções de trabalho", que são aquelas em que se elimina o que não interessa ao melhoramento genético (Programa Biota, 2010).

A implementação de bancos de germoplasma "ex situ" através de coleções "in vivo" (plantas, sementes) é de grande importância no tocante a pesquisa e preservação da biodiversidade. Através dele podemos conservar e multiplicar genótipos elite (possuidores de princípios ativos em quantidades elevadas, características agronômicas favoráveis como rebrota, resistência a pragas e doenças, biomassa, resistência a stress climáticos) de plantas potenciais em extinção, bem como fornecer material vegetal tanto para pesquisa, como para o melhoramento e cultivo possibilitando a reposição de espécies extintas ou em vias de extinção (Withers e Williams, 1998).

Estudos que contribuam para o conhecimento sobre as áreas de ocorrência, produção, conservação e manutenção de plantas e sementes, viabilizando a implementação de bancos de germoplasma são importantes ante a necessidade de conhecimento prévio sobre as espécies selecionadas, perante fatores como o potencial econômico, alterações nas regiões de ocorrência e a pressão do extrativismo que cercam as espécies medicinais. Esta atividade, embora em fase inicial, vem sendo executada pela Embrapa com algumas espécies do gênero *Piper*, como a *P. hispidinervium* e a *P. aduncum* (Silva, 2010). Até o momento, a única forma de conservação de germoplasma de *P. aduncum* e *P. hispidinervium* é pela conservação de coleções em bancos de germoplasma mantidos em campo (Shorupa e Vieira, 2005).



## 2.5 Cultura de tecidos vegetais

A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratório, a partir das técnicas de cultura de tecidos (George, 1993). Técnicas de cultura de células e tecidos de plantas *in vitro* são potentes ferramentas para a propagação de espécies de interesse econômico uma vez que, além da possibilidade de produção de um grande número de mudas conforme a demanda do mercado, as plantas obtidas estarão livres de bactérias, fungos e vírus (Langhans *et al.*, 1977). Na biotecnologia vegetal, o domínio da cultura de tecidos (ou cultura de células) de plantas *in vitro* teve importância crucial. A cultura *in vitro* compreende a cultura de células, tecidos ou órgãos, em condições assépticas em meios de cultura artificiais (Oliveira, 2000).

A atividade da cultura de tecidos tem na técnica de micropropagação a aplicação mais prática e amplamente empregada. A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* consiste na seleção do explante, isolamento e desinfestação do explante em câmara asséptica, inoculação e cultura em meio nutritivo. Esta técnica pode ser empregada na regeneração de plantas *in vitro* a partir de meristemas, gemas apicais, gemas axilares e segmentos nodais via organogênese direta e, a partir de calos e embriões via embriogênese somática (Grattapaglia e Machado, 1998).

No Brasil, a aplicação comercial da micropropagação é relativamente recente, sendo que em 1998 poucas empresas atuavam na área, haviam poucos laboratórios instalados junto a viveiros, com exceção de algumas poucas empresas que produziam orquídeas e empresas reflorestadoras, as quais realizavam apenas a micropropagação de árvores selecionadas (Grattapaglia e Machado, 1998). Atualmente, a aplicação comercial da micropropagação no Brasil é mais abrangente, principalmente nas áreas de horticultura e fruticultura. São inúmeros os estudos voltados para obtenção de

protocolos de espécies frutíferas, tais como *Musa* sp. (Kodym e Zapata-Arias, 2001), *Citrus* sp. (Moura *et al.*, 2001) e *Ananas* sp. (Barboza *et al.*, 2004).

Em termos gerais, plantas micropropagadas são de qualidade superior, fáceis de transportar para diversos países, sem preocupações com introdução de novas doenças ou ainda, espécies em vias de extinção podem ser recuperadas (Oliveira 2000). As potencialidades das técnicas de cultura de tecidos têm sido abrangentes também na produção de um grande número de plantas medicinais de interesse da indústria de medicamentos. Diversos protocolos de micropropagação foram obtidos para as mais diferentes espécies de plantas medicinais tais como *Zingiber officinale* (Rout e Das, 1997), *Z. spectabile* (Faria e Illg, 1995), *Psoralea corylifolia* (Saxena *et al.*, 1998), *Hypericum perforatum*, *Echinacea angustifolia*, *Piper mesthyticum* (Smith *et al.*, 2002), *Pilocarpus microphyllus* (Saba *et al.*, 2002), *Pfaffia glomerata* (Nicoloso e Erig, 2002), *Egletes viscosa* (Diniz *et al.*, 2003).

Segundo Rout *et al.* (2000) a micropropagação de plantas medicinais tem sido obtida por rápida proliferação de gemas e brotos axilares cultivados. São relatados vários fatores que influenciam o sucesso da propagação *in vitro* de diferentes plantas medicinais e, neste sentido, seria imprudente definir alguma razão particular para o sucesso da micropropagação de plantas medicinais em geral. Os fatores que influenciam a micropropagação de plantas medicinais e aromáticas são bem revisados por Murashige (1977), Hussey (1983), Hu e Wang (1983), Bhagyalakshmi e Singh (1988), e Short e Roberts (1991).

### **2.5.1 Regeneração de plantas via organogênese**

A organogênese direta é a formação de órgãos diretamente dos explantes tais como meristemas, gemas axilares, segmentos de folhas e segmentos nodais. Estes

explantes são isolados, desinfestados e inoculados em meio de cultivo contendo giberelina e/ou citocinina ocasionando a quebra da dominância apical e a multiplicação de partes aéreas. Mas, se a espécie a ser micropropagada apresentar naturalmente uma grande capacidade de formação de folhas e rápido alongamento do caule, podem ser obtidas boas taxas de multiplicação pela simples secção do caule em diversos segmentos nodais, cada um contendo uma gema axilar (Grattapaglia e Machado, 1998).

Nas fases de iniciação e estabelecimento da cultura *in vitro* alguns fatores são importantes, tais como: a seleção da planta-matriz, onde o estado fisiológico tem grande influência no posterior comportamento das culturas; a seleção do explante a ser utilizado, onde deve ser considerado o nível de diferenciação do tecido a ser utilizado e a finalidade da micropropagação, e, a desinfestação cuja dificuldade reside em se obter tecido descontaminado sem levá-lo à morte (Grattapaglia e Machado, 1998).

O isolamento do explante e a inoculação em meio nutritivo são fases importantes já que deve ser realizada em câmara de fluxo laminar. Os explantes devem ser cortados rapidamente e com grande precisão, alguns cuidados devem ser tomados com a relação a desidratação dos tecidos na hora da manipulação. A escolha do meio deve ser de acordo com o tipo e idade do explante a ser inoculado. Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no início do cultivo, dentre estas, o meio de MS (Murashige e Skoog, 1962) e suas modificações têm apresentado bons resultados (Grattapaglia e Machado, 1998).

Nas plantas, os brotos axilares não se desenvolvem por causa do efeito de dominância do meristema apical que limita o crescimento das gemas axilares logo abaixo. Esta dominância é regida pelo balanço de fitohormônios, principalmente a ação das auxinas em pontos distintos da planta. Portanto, na cultura de tecidos, os reguladores de crescimento adicionados ao meio modificam as relações hormonais do

explante, fazendo com que os meristemas adventícios e axilares sejam induzidos (Echeverrigaray *et al.*, 2001).

A diferenciação de órgãos em plantas é regulada pela interação de dois tipos de hormônios, as auxinas e citocininas. Uma relação elevada em favor da citocinina promove, em geral, formação de brotos, enquanto uma relação elevada da auxina favorece a diferenciação de raízes. Contudo, isto não significa que, na multiplicação *in vitro*, seja necessária a adição dos dois reguladores de crescimento, já que a adição de hormônios exógenos depende fundamentalmente dos níveis de hormônios endógenos. Simultaneamente, quando um regulador exógeno é adicionado, a planta responde compensando este aumento pelo incremento da concentração de hormônios endógenos (George, 1993).

Em estudo de propagação vegetativa de *Piper peltatum* L. que avaliou o efeito dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina e 3-ácido indolacético em folhas e microestacas, os resultados mostraram que a adição de BAP ao meio de cultura de MS foi significativa na regeneração de brotos. A morfogênese foi por organogênese direta formando gemas e brotos adventícios de diferentes tamanhos. A adição de AIA ao meio de cultura MS resultou em várias respostas morfogênicas no cultivo de folhas, estas regeneraram, raízes, gemas, e brotos adventícios (Schwertner, 2008).

## **2.6 Técnicas de conservação *in vitro***

A manutenção de coleções *in vitro* tem sido considerada como um método alternativo à conservação de germoplasma, especialmente para espécies propagadas vegetativamente (Roca *et al.*, 1991). Com o objetivo de reduzir ou até suprimir o crescimento das células e tecidos, o processo de preservação *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma no campo, e dentre elas

destacam-se: a necessidade de menor espaço para ocupação do material; manutenção de material vegetal livre de patógenos; disponibilidade de material para ser imediatamente propagado, além da redução dos custos financeiros, entre outros (Dorion *et al.*, 1991).

Entre as técnicas mais utilizadas para reduzir o crescimento *in vitro* e, desta forma, estender o intervalo entre os subcultivos, encontra-se a redução da temperatura de incubação e a aplicação de retardantes osmóticos e hormonais ao meio nutritivo (Conceição *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998; Golmirzaie e Toledo, 1999).

### **2.7.1 Conservação sob sistemas de crescimento lento**

Os sistemas de crescimento lento caracterizam-se pela redução do metabolismo celular retardando o desenvolvimento da planta e aumentando substancialmente o intervalo entre os subcultivos, sem a perda da viabilidade (Whiters e Williams, 1998). Diversas estratégias são usadas na montagem desses sistemas que se baseiam na modificação das condições ambientais, incluindo a redução da temperatura, luminosidade e oxigênio e/ou modificações na constituição do meio de cultura pela adição de reguladores químicos e osmóticos (Whiters e Williams, 1998; Mansur *et al.*, 2009).

A redução da temperatura é amplamente utilizada para o armazenamento *in vitro* em espécies tolerantes ao frio. A planta é armazenada em condições de temperatura que variam de 8 a 20 °C, este procedimento também pode ser associado à redução da luminosidade ou à adição de reguladores osmóticos ao meio de cultura. Entretanto, em espécies tropicais sensíveis a grandes variações de temperatura, o armazenamento abaixo de 15 °C pode provocar alterações no metabolismo das proteínas e na composição e funcionamento das membranas, inviabilizando a recuperação das plantas (Engelmann, 1991).

Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos têm sido animadores, e será possível desenvolver um método adequado de crescimento lento para uma nova espécie que exija menos manipulação (Withers e Williams, 1998).

A baixa temperatura como alternativa para armazenamento *in vitro* de células e órgãos de plantas tem sido aplicada amplamente e com sucesso em kiwi (Monette, 1986), maçã, pêra, ameixa e cereja (Wilkins *et al.*, 1988), uva, morango, batata (Dodds e Roberts, 1993), beterraba, batata-doce, mandioca, várias forrageiras (Souza, 1988), abacaxi (Zee e Munekata, 1992) e brócolis (Kubota *et al.*, 1996).

Outra estratégia de crescimento lento amplamente usada é a adição de reguladores osmóticos na composição do meio de cultura. As substâncias osmorreguladoras mais conhecidas por serem eficazes na cultura de tecidos são: o manitol, o sorbitol e as altas concentrações de sacarose.

O manitol apresenta um efeito retardante no crescimento e desenvolvimento de algumas espécies. Poucos estudos foram realizados com utilização de manitol na conservação de espécies lenhosas. Em estudo de conservação de mangabeira (*Hancornia speciosa*), as microestacas cultivadas em meio de cultura adicionado de manitol (15 a 20 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram menor abscisão foliar e maior abscisão foram observadas em microestacas cultivadas em meio na ausência de manitol. Os resultados indicam a inibição do metabolismo do etileno contribuindo para a manutenção de folhas nas microestacas e, conseqüentemente, sua conservação *in vitro* (Ledo *et al.* 2009).

Estudos de conservação de espécies semi-lenhosas ou herbáceas são mais freqüentes. Moreira (2008) conservou com eficiência sob crescimento lento, plantas de *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, adicionando manitol ao meio de cultura. Igualmente, a conservação *in vitro* de plantas de *Aechmea multiflora* em meio

adicionado de manitol  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  foi eficiente para a conservação por um período de 360 dias (Rocha *et al.*, 2009). Negash *et al.* (2001) obtiveram eficiente conservação de germoplasma de banana sob  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  associada a incorporação de manitol ao meio de cultura por um período de até seis meses. A conservação de *Podophyllum peltatum* também foi possível com a utilização do manitol (Lata *et al.* 2009).

Fortes e Scherwinski-Pereira (2001), verificaram o efeito do manitol, sacarose e do ácido salicílico (AS) na preservação *in vitro* da batata (*Solanum tuberosum* L.), cultivar Macaca. O uso de manitol, associado às concentrações a partir de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de AS, proporcionou menor crescimento e formação de gemas nas hastes. No meio suplementado com sacarose, a sobrevivência e o número de microtubérculos foram maiores, independentemente das concentrações de AS utilizadas, após nove meses de cultivo. Conforme os autores, os cultivos são sujeitos a uma desaceleração no seu crescimento, devido a um estresse osmótico causado pela redução na absorção de água e nutrientes do meio. E quando este carboidrato é combinado a algum inibidor de crescimento, como o ácido salicílico (AS) são obtidos resultados superiores (Bhat e Chandel, 1993; Lopes-Delgado *et al.*, 1998).

Nas duas últimas décadas, o AS tem recebido muita atenção devido à sua participação nos mecanismos de defesa das plantas em resposta aos estresses bióticos e abióticos. Esses mecanismos de defesa incluem o estabelecimento da aquisição de resistência sistêmica (SAR) (Métraux *et al.*, 1990), relacionado à indução de proteínas de resposta à patogenicidade (Malamy *et al.*, 1990), por células com reação de hipersensibilidade que promovem a aquisição da resistência (Horváth *et al.*, 2007). Também foi demonstrado o efeito protetor do AS contra diversos fatores de estresse abióticos, tais como: metais tóxicos (Strobel e Kuc, 1995), estresse térmico (Dat *et al.*, 1998), baixa temperatura (Janda *et al.*, 1999; Mora-Herrera *et al.*, 2005), e aos danos

oxidativos (Strobel e Kuc, 1995; Kusumi *et al.*, 2006).

Sakhanokho e Kelley (2009) a fim de melhorar a regeneração *in vitro* de *Hibiscus*, bem como induzir a tolerância a estresses abióticos nas plantas propagadas, utilizaram o AS adicionado ao meio de cultura. Foram avaliados os efeitos das diferentes concentrações de AS (0, 0,5 e 1 mM) sobre ápices *in vitro* de *H. moscheutos* cv 'Luna Vermelho' e *H. acetosella*, cultivados sob diferentes concentrações de sal (NaCl) (0, 175 e 200 mM). As variáveis monitoradas foram: altura da parte aérea, número de brotos, formação de raízes, comprimento radicular, taxa de sobrevivência das plantas e o acúmulo da prolina. A aplicação exógena de AS a 0,5 mM teve um efeito benéfico sobre todos os parâmetros em ambas as espécies, sob condições salinas e não salina. Os autores verificaram que *H. moscheutos* foi mais tolerante ao sal do que *H. acetosella*, e que o AS pode ser usado para melhorar a regeneração *in vitro* e tolerância ao sal nessas duas espécies. Além disso, a regeneração *in vitro* e sistema de rastreamento de tolerância à salinidade pela dosagem da prolina pode ser incorporado na criação de um programa de triagem inicial rápida, obtendo uma melhor avaliação e eventual desenvolvimento de *Hibiscus* tolerantes ao sal.

A influência do sorbitol na conservação de gemas laterais de maracujazeiro *Passiflora giberti*, foi verificada por Faria *et al.* (2006). O estudo demonstrou que o sorbitol foi eficiente na conservação de germoplasma da espécie quando os materiais propagativos foram cultivadas na presença de 40 g.L<sup>-1</sup> do regulador osmótico, apresentando de maneira geral, menor altura de brotos, número de folhas e número de raízes.

## **2.7 Conservação de sementes a longo prazo**

Para a maioria das espécies de plantas superiores a forma mais comum de



conservação de germoplasma é a partir de sementes (Santos, 2000). Para estes fins é necessário considerar a classificação de Roberts (1973) que relaciona os aspectos da tolerância à dessecação e temperaturas de conservação. Conforme a classificação, sementes ortodoxas são as que apresentam tolerância à dessecação (5 % de umidade) e à conservação em temperaturas subzero (-18 °C) e, podem ser conservadas por longo prazo, quando submetidas a tais condições. São classificadas como sementes recalcitrantes as que apresentam sensibilidade a diminuição do teor de água, estas podem morrer, caso a umidade seja reduzida abaixo do ponto crítico. E geralmente sementes com comportamento recalcitrante também são intolerantes a diminuição da temperatura. Na conservação de germoplasma dessas espécies, outras metodologias são recomendadas, como a conservação em campo, conservação *in vitro* e a criopreservação. Existe ainda a classe de sementes intermediárias, estas podem tolerar desidratação em níveis relativamente baixos de teor de umidade, mas são danificadas por exposição a temperaturas abaixo de zero quando estão secas.

O conhecimento do comportamento fisiológico das sementes considerando a classificação das espécies em ortodoxa, recalcitrante ou intermediária é, portanto, de extrema importância para a definição da estratégia de conservação (Melo; Eira, 1995; Eira *et al.*, 1992).

Para a conservação de uma espécie não ortodoxa é necessário o estudo de metodologias alternativas. As técnicas de conservação *in vitro* e/ou criopreservação são técnicas que podem ser utilizadas com sucesso como alternativas para a conservação a curto, médio e longo prazo, respectivamente, para espécies que não toleram diminuição da umidade e da temperatura de conservação (Villalobos *et al.*, 1991).

Várias outras espécies de plantas necessitam de procedimentos de conservação alternativos. Este é o caso de espécies que se propagam exclusivamente por propagação

vegetativa, devido a algumas características peculiares: a) não produzem sementes viáveis; b) apresentam intensa heterozigiosidade ou elevada segregação, o que pode resultar na expressão de caracteres indesejáveis na população; c) são espécies arbóreas de grande porte que demoram muitos anos para passar do estágio juvenil para o estágio adulto reprodutivo. No caso destas espécies é mais apropriado conservar outro propágulo que não a semente (Santos, 2000).

A viabilidade e a longevidade são outros aspectos determinantes para a conservação de germoplasma a longo prazo os quais, devem ser considerados na conservação de sementes (Silva *et al.* 2007). A viabilidade corresponde à condição em que a semente permanece viva ou viável, mantendo sua integridade fisiológica, bioquímica, biofísica e sua capacidade de germinar e gerar uma planta normal e vigorosa. A longevidade refere-se ao período de tempo durante o qual a semente conserva sua viabilidade em condições ambientais.

De maneira geral, a temperatura de armazenamento e o conteúdo de umidade da semente são os fatores mais relevantes para a manutenção da viabilidade e da longevidade das sementes armazenadas (Silva *et al.*, 2007). Para a conservação do germoplasma a partir de semente por longos períodos, o grau de umidade é reduzido a teores em torno de 3% a 7%, sendo finalmente armazenadas em câmaras com temperatura sub-zero variando entre -18 °C a -20 °C (Wetzel, 2007).

O alto grau de umidade das sementes é uma das principais causas da perda do poder germinativo durante o armazenamento, desta forma a redução do teor de umidade das sementes é fundamental para a conservação a longo prazo. Este procedimento ocasiona a diminuição da taxa respiratória e impossibilita a ação de microorganismos, e conseqüentemente, diminui a velocidade de deterioração (Garcia *et al.*, 2008). Cada espécie tem um ponto ótimo de umidade para armazenamento, possivelmente,

relacionado à composição química dos materiais de reserva. Além do conteúdo de água, a temperatura é outro fator muito importante na preservação da viabilidade das sementes durante o armazenamento. É possível reduzir a atividade das enzimas envolvidas no processo respiratório com a manutenção da baixa temperatura. Portanto a viabilidade das sementes será prolongada, fato que a atividade enzimática é a principal responsável pela perda da viabilidade das sementes durante o armazenamento (Barbedo; Marcos Filho, 1998).

No Brasil as principais espécies conservadas em banco de germoplasma-semente a longo prazo são aquelas utilizadas na alimentação humana. Silva *et al.* (2007) listam a cevada, o feijão, o arroz, a soja, o trigo, o sorgo, e o milho como as principais culturas mantidas nesse tipo de bancos de germoplasma situados no Brasil. A conservação a longo prazo de sementes ornamentais, medicinais e aromáticas ainda é insipiente. Entretanto, são realizados estudos que procuram conhecer as condições de armazenamento adequado para sementes de *Piper aduncum* e *P. hispidinervium* (Silva, 2010).

### **2.7.1 Criopreservação de sementes**

A criopreservação é a conservação de material biológico a temperaturas extremamente baixas, em geral em nitrogênio líquido (-196°C). A esta temperatura, reações metabólicas e deterioração biológica ocorrem muito lentamente ou são completamente suspensas, nestas condições, o material vegetal pode ser conservado por longos períodos de tempo (Engelmann, 2004). Nessas condições, teoricamente, a criopreservação permite conservar materiais biológicos por períodos ilimitados de tempo (Shibli *et al.*, 2006), com a vantagem adicional de requerer pouco espaço físico as culturas são protegidas e contra contaminação microbiana e o trabalho e custos com a

manutenção são mínimos. Withers e Williams (1998) destacam que o único dispêndio necessário durante a criopreservação é o reabastecimento dos tanques com nitrogênio líquido.

Entre as várias partes das plantas que podem ser criopreservadas, incluem-se sementes, grãos de pólen, embriões zigóticos e somáticos, raízes, bulbos tubérculos, gemas, calos, células em suspensão e ápices meristemáticos (Carvalho, 2006; Mansur *et al.* 2009). Entretanto, há a necessidade de adequar protocolos específicos de armazenamento para cada tipo de material vegetativo a ser criopreservado.

A maioria dos explantes apresenta uma grande quantidade de água intracelular, e uma das etapas críticas do processo de criopreservação é a determinação do teor ótimo de água. Conforme Lopes, (2005) teores elevados propiciam a formação de cristais de gelo no interior da célula. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular, com conseqüente morte celular (Santos, 2001). Em contraste teores muito baixos de água intracelular levam à dessecação excessiva, que pode ocasionar morte celular, devido à exposição aos efeitos nocivos da alta concentração de eletrólitos celulares. Segundo Mansur *et al.* (2009) a remoção da água intracelular pode ser induzida pelo congelamento, pela exposição a substâncias altamente concentradas, por dessecação através de corretes de ar ou exposição a sílica gel.

Atualmente são utilizados dois tipos de protocolos para a criopreservação. O método clássico requer o controle da velocidade do congelamento, que ocorre lentamente até a temperatura pré-definida seguido pela imersão em Nitrogênio Líquido (NL). Em contraste, a metodologia contemporânea permite o congelamento rapidamente, através do uso de crioprotetores (Gonzalez-Arno *et al.*, 2008). No protocolo baseado na metodologia clássica, o congelamento é realizado em duas etapas.

Na primeira etapa, a velocidade de congelamento é programada (0,5 - 2,0 °C/min<sup>-1</sup>) para valores próximos de -40 °C, usando um congelador programável. Já na segunda etapa é feita a imersão direta do material em NL (Engelmann, 1997). Dessa forma ocorre uma desidratação induzida por congelamento.

A progressão das etapas do congelamento lento permite a difusão da água do interior da célula supercongelada para o meio extracelular, devido à diferença de pressão de vapor de água, que é maior dentro da célula do que nos espaços intercelulares, onde então, a água é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Dessa maneira a célula desidrata-se, reduzindo os teores de água a um mínimo ou removendo completamente a água, evitando assim a formação de cristais de gelo em seu interior (Molina *et al.*, 2006).

Entretanto durante o congelamento lento deve-se evitar a desidratação celular excessiva, uma vez que, se o congelamento ocorrer rapidamente, a desidratação por congelamento pode não ocorrer. Nesta condição o conteúdo celular continua a se super-resfriar e a água contida no interior da célula congela-se, levando ao aparecimento de cristais de gelo, os quais podem causar injúrias mecânicas às células, principalmente ao sistema de membranas (Engelmann, 1997).

A metodologia de criopreservação usada atualmente é baseada no congelamento passando por um processo chamado de vitrificação. A vitrificação pode ser definida como a transição da água da fase líquida para uma fase amorfa ou vítrea, evitando a formação de cristais de gelo (Fahy *et al.* 1984 *apud* Santos, 2000; Engelmann, 2004; Mansur *et al.* 2009).

De acordo com Santos (2001), a vitrificação do citoplasma pode ser obtida por meio da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não exista água livre para a cristalização, antes de mergulhá-lo em nitrogênio líquido. Desta forma, a solução

celular torna-se muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando uma velocidade de congelamento apropriada é utilizada. Assim, a formação de gelo intracelular durante a exposição a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  é evitada.

No processo de vitrificação a água intracelular é removida colocando-se o material vegetal em contato com substâncias altamente concentradas, denominados de crioprotetores, seguido da imersão direta em nitrogênio líquido (Charoensub *et al.*, 2003). A substância crioprotetora atua como agente capaz de remover a água intracelular, tanto na passagem do estado líquido para o estado vítreo, prevenindo a formação de cristais de gelo, durante o armazenamento em NL (Johari *et al.*, 2009).

A solução de vitrificação para plantas, denominado de PVS2 desenvolvida por Sakai *et al.*, (1990) é o principal crioprotetor utilizado e sua formulação original compõe-se pelo glicerol, etileno glicol, DMSO e sacarose. Embora o uso de crioprotetores tenha efeitos benéficos, o tempo de contato do tecido vegetal com a solução de vitrificação é um ponto crítico para a sobrevivência do material criopreservado, já que estas soluções podem causar toxicidade (Shibli *et al.*, 2006). Contudo o estado vítreo protege a célula do efeito nocivo da perda de água, da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, atribui proteção contra mudanças no pH à medida que a água é removida, e previne de um colapso celular durante extensiva perda de água (Santos, 2000).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Localizar e georeferenciar áreas de ocorrência de populações naturais de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e *Piper peltatum* L. ao longo do Rio Amazonas e avaliar a conservação *ex situ* nos sistemas de cultivo *in vitro* e criopreservação.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Localizar, georeferenciar e avaliar por meio de bases de dados as condições ambientais de populações naturais de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e *Piper peltatum* L. ao longo da bacia dos rios Solimões-Amazonas.

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Sacarose, Sorbitol e Manitol adicionadas ao meio de WPM em cultivos *in vitro* de microestacas de *A. amazonicus* Ducke.

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Sacarose, Sorbitol e Manitol adicionadas ao meio de MS em cultivos *in vitro* de microestacas de *P. peltatum* L.

Avaliar o efeito do Ácido Salicílico em combinação com Sacarose, Sorbitol e Manitol adicionados ao meio de MS na conservação de brotos de *P. peltatum* L. *in vitro*.

Avaliar o efeito de diferentes temperaturas na conservação de microestacas de *P. peltatum* L. inoculadas em meio de MS.

Avaliar a conservação de sementes de *P. peltatum* pelo uso de temperaturas sub-zero e criogênicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Localização, coleta e caracterização das áreas de quatro populações naturais de *A. amazonicus* e *P. peltatum*

A localização de comunidades de espécies vegetais é importante para estudos de genética de populações e seleção de indivíduos, e facilita a coleta das espécies quando necessária a formação de bancos de germoplasma. As coletas dos indivíduos de *A. amazonicus* e *P. peltatum* foram realizadas mediante comprovante de registro de coleta N° 1806192 junto ao SISBIO/IBAMA. Não foram levantados dados de conhecimento tradicional. Nos locais de coleta as plantas foram georeferenciadas usando-se o GPS (Garmin® 60CSx).

Inicialmente foram selecionados cinco municípios com áreas de provável ocorrência de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e *Piper peltatum* L. ao longo da Bacia dos rios Solimões e Amazonas. Os parâmetros para a seleção dos municípios foram: I) a indicação de ocorrência das espécies. II) o distanciamento entre as sedes dos municípios com indicação de ocorrência das espécies. III) a existência de infra-estrutura básica para dar suporte à coleta.

As indicações de ocorrência das espécies foram de observações realizadas em campo pelo Dr. Ari de Freitas Hidalgo, relatos de coletores de plantas medicinais e observações obtidas de parataxônomos.

O distanciamento entre as sedes dos municípios com indicação de ocorrência das espécies foi estipulado de modo a abranger a melhor distribuição ao longo da bacia dos rios, aliado à existência de infra-estrutura básica para dar suporte à coleta. Foram considerados requisitos importantes para seleção das áreas: a existência de um campus universitário para dar suporte acadêmico, o auxílio de parataxônomos experientes para investidas à floresta primária, a cooperação dos proprietários na obtenção da permissão



de coleta em áreas particulares, e a existência de transporte aeroviário próximo para rápido retorno à Manaus.

Ambas as espécies em todas nas áreas de coleta foram diagnosticadas em estado exploratório extrativista sendo usadas como medicinais. *A. amazonicus* foi encontrada como um das espécies compondo as ‘garrafadas’ em feiras municipais. A espécie *P. peltatum* sendo coletada para uso tópico.

Plantas de *A. amazonicus* trazidas da fazenda da FCA/UFAM e hastes de *P. peltatum* trazidas de cada área de coleta foram utilizadas nos experimentos que se seguem. Parte do material botânico coletado foi utilizado na confecção de exsiccatas. Posteriormente, as exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade Federal do Amazonas, com numeração 8289 n° do coletor 653; 8290 n° do coletor 654; 8291 n° do coletor 655; 8292 n° do coletor 656, coletores S.S. Silva e A.B. Siqueira.

Na localização e mapeamento de populações naturais de *A. amazonicus* e de *P. peltatum* as coordenadas geográficas dos indivíduos amostrados foram utilizadas na formulação de mapas. As principais formações vegetais presentes nas áreas de coleta foram descritas, com informações do Projeto RADAMBRASIL (1978) e a partir dos mapas gerados com auxílio do *software* SPRING 5.1.5® e de bases de dados digitais fornecidas pelo SIPAM/SIVAM/INPE (2008) e IBGE (2008). Para cada área de ocorrência foram confeccionados mapas da localização dos indivíduos em relação à área limítrofe dos municípios e os tipos de vegetação.

As áreas de coleta de populações naturais selecionadas de *A. amazonicus* e *P. peltatum* estão localizadas nos municípios citados a seguir.

O município de Benjamin Constant está localizado no estado do Amazonas, na microrregião do Alto Solimões, mesorregião do Sudoeste Amazonense, distante de Manaus a 1.118 km em linha reta e 1.575km via fluvial. Situa-se a 04°21'42" de latitude

sul e a 07°02'04" de longitude a oeste. Possui uma área de 8.793 km<sup>2</sup>. Limita-se com Tabatinga, Atalaia do Norte, São Paulo de Olivença, Ipixuna, Eirunepé, Jutai e com a República do Peru. O clima é tropical chuvoso e úmido, com temperatura máxima de 40° e mínima de 15°. A altitude é de 65 m acima do nível do mar (IBGE, 2008). Sua população estimada em 2009 era de 31.195 habitantes.

Fonte Boa localiza-se a uma latitude 02°30'50" sul e a uma longitude 66°05'30" oeste, estando a uma altitude de 62 metros. Possui uma área de 12.165,19 km<sup>2</sup>. Limita-se com os municípios de: Uarini ao leste; Juruá e Jutai ao sul; Tonantins e Japurá ao oeste; Maraã ao norte (IBGE, 2008). Sua população estimada em 2009 era de 35.752 habitantes.

O município de Coari está localizado a 363 km de Manaus no rio Solimões entre o Lago de Mamiá e o Lago de Coari, a uma latitude 04°05'06" sul e uma longitude 63°08'27" oeste, estando a 40 m de altitude. Faz fronteira com os municípios de Anori, Tapauá, Tefé e Codajás. O município conhecido pela produção de banana, hoje se destaca por produzir petróleo e gás natural, que ocorre em uma região denominada de Urucu (IBGE, 2008). A população estimada em 2009 é de 66.991 habitantes.

O município de Juruti está situado à margem direita do rio Amazonas no Estado do Pará, numa área de 8.342 km<sup>2</sup> a 848 km da capital, Belém. Faz fronteira com os municípios de Oriximiná, Óbidos, Santarém, Aveiro, Faro e Parintins. A sede municipal situa-se a 02°09'08" sul e 56°05'32" oeste, estando a uma altitude de 36 metros. Sua população estimada em 2009 era de 35.530 habitantes (IBGE, 2009).

#### **4.2 Efeito da sacarose, manitol, sorbitol no crescimento e desenvolvimento das culturas *in vitro* de *A. amazonicus* e *P. peltatum***

O estabelecimento dos cultivos *in vitro* de *A. amazonicus* e de *P. peltatum*,

foram conforme protocolos estabelecidos por Silva *et.al.* (2005) e Schwertner *et al.* (2008).

Microestacas de *P. peltatum* foram inoculados em meio de MS adicionado de sacarose a 3% (p/v) e ágar 9 g.L<sup>-1</sup>, e suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de Ácido Indolacético (AIA)

Após tratamento de desinfestação microestacas de *A. amazonicus* foram regenerados em meio WPM (Wood Plant Medium - Loyd e McCown, 1980) suplementado de 3% de sacarose, fungicida Derosal® (1 g.L<sup>-1</sup>), e 15 µg.L<sup>-1</sup> do antibiótico Timentin® (GLAXOSMITHKLINE), acrescido de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP).

Aos 80 dias, após dois subcultivos, as plantas produzidas *in vitro* foram usadas como fonte de explantes para os experimentos de avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de reguladores osmóticos e de crescimento na organogênese das espécies. Microestacas de *A. amazonicus* e de *P. peltatum*, provenientes dos cultivos *in vitro*, contendo uma gema foram inoculadas em meio de MS adicionado de ágar 0,9% e suplementado com sacarose, manitol ou sorbitol em concentrações de 1%, 2% e 3%.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado totalizando nove tratamentos cada tratamento com doze repetições, sendo um tubo de ensaio com uma microestaca por repetição.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, em fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de cerca de 40 µmol.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

### 4.3 Efeito da sacarose, manitol, sorbitol e do ácido salicílico no crescimento e desenvolvimento das culturas *in vitro* de *P. peltatum*

Microestacas de plântulas provenientes dos cultivos *in vitro*, contendo uma gema foram inoculadas em meio de MS adicionado de ágar 0,9%, e suplementado com sacarose, manitol ou sorbitol, e ácido salicílico (AS) conforme tratamentos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Tratamentos com diferentes concentrações de ácido salicílico e reguladores osmóticos adicionados ao meio de cultura.

Carboidratos (2%)	Acido Salicílico (mg.L <sup>-1</sup> )				
	0	30	60	90	120
Sacarose	TA1	TA2	TA3	TA4	TA5
Manitol	TA6	TA7	TA8	TA9	TA10
Sorbitol	TA11	TA12	TA13	TA14	TA15

O pH dos meios foi ajustado para 5,8. Depois de acrescentado o ágar aos meios, estes foram fundidos no microondas e posteriormente distribuídos 10 mL de meio em tubos de ensaio. Os meios foram esterilizados a 120 °C, 1 atm, durante 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, em fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de cerca de 40 μmol.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, com três fontes de carbono (sacarose, manitol e sorbitol) a 2% e ácido salicílico (AS) em cinco concentrações diferentes (0, 30, 60, 90, 120 mg.L<sup>-1</sup>), totalizando quinze tratamentos. Cada tratamento com dezesseis repetições, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio com uma microestaca.

#### **4.4 Conservação *in vitro* de *P. peltatum* sob diferentes temperaturas e concentrações de meio de cultura Murashige e Skoog (1962)**

Para a conservação das microestacas de *P. peltatum* foram testadas duas concentrações do meio de cultura MS completo e MS contendo a metade da concentração dos sais, e a utilização de três temperaturas de conservação: 10 °C, 20 °C e 25 °C.

Nas primeiras duas semanas os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 °C para início de desenvolvimento. Após esse período cada tratamento foi transferido para salas de crescimento com as respectivas condições de temperatura e em fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de cerca de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Aos 180 dias dos experimentos de cultivo *in vitro* avaliaram-se as seguintes variáveis: sobrevivência (%), altura da microestaca (medida em centímetros a partir da base até a última inserção da última gema), número de gemas e folhas formadas.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com dois tipos de meio de cultura e três temperaturas. Cada tratamento foi formado por quinze repetições. Sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio com uma microestaca.

#### **4.5 Conservação *ex situ* de *P. peltatum* pelo uso de temperaturas subzero e criogênicas**

##### **4.5.1 Dessecação e conservação à temperatura subzero (-20 °C) de sementes de *P. peltatum***

Para o ensaio de dessecação e conservação à - 20 °C foram realizados nove tratamentos, em relação ao período de dessecação e ao tempo de conservação, em

interação com duas condições de germinação: caixas gerbox, sob papel germitest umedecido com água destilada, ou em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 30 mL de meio de cultura de MS (*in vitro*).

Para cada um dos tratamentos, as sementes foram divididas em lotes de 180 sementes. Estes lotes contendo 180 sementes foram colocados em criotubos de 1,5 mL de capacidade e estes, em envelopes de alumínio trifoliolados para a conservação durante 0, 90 e 180 dias em câmara de conservação à -20 °C.

Os tratamentos referentes ao período de dessecação e conservação são listados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Tratamentos de dessecação e conservação à -20 °C realizados em sementes de *P. peltatum*.

Não conservadas à -20 °C	
T-1	Não-dessecadas (Testemunha)
T-2	Dessecadas por 24 horas
T-3	Dessecadas por 48 horas
Conservadas por 90 dias à -20 °C	
T-4	Não-dessecadas
T-5	Dessecadas por 24 horas
T-6	Dessecadas por 48 horas
Conservadas por 180 dias à -20 °C	
T-7	Não-dessecadas
T-8	Dessecadas por 24 horas
T-9	Dessecadas por 48 horas

A umidade das sementes de *P. peltatum* para as sementes não-dessecadas (controle) e dessecadas por 24 e 48 horas sob sílica gel foram de 16,5%; 10,8% e 6,9% de umidade, respectivamente.

Após a dessecação e ou conservação, conforme tratamento, as sementes

passaram pelo processo de desinfestação que consistiu em 15 minutos em etanol 70% seguido de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) (50% da solução comercial de 2,0 a 2,5% de cloro ativo), seguida de tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Após a desinfestação, os lotes contendo 180 sementes cada foram divididos em dois sublotos de 90 sementes, onde um lote foi colocado em frascos contendo meio de cultura de MS, e o outro em gerbox sob papel germitest umedecido com água destilada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 9: dois tipos de substrato para a germinação de sementes (*in vitro* e gerbox) e nove tratamentos de dessecação e conservação à -20 °C , totalizando dezoito tratamentos. Cada um dos tratamentos foi colocado para germinar nas duas condições de cultivo, e cada condição de cultivo foi formado por três repetições, cada uma contendo 30 sementes, totalizando 180 sementes (2 condições de cultivo x 3 repetições x 30 sementes).

As avaliações ocorreram aos 20, 30 e 40 dias de cultivo por determinação do número de sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram protrusão da radícula. Para as sementes mantidas em gerbox, a cada dois dias estas foram umedecidas com água destilada com auxílio de pipeta automática.

#### **4.6 Conservação *ex situ* de *P. peltatum* sob condições criogênicas**

Nesse experimento se avaliou a tolerância das sementes de *P. peltatum* a criopreservação sob o efeito de diferentes crioprotetores. Para tanto, as sementes foram divididas em seis sub-lotes de 100 sementes cada, de acordo com o número de tratamentos e então passaram pelo processo de desinfestação, conforme Schwertner *et al.* (2005). Ao fim da desinfestação, cada sub-lote foi colocado em criotubos com capacidade de 1,5 mL. Neste experimento, realizaram-se os seguintes tratamentos: T-1:

sementes não expostas ao NL (Testemunha); T-2: imersão direta em NL; T-3: Uso do crioprotetor PVS2; T-4: Uso da crioprotetor PVS2 resfriado; T-5: Uso do crioprotetor PVS modificado e; T-6: Uso do crioprotetor PVS modificado e resfriado.

Nos tratamentos que se utilizaram crioprotetores, estes foram adicionados ao criotubos para que as sementes ficassem em contato direto com as soluções de PVS. As soluções crioprotetoras (0,5 mL por criotubo) foram adicionadas aos criotubos com o auxílio de uma pipeta automática.

A solução de vitrificação denominada de PVS2 foi composta de 30% de glicerol (v/v), 15% de etileno glicol (v/v), 15% de DMSO (v/v) e 40% de meio de MS (Sakai *et al.*, 1990). A solução de vitrificação PVS2 modificada teve a concentração de etileno glicol alterada de 15% para 30% (v/v), em detrimento da diminuição da concentração do meio de MS, que passou de 40% para 25% (v/v). As soluções resfriadas (T-4 e T-6) ficaram por um período aproximado de 30 minutos em banho de gelo.

Antes da adição das soluções de vitrificação aos criotubos, estas foram esterilizadas com auxílio de filtro Millipore® (0,22 µm).

Após a realização dos tratamentos, os criotubos foram identificados de acordo com os tratamentos e armazenados em envelopes de alumínio trifoliolados, quando então foram imersos em NL durante um período de 24 horas.

Após a criopreservação, as sementes foram expostas à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, visando o descongelamento, e em seguida removeu-se as soluções crioprotetoras daqueles tratamentos em que se utilizaram tais soluções (T-3 ao T-6).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por uma placa contendo 25 sementes.



As sementes foram avaliadas em porcentagem de germinação (%), sendo estas colocadas em placas de petri descartável, contendo 25 mL de meio de cultura de MS e mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas.

A determinação das sementes germinadas foi feita aos 20, 30 e 40 dias de cultivo. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram protrusão de radícula.

#### **4.7 Análises Estatísticas**

Os dados dos ensaios foram submetidos à análise de variância, utilizando o Sistema de Análise Estatística para microcomputadores – SANEST (Zonta; Machado, 1984), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dados expressos em porcentagem (x) foram transformados segundo arco-seno da raiz quadrada de  $x/100$ .

Dados sobre número de gemas ou número de raízes foram transformados segundo raiz de  $x+0,5$ . Os dados sobre altura das plantas não foram transformados.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Localização e caracterização das áreas de coleta de quatro populações naturais de *A. amazonicus* e *P. peltatum***

Conforme os mapas gerados as áreas de coleta foram classificadas como pertencente às formações de Floresta Ombrófila Densa Terras Baixas Dossel Emergente e Floresta Ombrófila Aberta Terras Baixas com Palmeiras.

#### **5.1.2 Caracterização das áreas de coleta**

As formações florestais identificadas nas áreas de coleta foram Floresta Ombrófila Aberta Terras Baixas com palmeiras em Benjamin Constant; Floresta Ombrófila Densa Terras Baixas Dossel Emergente em Fonte Boa, Coari, Manaus e Juruti (Anexos 1, 2, 3 ,4 e 5). Referente a cada uma dessas formações, as espécies foram localizadas em áreas com características fitofisionômicas muito distintas. A espécie *A. amazonicus* foi encontrada na terra firme em áreas de baixio, embora em Fonte Boa indivíduos tenham sido coletados em áreas de terra firme sem características de baixio. A espécie *P. peltatum* foi encontrada em áreas abertas com forte pressão antrópica como beiras de estrada, roçados, capoeiras e quintais de casas.

No que se refere às áreas de ocorrência das espécies, e conforme as exigências ambientais destas, apenas os parâmetros localização e uso do solo/área foram observados. Em Benjamin Constant as áreas de coletas de *A. amazonicus* e *P. peltatum* se encontram em áreas de desmatamento conforme mapas gerados a partir de dados do IBGE (2008) (Anexos 6 e 7 ). As espécies *A. amazonicus* e *P. peltatum* foram coletadas a 115 m e 98 m de altitude, respectivamente.

As observações realizadas indicam que a maioria das áreas onde se encontram *A.*

*amazonicus* é retirada com a exploração de madeira. Embora essas áreas sejam de propriedade particular, em sua maioria pertencente a pessoas físicas, e a exploração madeireira seja de pequeno porte. Em todo caso, o hábito lianoso de *A. amazonicus* deve ser levado em conta, e as plantas matrizes encontradas estão sustentadas por grandes árvores, que tenham ou não valor comercial, podem vir a cair com a derrubada de uma árvore nas proximidades. É provável que a propagação vegetativa de *A. amazonicus* ocorra na fase adulta, principalmente após a ausência da espécie suporte, embora a emissão de raízes em parte do caule tenha sido observado mesmo na presença da planta suporte.

Em relação à propagação por sementes, foi observada regeneração natural com plantas de aproximadamente um ano de idade. As plantas juvenis encontravam-se próximas às matrizes indício de um arranjo espacial agregado, conforme Silva *et al.* (2009) populações com padrão agregado são aquelas nas quais há uma tendência de os indivíduos ocorrerem em grupos, onde a chance de ocorrência de um indivíduo é aumentada pela presença de outros (atração). Ainda outras características que são citadas por Silva *et al.* (2009) que corroboram com a inferência de um padrão espacial agregado para *A. amazonicus* é a dispersão de sementes à curta distância com a chuva de sementes influenciada por água e vento. No presente trabalho, na atividade de localizar os indivíduos nas áreas de coleta, a presença de um indivíduo juvenil de *A. amazonicus* que indicou a existência de um adulto (matriz).

Como fora citado anteriormente *P. peltatum* ocorre principalmente em áreas de grande pressão antrópica. Em Benjamin Constant foi localizada em sua maioria em roçados recentes com plantio de banana, cana-de-açúcar e principalmente mandioca, e em roçados abandonados. Os indivíduos em sua maioria estavam distribuídos de forma agrupada e em alguns casos apresentavam touceiras contendo de 3 a 14 hastes por

indivíduo.

Em Fonte Boa as espécies *A. amazonicus* e *P. peltatum* foram coletadas em 97 m e 72 m de altitude máxima. As áreas de coleta de *A. amazonicus* estão localizadas em áreas de desmatamento conforme o mapa gerado (Anexo 8). É de conhecimento público que região de Fonte Boa assim como vários municípios do estado do Amazonas tem a exploração madeireira como uma das principais atividades comerciais, apesar disso, as áreas de coleta encontrava-se sem fortes indícios de exploração madeireira. Também foi observada regeneração natural com indivíduos jovens, embora não foi possível precisar a idade.

Em Fonte Boa *P. peltatum* foi localizada em capoeiras, beira de estrada e quintais (Anexo 9). Os indivíduos em sua maioria estavam dispersos de forma agrupada e em quando apresentavam touceiras, continham de 3 a 7 hastes por indivíduo.

Em Coari nas áreas visitadas não foi encontrado *A. amazonicus*. Com base em indicações de parataxonômos e ervateiros, tanto na área da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, quanto nas áreas de próximas ao aeroporto, não foi localizado nenhum indivíduo. A espécie *P. peltatum* foi coletada a 51 m de altitude máxima. Os indivíduos foram coletados no campus universitário da Universidade Federal do Amazonas, em alguns trechos de capoeira ao longo da estrada para o aeroporto e principalmente em quintais (Anexo 10). Ressalta-se que apesar de existirem, foi difícil encontrar indivíduos bem estabelecidos, pois por tradição das festividades a cidade mantém a atividade de retirar todo o 'mato' das áreas urbanas e dessa forma possa estar contribuindo com a diminuição da ocorrência da espécie na área de Coari.

Em Manaus *A. amazonicus* e *P. peltatum* foram coletadas 104 m e 102 m de altitude máxima. A área de coleta de *A. amazonicus* pertence a Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias, e é utilizada para estudos e também fornece madeira

para confecção de móveis para a Universidade Federal do Amazonas. Os indivíduos estão localizados em áreas de baixio e se distribuem ao longo de um igarapé (Anexos 11 e 12). Também foi observada regeneração natural com indivíduos jovens de diferentes idades de pelo menos duas frutificações recentes.

Os indivíduos de *P. peltatum* foram coletados em duas áreas na Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias, e no campus da Universidade Federal do Amazonas. Na Fazenda Experimental as plantas foram encontradas nas plantações de laranja e nas áreas de cultivos abandonadas.

Com intuito de coletar *P. peltatum* e *A. amazonicus* foi selecionado o município de Parintins no baixo Amazonas. Entretanto, não foi possível a localização do número de indivíduos necessários de *P. peltatum* na ilha, sendo encontrados apenas três indivíduos em todas as áreas percorridas da ilha. É possível que a mesma tradição das festividades de retirar todo o ‘mato’ das áreas urbanas, como ocorre em Coari, esteja contribuindo com a diminuição da ocorrência da espécie também na área da ilha de Parintins. Também não foi encontrado nenhum indivíduo de *A. amazonicus* na ilha de Parintins.

Com base em informações de ervateiros de Parintins foi selecionada uma comunidade onde se coleta *A. amazonicus* para venda como espécie medicinal. A comunidade localizada no lago Sumaúma, pertence ao município de Juruti no estado do Pará e está a aproximadamente 90 km da ilha de Parintins. Entretanto, nessa área de coleta foi em uma área particular. Indivíduos de *A. amazonicus* foram coletados a 38 m de altitude máxima, em área de baixio ao longo de um igarapé, e estavam distribuídos em agrupamentos muito densos com plantas matrizes e um grande número de juvenis muito próximos de diferentes idades e alturas de plantas. Na área não há indícios de extração de madeira e conforme informação do proprietário a área é usada apenas para

caça de subsistência (Anexo 13). Também foi observada regeneração natural com indivíduos jovens de diferentes idades de pelo menos duas frutificações recentes. Ressalta-se que essa área se difere das outras pelo número de indivíduos adultos e regenerantes encontrados em uma mesma área.

## **5.2 Efeito da sacarose, manitol, sorbitol no crescimento e desenvolvimento das culturas *in vitro* de *A. amazonicus* e *P. peltatum***

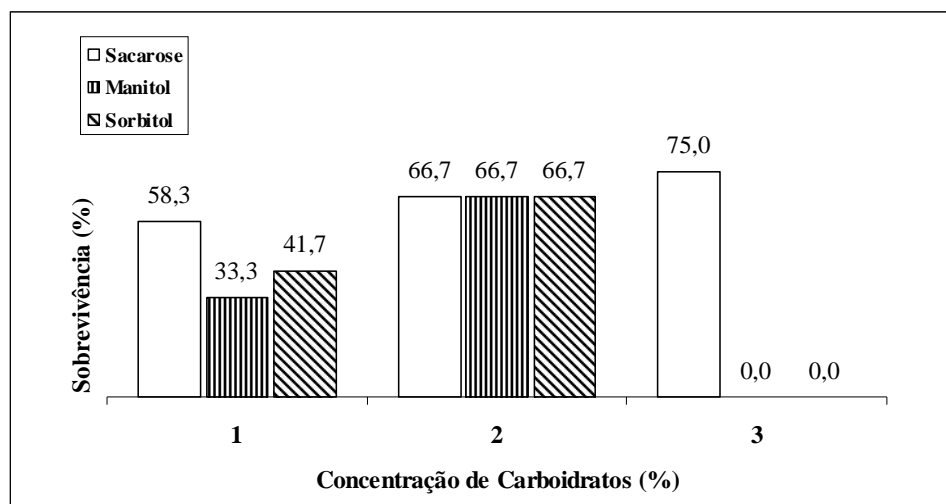
O uso de diferentes fontes de carboidratos na conservação *in vitro* de *A. amazonicus* influenciou a altura das microestacas, com resultados significativamente diferentes para o uso da sacarose a 1%, 2% e 3% em relação às mesmas concentrações de manitol e sorbitol. As microestacas apresentaram 0,9, 1,0 e 1,2 cm de altura média respectivamente (Tabela 3). Entre os tratamentos adicionados com manitol a altura das microestacas não variou significativamente. E esses resultados foram comparáveis aos resultados observados dos tratamentos adicionados de sorbitol a 1% e 2%.

Em relação ao número de gemas produzidas os resultados não apresentaram diferenças significativas. Porém, observou-se que as maiores concentrações dos carboidratos (2% e 3%) adicionados ao meio de cultura proporcionaram maior número de gemas em explantes de *A. amazonicus*, independentemente do tipo de carboidrato adicionado (Tabela 3). Entretanto, a adição do manitol e do sorbitol causou danos às culturas diminuindo a sobrevivência das microestacas, principalmente nas concentrações de 1% e 3% dos carboidratos (Figura 3).

**Tabela 3:** Efeito dos reguladores osmóticos na conservação *in vitro* de microestacas de *A. amazonicus*, após 180 dias de cultivo.

Carboidratos	Altura (cm)				Número de gemas				Número de folhas			
	Concentração			Média	Concentração			Média	Concentração			Média
	1%	2%	3%		1%	2%	3%		1%	2%	3%	
<b>Sacarose</b>	0,9aC	1,0aB	1,2aA	1,1 <sup>a</sup>	1,0	1,4	1,7	1,4a	2,4aB	3,2aB	4,5aA	3,3a
<b>Manitol</b>	0,8bA	0,8bA	0,7bA	0,8b	1,0	1,2	1,3	1,2a	2,6aA	2,5aA	2,7bA	2,6b
<b>Sorbitol</b>	0,8bAB	0,9bA	0,8bB	0,8b	1,0	1,2	1,2	1,1a	2,5aA	2,6aA	2,5bA	2,5b
<b>Médias para Concentração</b>	0,8B	0,9A	0,9A		1,0B	1,3A	1,4A		2,5B	2,8AB	3,2A	
<b>CV (%)</b>	3,8				11,9				12,2			
<i>F</i> (A: Carboidratos)	87,88 <sup>**</sup>				3,03 <sup>NS</sup>				10,99 <sup>**</sup>			
<i>F</i> (B: Concentração)	5,12 <sup>**</sup>				9,48 <sup>**</sup>				6,72 <sup>**</sup>			
<i>F</i> (A x B):	13,04 <sup>**</sup>				0,98 <sup>NS</sup>				5,30 <sup>**</sup>			

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúscula na vertical (entre as concentrações de cada carboidrato) e maiúsculas na horizontal (entre os carboidratos em cada concentração), diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. <sup>NS</sup> Não-significativo; <sup>\*</sup>Significativo ( $p < 0,05$ ) e <sup>\*\*</sup>Significativo ( $p < 0,01$ ). CV = coeficiente de variação.



**Figura 3:** Sobrevivência de microestacas de *A. amazonicus* conservadas *in vitro* em meio de Murashige e Skoog (1962) adicionado de diferentes fontes de carboidratos, após 180 dias de cultivo.

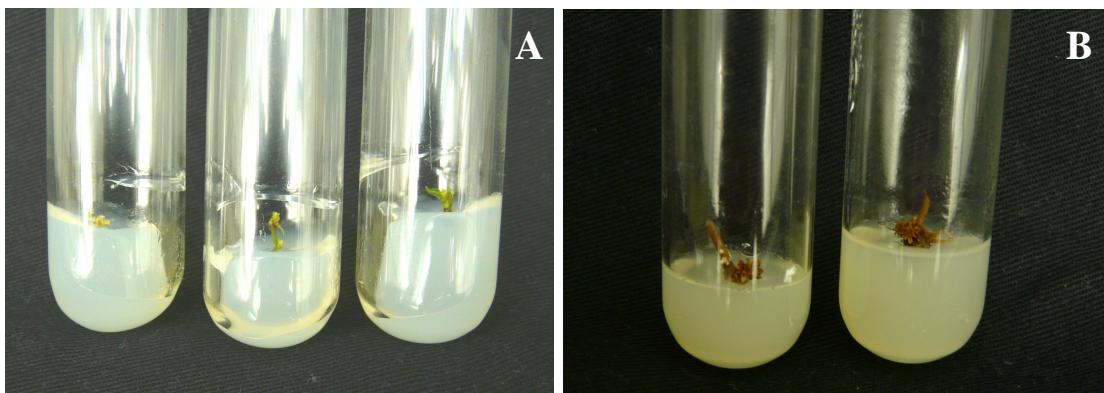
Apesar das taxas de sobrevivência dos explantes à adição de 2% de manitol e sorbitol serem aceitáveis se comparados aos resultados obtidos com o uso da sacarose, os resultados demonstram que o uso de manitol e sorbitol, nas concentrações testadas, são inadequados para a conservação *in vitro* de microestacas de *A. amazonicus*. Durante todo o ensaio as microestacas apresentaram baixo crescimento e desenvolvimento, após 120 dias apresentaram oxidação no ápice e base das estacas sobreviventes, e muitas destas estacas morreram após o término do experimento. Lemos e Baker (1998) relataram efeitos nocivos do manitol em microestacas de *Annona muricata* cultivados *in vitro*. Da mesma forma, Alves (2008) em estudo de conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng) relata que os tratamentos formados pelo uso de manitol, apesar de favorecerem a obtenção de plantas com menor altura da parte aérea e o menor número de brotos por explante, foi também responsável pela maior percentagem de plantas não desenvolvidas, tendo efeito prejudicial às plantas mantidas em tais condições.

Fortes e Scherwinsk-Pereira (2001), avaliando o efeito da sacarose e do manitol (87,6 mM) na conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.), relatam que o uso de manitol causou a formação de um número significativamente inferior de gemas nas brotações de batata, em comparação à sacarose, com redução do crescimento das hastes. Entretanto, somente cerca de 37% dos explantes provenientes destes meios sobreviveram no período avaliado. Segundo os autores, as hastes de batata em presença de manitol sofrem maior estresse fisiológico que as crescidas em meio com sacarose, devido principalmente, ao estresse osmótico provocado por esse carboidrato, que reduz a absorção de água e nutrientes pelo explante.

Assim, mediante os resultados apresentados no ensaio, as fontes de carbono manitol e sorbitol utilizadas na conservação influenciaram na capacidade responsiva da cultura de *A. amazonicus* inviabilizando-a quando submetida às maiores concentrações



desses carboidratos. As maiores concentrações de sacarose possibilitaram uma melhor intensidade de resposta, sendo a concentração de 3% de sacarose a mais eficiente na conservação *in vitro* de *A. amazonicus*. Possivelmente, o crescimento lento característico da espécie quando em ambiente natural não seja modificado pelas concentrações de carboidratos testadas, respondendo da mesma forma quando cultivada com sacarose em condições *in vitro*. E a resposta negativa da conservação *in vitro* aumenta quando submetidas ao aumento do estresse osmótico causado pela adição de manitol e sorbitol a 3% de concentração, causando desnutrição e morte da cultura (Figura 4).



**Figura 4:** Conservação *in vitro* por 180 dias de microestacas de *Ampelozyziphus amazonicus*, sob diferentes concentrações de sacarose, manitol e sorbitol: A) Aspecto de microestaca de *A. amazonicus* viva, cultivada em meio de cultura contendo 3% de sacarose; B) Microestaca de *A. amazonicus* morta cultivada em meio de cultura contendo 2% de manitol e sorbitol, respectivamente.

No experimento dos efeitos de diferentes fontes de carboidratos na conservação *in vitro* de microestacas de *P. peltatum* a sacarose promoveu um maior número de gemas em todas as concentrações testadas quando comparado com o manitol e o sorbitol. Assim, o número médio de gemas produzidas foi de 6,62; 8,1 e 9,2 a 1%, 2% e 3% de sacarose adicionada ao meio de cultura, respectivamente. Também foi possível observar que a sacarose promoveu a maior altura nas estacas cultivadas a 1%, 2% e 3%

correspondendo a 2,0; 2,3 e 3,7cm de altura, respectivamente.

O uso do manitol inibiu o crescimento das microestacas, contudo, apesar de propiciar um menor tamanho e número de gemas, promoveu aumento da taxa de mortalidade das microestacas e adicionalmente em 41,66% das estacas sobreviventes causou efeito de desnutrição, com folhas de coloração verde-amarelada à amarelada, sinais característicos de carência e redistribuição de nutrientes. As percentagens de morte das estacas foram de 8,3%, 50,0% e 58,3% nos tratamentos com meio de MS adicionados com 1%, 2% e 3% de Manitol, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4:** Conservação *in vitro* de microestacas de *P. peltatum* utilizando sacarose, manitol e sorbitol, aos 180 dias de cultivo.

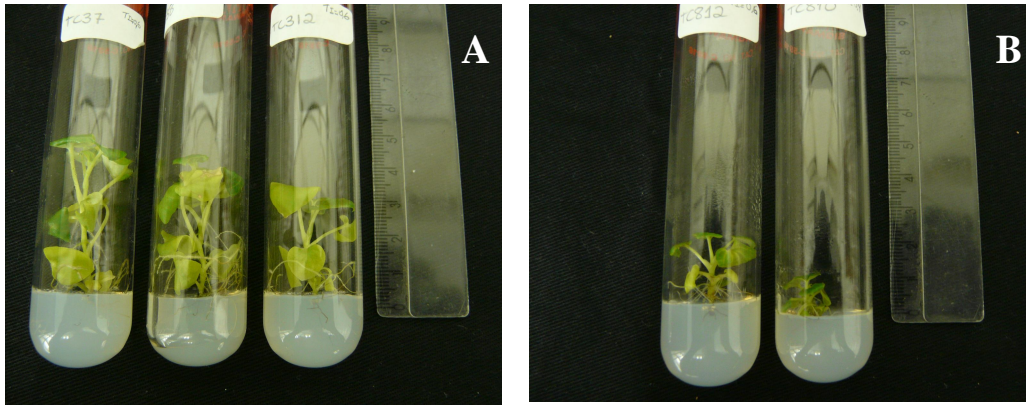
Carboidratos	Altura (cm)			Média	Número de gemas			Média	Número de folhas			Média
	Concentração				Concentração				Concentração			
	1%	2%	3%		1%	2%	3%		1%	2%	3%	
<b>Sacarose</b>	2,0aB	2,3aB	3,7aA	2,6a	6,6aB	8,aAB	9,2aA	7,9a	8,5aA	8,9aA	11,5aA	9,6a
<b>Manitol</b>	1,1bA	1,1bA	0,9bA	1,0b	2,9bA	1,6cA	1,6bA	2,0c	7,7aA	2,5bB	3,4Bb	4,3b
<b>Sorbitol</b>	1,2bA	0,7bA	0,8bA	0,9b	2,7cAB	3,9bA	2,2bB	2,9b	4,4bA	5,9aA	5,2bA	5,1b
<b>Médias para Concentração</b>	1,4A	1,3A	1,6A		3,9A	4,2A	3,8A		6,7A	5,4A	6,3A	
<b>CV (%)</b>	13,6				20,0				25,2			
<i>F</i> (A: Carboidratos)	106,38**				98,92**				23,75**			
<i>F</i> (B: Concentração)	2,85 <sup>NS</sup>				0,44 <sup>NS</sup>				1,4 <sup>NS</sup>			
<i>F</i> (A x B):	9,84**				4,96**				5,59**			

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúscula na vertical (entre as concentrações de cada carboidrato) e maiúsculas na horizontal (entre os carboidratos em cada concentração), diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. <sup>NS</sup> Não-significativo; \*Significativo (p<0,05) e \*\*Significativo (p<0,01).

Estas respostas estão de acordo com os resultados para o uso do manitol na conservação *in vitro* de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervium* C.DC. realizado por

Silva (2010). A autora atribui a alta mortalidade ao uso do manitol e sugere que as concentrações testadas (1%, 2% e 3%) são prejudiciais para a conservação das espécies estudadas. Desta forma é possível que haja uma resposta análoga ao uso do manitol na conservação *in vitro* de espécies pertencentes ao gênero *Piper* ou que as concentrações testadas não são adequadas.

Os resultados para o uso de sorbitol na conservação *in vitro* de *P. peltatum* apresentaram uma tendência de resistência ao aumento das condições osmóticas promovidas por esse carboidrato. Igualmente ao que ocorreu com o uso do manitol, microestacas cultivadas na presença de sorbitol apresentaram menor altura e menor número de brotos se comparado aos resultados obtidos com o uso da sacarose. Contudo, diferente dos resultados do uso de meio de cultura com manitol, o índice de sobrevivência das microestacas cultivadas em meio de cultura com sorbitol foi superior, proporcionando coloração verde e aspecto normal em todas as estacas sobreviventes (Figura 5). As percentagens de morte de microestacas para o uso do sorbitol adicionado ao meio de MS foram de 24,3% e 8,3%, que correspondem aos tratamentos contendo 1% e 3% do regulador osmótico. No estudo de Bertoni *et al.* (2007) o sorbitol promoveu maior índice de sobrevivência das plântulas de *Zeyheria montana* quando comparado ao meio de cultura contendo manitol. Também para a cultura de *Prunus cerasus* L., os açúcares sacarose, glicose, frutose e sorbitol favoreceram o crescimento quando as suas concentrações estavam entre 20 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup> (Borkowska; Szczerba, 1991 *apud* Faria *et al.* 2006). Possivelmente os melhores resultados do uso do sorbitol frente ao manitol na conservação de microestacas de *P. peltatum* esteja relacionada a baixa toxicidade do primeiro.



**Figura 5:** Conservação *in vitro* por 180 dias de microestacas de *P. peltatum*, sob diferentes concentrações de sacarose e sorbitol: A) Aspecto das plantas de *P. peltatum* vivas, cultivada em meio de cultura contendo 3% de sacarose; B) Plantas *P. peltatum* com coloração verde medindo tamanho aproximado de 1,5 cm e 0,9 cm, conservadas em meio de cultura de MS contendo 2% de sorbitol.

Em trabalhos com outras espécies de plantas o uso do sorbitol também foi efetivo em favorecer a manutenção da qualidade do cultivo e diminuir o crescimento. Com relação à qualidade da microplanta, medida pela coloração das folhas, Faria *et al.* (2006) verificaram que na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. na ausência de sacarose, não houve efeito das diferentes concentrações de sorbitol. Contudo, nas concentrações de 15 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, as microplantas apresentaram melhor vigor quando supridas com 10 e 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol. Os autores constataram ser possível conservar sob crescimento lento, por quatro meses, microplantas de maracujazeiro em meio de cultura de MS suplementado com 10 ou 20 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol, na ausência de sacarose. Santana (2003) utilizando como fonte de carbono sacarose glicose, frutose, galactose, maltose e sorbitol no cultivo *in vitro* de Anonáceas, evidenciou que as menores taxas de desenvolvimento das microplantas ocorreram no tratamento com sorbitol.

Os resultados apresentados sugerem que o sorbitol pode ser usado na conservação de *P. peltatum* no intervalo de 1% a 2% de concentração, adicionado ao meio de cultura de MS.

### 5.3 Efeito da sacarose, manitol, sorbitol e do ácido salicílico no crescimento e desenvolvimento de culturas *in vitro* de *P. peltatum*

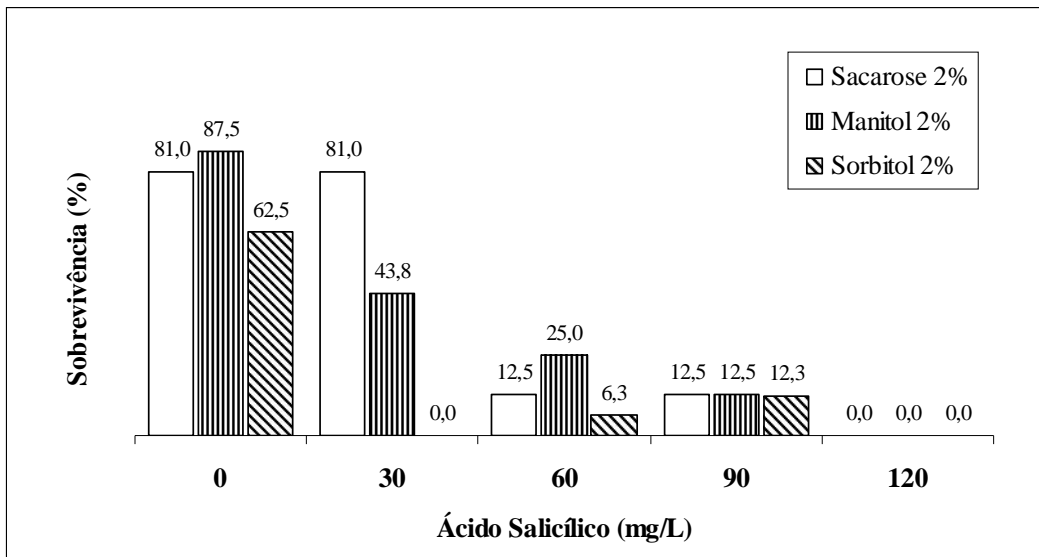
Os efeitos da manutenção de *P. peltatum* em meio com diferentes fontes de carboidratos e diferentes concentrações de ácido salicílico (AS) influenciaram significativamente a altura média e número de gemas formadas em microestacas conservadas por 180 dias (Tabela 5).

Em relação à sobrevivência das estacas de *P. peltatum* cultivadas, de maneira geral, os melhores resultados foram obtidos na ausência do AS. As percentagens de sobrevivência das plantas em meio de MS contendo sacarose, manitol e sorbitol foram de 81%, 87,5%, e 62,5%, respectivamente (Figura 6).

**Tabela 5:** Conservação *in vitro* de microestacas de *P. peltatum* em razão da fonte de carboidrato e de diferentes concentrações de ácido salicílico (AS), após 180 dias de cultivo.

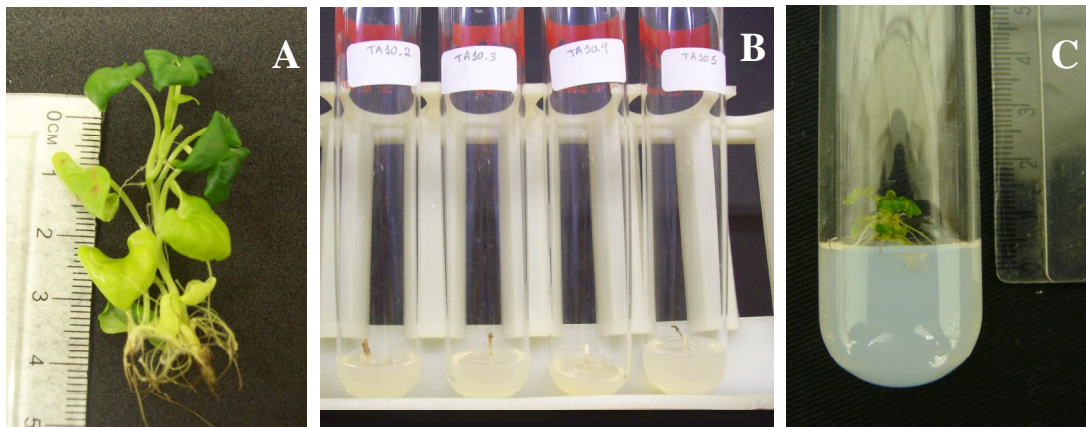
Ácido salicílico (mg.L <sup>-1</sup> )	Altura (cm)				Número de gemas			
	Carboidratos (2%)				Carboidratos (2%)			
	Sacarose	Manitol	Sorbitol	Média	Sacarose	Manitol	Sorbitol	Média
0	3,5aA	1,24aB	1,36aB	1,95a	7,05aA	1,46bB	1,96aB	3,14a
30	1,22bA	1,01abcA	1,12abA	1,12b	1,65bA	1,78bA	1,47abcA	1,63bc
60	0,84cA	0,85cA	0,82bA	0,84c	1,0cA	1,16bA	1,0cA	1,06d
90	0,81cB	1,29abA	0,99bAB	1,0bc	1,0cC	2,70aA	1,65abB	1,73b
120	0,85cA	0,87bcA	0,80bA	0,84c	1,40bcA	1,34bA	1,11bcA	1,29cd
<b>Médias para carboidratos</b>	1,36A	1,03B	1,01B		2,09A	1,66B	1,42B	
<b>C.V (%)</b>		11,18				16,34		
<i>F</i> (A: Ácido salicílico)		67,80**				52,19**		
<i>F</i> (B: Carboidratos)		20,32**				17,00**		
<i>F</i> (AxB)		26,27**				38,05**		

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúscula na vertical (entre as concentrações de cada carboidrato) e maiúsculas na horizontal (entre os carboidratos em cada concentração), diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. <sup>NS</sup> Não-significativo; \*Significativo (p<0,05) e \*\*Significativo (p<0,01). CV = coeficiente de variação.



**Figura 6:** Percentagem de sobrevivência de microestacas de *P. peltatum* cultivadas em meio de Murashige e Skoog (1962) adicionado de sacarose, manitol ou sorbitol e diferentes concentrações de ácido salicílico após 180 dias de cultivo.

Os melhores resultados para adição de AS foi na combinação com a sacarose na concentração de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  resultando em 81% de sobrevivência das plantas cultivadas. A partir da adição de  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  de AS em meio de cultura constatou-se uma drástica diminuição da sobrevivência das plantas. Segundo (Raskin, 1992) o AS é uma substância hormonal que têm importante papel na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, interferindo na absorção das raízes e redução da transpiração. Na Figura 7 é possível verificar o aspecto das plantas de *P. peltatum* conservadas *in vitro*.



**Figura 7:** Conservação *in vitro* por 180 dias de microestacas de *P. peltatum*, sob diferentes concentrações de ácido salicílico e 2% de sacarose, manitol ou sorbitol: A) Aspecto da planta de *P. peltatum* *in vitro*, medindo tamanho aproximado de 3,9 cm, cultivada em meio de cultura contendo 3% de sacarose; B) Microestacas de *P. peltatum* mortas, cultivadas em meio de cultura contendo 2% de manitol; C) Microestaca de *P. peltatum* com coloração verde medindo tamanho aproximado de 1,3 cm, conservada em meio de cultura contendo 2% de sorbitol.

Fortes e Scherwinski-Pereira (2001), verificaram que crescimento das hastes da batata (*Solanum tuberosum* L.), cultivar Macaca é retardado com a adição de AS ao meio de cultura associado com o manitol, a partir da concentração de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$ . No presente estudo também foi observado um menor crescimento das plantas, porém apenas 43,8% destas sobreviveram.

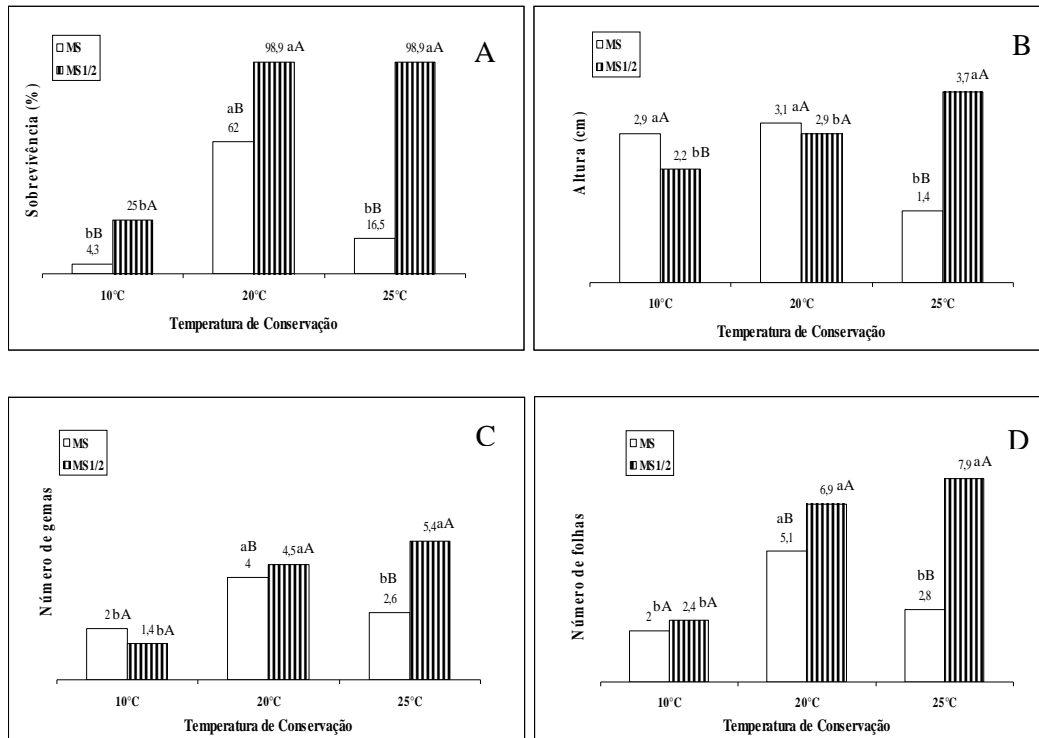
Os resultados deste trabalho demonstram que o uso do AS na conservação de *P. peltatum* é ineficiente nas concentrações acima de  $60 \text{ mg.L}^{-1}$ . Entretanto, devem ser avaliadas concentrações abaixo de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de AS a fim de estabelecer a concentração mais efetiva para a conservação *in vitro* de *P. peltatum*.

#### 5.4 Conservação *in vitro* de *P. peltatum* sob diferentes temperaturas

A manutenção de microestacas de *P. peltatum* em diferentes temperaturas e diferentes concentrações do meio de MS influenciou significativamente a sobrevivência, a altura média e número de gemas formadas nas microestacas conservadas por 180 dias.

De modo geral, em todas as variáveis monitoradas observou-se um mesmo padrão de resposta dependendo do meio de cultura utilizado em relação à temperatura de conservação. Para microestacas de *P. peltatum* cultivadas em meio de MS observou-se uma resposta morfogênica inicial baixa, um aumento significativo da resposta morfogênica e, novamente uma baixa significativa na resposta à medida que a temperatura aumenta. Caracterizando que a resposta morfogênica de maior intensidade para microestacas de *P. peltatum* cultivadas em meio de MS foi obtida quando estas foram mantidas a 20°C de temperatura. De outro modo, as microestacas cultivadas em meio de MS1/2 apresentaram uma baixa resposta morfogênica inicial, entretanto conforme a temperatura aumenta a resposta morfogênica aumentou significativamente. Deste modo, para as microestacas *P. peltatum* cultivadas em meio de MS1/2 a resposta morfogênica de maior intensidade foi obtida quando estas foram mantidas a 20°C de temperatura (Figuras 8 A-D).





**Figura 8:** Conservação *in vitro* por 180 dias de microestacas de *P. peltatum*, sob diferentes temperaturas. A) Sobrevivência (%) de microestacas de *P. peltatum*; B) Altura média (cm) de microestacas de *P. peltatum*; C) Número de gemas formadas em microestacas de *P. peltatum*; Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Para tabela médias completa da análise de variância ver Anexo 14.

Como pode ser observada na Figura 8-A, a temperatura de 10 °C causou a morte dos explantes, não sendo, portanto, viável a manutenção da espécie estudada nestas condições de temperatura. Sob condições de manutenção a 10 °C a percentagem de sobrevivência das brotações cultivadas em meio de MS e MS1/2 foram de 4,3% e 25%, enquanto que as microestacas que permaneceram sob temperatura de 20 °C apresentaram 62% e 98,9%, e a 25 °C de temperatura, 16,5% e 98,9% de sobrevivência para ambos os meios de cultura. Esses resultados vão de encontro a estudos realizados por Silva (2010) que obteve baixos índices de sobrevivência para microestacas de *P. aduncum* (2,4%) e *P. hispidinervum* (2,4%) quando cultivadas em meio de MS e mantidas a 10°C de temperatura. No entanto, os resultados sugerem que microestacas de

*P. peltatum* possuem maior tolerância a 10° de temperatura em meio de MS1/2.

A altura média das plantas variou conforme a temperatura e a concentração do meio de MS. Nas plantas cultivadas em meio de MS1/2 a altura aumentou significativamente, de acordo com o aumento da temperatura de conservação. Entretanto, este mesmo padrão não foi obtido nas plantas cultivadas em meio de MS pleno, nas quais inversamente ao aumento da temperatura obteve-se um decréscimo na altura média (Figura 8 B). A maior altura dos brotos foi de 3,1cm e 3,7cm obtidas em microestacas de *P. peltatum* cultivadas em meio de MS1/2 quando mantidas a 20°C e 25°C de temperatura, respectivamente.

Em relação ao número médio de gemas e folhas produzidas em microestacas de *P. peltatum*, o meio de MS1/2 foi o mais eficiente, proporcionando um maior número de gemas, 4,5 e 5,4 e folhas 6,9 e 7,9 quando mantidas sob 20°C e 25°C de temperatura, respectivamente (Figura 8 C e D).

Assim, verificou-se que o meio de MS1/2 e a temperatura de 20 °C foram os mais apropriados para a manutenção *in vitro* de microestacas de *P. peltatum*, uma vez que 98,9% dos brotos mantidos nesta condição sobreviveram, após 180 dias de conservação, e a altura das plantas conservadas e o número de gemas formado foi inferior ou igual para as microestacas conservadas à 25 °C.

## **5.5 Conservação *ex situ* de *P. peltatum* pelo uso de temperaturas subzero e criogênicas**

### **5.5.1 Dessecação e conservação à temperatura subzero (-20 °C) de sementes de *P. peltatum***

Conforme pode ser observado, os tratamentos de germinação de sementes *P.*

*peltatum* em relação às épocas de avaliação e entre os períodos de 20 e 30 dias de germinação em razão da dessecação, apresentaram diferenças significativas (Tabela 6). Entretanto, de maneira geral, a partir de 30 a 40 dias é possível observar que a percentagem de germinação é maior no tratamento com 0h (zero hora) de dessecação, independentemente da condição de *in vitro* ou gerbox. Contudo não houve diferenças significativas entre esses tratamentos, mas é possível notar uma tendência a diminuir a germinação à medida que aumenta o tempo de dessecação.

**Tabela 6:** Efeito de tratamentos de dessecação de sementes e do ambiente de germinação na percentagem de germinação de *Piper peltatum*.

Ambiente de germinação/Períodos de dessecação	Germinação (%)		
	Épocas de avaliação		
	20 Dias	30 Dias	40 Dias
<b>In vitro</b>			
0h	58,3aA	70,7aA	72,0aA
24h	46,3abA	50,0aA	50,0aA
48h	36,3abA	51,3aA	51,3aA
<b>Gerbox</b>			
0h	37,0abA	66,1aA	67,4aA
24h	25,5bA	53,1aA	53,1aA
48h	53,0abA	58,8aA	58,8aA
Média de germinação (épocas)	42,7B	58,3A	58,7A
CV (%)		15,8	
<i>F</i> (A: épocas):	9,4398**		
<i>F</i> (B: ambiente de germinação/tempo de dessecação):	4,2513**		
<i>F</i> (AxB):	0,7460 <sup>NS</sup>		

\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*\*altamente significativo  $p \leq 0,01$ ; NS= Não significativo a 5%. CV (%): Coeficiente de Variação.

Na Tabela 7 podem ser observados os resultados da percentagem de germinação de sementes de *P. peltatum* em diferentes ambientes após tratamentos de dessecação e diferentes tempos de conservação a -20 °C de temperatura. As percentagens de germinação das sementes *P. peltatum* em função dos diferentes tratamentos (T-1 à T-9) e mantidas em meio de MS foram de 72%, 55,0%, 55,3%, 74,9%, 96,4%, 88,0%, 71,7%, 91,4% e 73,0%, respectivamente, e as percentagens de sementes germinadas mantidas

gerbox foram de 79,4%, 59,7%, 63,1%, 82,4%, 73,6%, 71,8%, 78,3%, 67,5% e 72,5%, respectivamente.

**Tabela 7:** Percentagem de germinação de sementes de *P. peltatum* em diferentes ambientes após tratamentos de dessecação por 0, 24 e 48 horas e tempo de conservação por 0, 90 e 180 dias em temperatura de -20 °C.

Tratamentos de Conservação	Condição de germinação	
	In vitro	Gerbox
<b>Não conservadas à -20 °C</b>		
T-1 (Não-dessecadas)	72,0abA	79,4aA
T-2 (Dessecadas por 24 horas)	55,0bA	59,7aA
T-3 (Dessecadas por 48 horas)	55,3bA	63,1aA
<b>Conservadas por 90 dias à -20 °C</b>		
T-4 (não-dessecadas)	74,9abA	82,4aA
T-5 (Dessecadas por 24 horas)	96,4aA	73,6aB
T-6 (Dessecadas por 48 horas)	88,0abA	71,8aA
<b>Conservadas por 180 dias à -20 °C</b>		
T-7 (Não-dessecadas)	71,7abA	78,3aA
T-8 (Dessecadas por 24 horas)	91,4aA	67,5aB
T-9 (Dessecadas por 48 horas)	73,0abA	72,5aA
Média de Condição de germinação:	75,3A	72,0A
CV (%):	12,1	
F (A: Tratamentos):	4,7325**	
F (B: Condição de germinação):	2,4791 <sup>NS</sup>	
F (A x B):	3,0726**	

\*\*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, entre os tratamentos de conservação dentro de cada condição de germinação das sementes, e maiúsculas na horizontal, dentro de cada tratamento de conservação e entre as condições de germinação das sementes, diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. <sup>NS</sup>: Não significativo; CV (%): Coeficiente de Variação.

De maneira geral, na comparação entre os períodos de dessecação e conservação a -20 °C de temperatura, houve perda de viabilidade quando as sementes foram apenas dessecadas. No entanto, é possível observar que os tratamentos com temperaturas promoveram a conservação e possibilitou às sementes manterem seu poder de germinação ao longo do tempo, e possivelmente tenham eliminado algum problema de dormência, sugerindo que a dessecação afeta a germinação das sementes, caso essas não passem por algum tratamento de quebra de dormência.

Quanto às condições de germinação é possível verificar que a germinação *in*

*vitro* foi melhor, especialmente para os tratamentos T5 e T8 (sementes dessecadas por 24hs e mantidas por 90 e 120 dias à -20 °C de temperatura, respectivamente). Em Silva (2010) a conservação de sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* submetidas aos diferentes tratamentos de dessecação e períodos de conservação à -20 °C, a percentagem de germinação das sementes não diferiu estaticamente entre os tratamentos. As sementes apresentaram taxa de germinação em torno de 90% nos tratamentos e nas diferentes condições de germinação.

Conforme estudo de Almeida (1999) sementes de tamanho pequeno e com dispersão feita por morcegos são consideradas espécies pioneiras. Medeiros e Eira (2006) confirmam que sementes ortodoxas geralmente apresentam tamanhos reduzidos e normalmente apresentam teor de água reduzido, quando comparadas com o teor de água das sementes recalcitrantes.

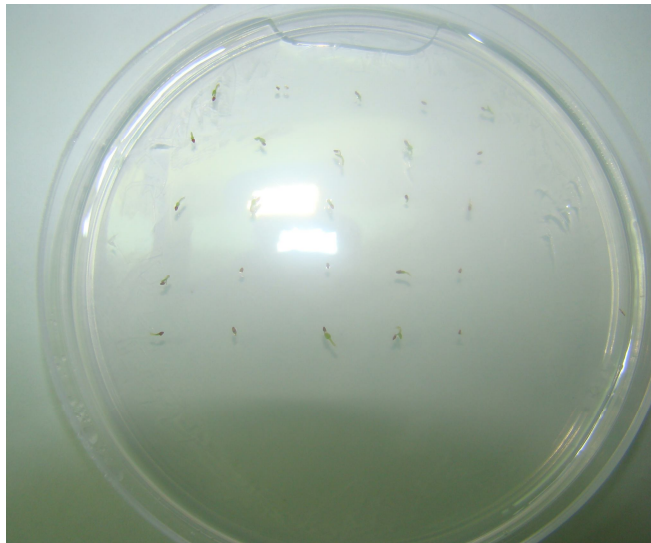
Existe uma relação favorável entre a diminuição do teor de umidade e a viabilidade das sementes conservadas, conforme a maior parte dos trabalhos de conservação sobre sementes ortodoxas. Eira *et al.* (1992) constataram que a diminuição do teor de umidade e a conservação à -20 °C por 12 meses de sementes de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf), uma importante planta medicinal, favoreceu a germinabilidade das sementes conservadas, mantendo índices de germinação satisfatórios, e podendo ser classificadas como ortodoxas. Da mesma forma, Melo e Eira (1995), objetivando classificar as sementes de jacarandá mimoso (*Jacaranda acutifolia*) quanto ao seu comportamento fisiológico e estudar a manutenção da viabilidade das sementes após conservação em temperatura de -20 °C verificaram que a redução do teor de umidade de 7,4% para 4,0% não interferiu na viabilidade das sementes. As sementes de jacarandá mimoso mantiveram a viabilidade por até 24 meses, independente de terem o teor de umidade reduzido ou não. Os autores

classificaram as sementes como ortodoxas.

As sementes de *P. peltatum* apresentam segundo Guimarães e Giordano (2004) 0,5 a 0,6 mm de comprimento. Silva (2010) descreveu que sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* apresentam tamanho inferior a 1,0 mm classificando-as no grupo de espécies pioneiras e sementes ortodoxas. Esses resultados são indicativos e nos permitem inferir que as sementes de *P. peltatum* são ortodoxas.

### 5.6 Conservação *ex situ* de *P. peltatum* sob condições criogênicas

Nesse experimento se avaliou a tolerância das sementes de *P. peltatum* a criopreservação pelo método da vitrificação e também o efeito de diferentes crioprotetores. A Figura 9 ilustra o aspecto das sementes germinadas de *P. peltatum* após a criopreservação.



**Figura 9:** Sementes de *P. peltatum* criopreservadas e germinadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contido em placa de petri.

Os resultados dos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas, independentemente do uso ou não de substâncias crioprotetoras (Tabela 8).

**Tabela 8:** Tolerância de sementes de *Piper peltatum* a criopreservação em função da época de avaliação da germinação e de tratamentos com substâncias crioprotetoras.

Tratamentos	Germinação (%)		
	Épocas de avaliação		
	20 Dias	30 Dias	40 Dias
T1 - Test (-NL)	60,5	70,4	75,1
T2 - +NL (Sem crioprotetor)	68,2	73,5	78,0
T3 - +NL (+PVS2)	64,7	71,6	73,4
T4 - +NL (+PVS2 resfriada)	46,9	58,1	65,3
T5 - +NL (+PVS3)	58,3	63,1	66,9
T6 - +NL (+PVS3 resfriada)	68,7	70,2	70,2
<b>Média de épocas</b>	61,2 A	67,8 A	71,4 A
<b>CV (%)</b>		17,6	
<i>F</i> (A: épocas):	2,3016 <sup>NS</sup>		
<i>F</i> (B: tratamentos):	1,6896 <sup>NS</sup>		
<i>F</i> (AxB):	0,1862 <sup>NS</sup>		

\*Médias seguidas por letras semelhantes na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS= Não significativo a 5%.

No tratamento em que as sementes foram armazenadas em NL sem a adição de crioprotetor a germinação alcançada pelas sementes foi de 68,2%, não diferindo estatisticamente do tratamento controle (T-1). Os resultados sugerem que o teor de umidade inicial das sementes de *P. peltatum* não constituiu como fator limitante para a criopreservação das sementes por 24 horas. Resultados semelhantes, em relação ao teor de umidade, foram encontrados por Chaudhury e Chandel (1994) trabalhando com sementes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). As sementes foram dessecadas por diferentes períodos de tempo (0, 8, 20, 42, 48 e 120 horas) para determinar o teor de umidade. Obtidos os valores do teor de umidade das sementes, estas foram criopreservadas por 24 horas em NL. De acordo com os autores, o período de dessecação por 48 horas, com sementes com teor de umidade em torno de 11,9%,

permitiu a maior percentagem de germinação das sementes criopreservadas. Os menores tempos de dessecação, conseqüentemente apresentavam sementes com maior teor de umidade, e este aumento da umidade não permitiu a germinação de nenhuma das sementes criopreservadas.

Ainda na Tabela 8 em relação às diferentes épocas de avaliação da germinação (20, 30 e 40 dias) é possível observar que a percentagem de germinação foi crescente à medida que aumentou-se o tempo de avaliação. Embora não tenha demonstrado diferenças significativas, essa resposta pode estar relacionada à retomada do metabolismo na semente germinante, o qual envolve síntese de proteínas e ácidos nucléicos, bem como a síntese de reparo de membranas. Similarmente ao metabolismo que ocorre com sementes submetidas ao *osmocondicionamento*, as quais só podem germinar em condições apropriadas após a absorção de umidade em quantidade suficiente para alcançar nível mínimo e temperatura adequada que possa estimular o metabolismo.

Conforme Borges e Rena (1993) a umidade é fator imprescindível a germinação, pois é com a absorção de água por embebição que se inicia o processo. Para que isso aconteça, há necessidade de que a semente alcance um nível adequado de hidratação, que permita a reativação dos processos metabólicos. A absorção, inicialmente, passa por uma fase exponencial, em conseqüência da grande diferença de potencial hídrico entre a semente e o meio. Como a semente encontra-se desidratada, seu potencial mátrico é muito negativo, determinando um potencial hídrico muito baixo, bem menor do que no ambiente, o que resulta num intenso fluxo de água para as sementes.

Borges *et al.* (1991) ressaltam que a semente está também sujeita ao déficit de umidade, causado pelo potencial osmótico do meio no qual se encontra. Cada espécie possui um nível crítico de umidade, abaixo do qual não se verifica germinação, muito



embora isto não signifique que o metabolismo esteja inativado. Ainda, as sementes apresentam comportamento variado, quanto ao mecanismo de obtenção da umidade.

Com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que as sementes de *P. peltatum* foram tolerantes à criopreservação por 24 horas em NL, e os diferentes tratamentos em relação ao uso de crioprotetores não interferiram na germinabilidade das sementes.

## 6 CONCLUSÕES

- Ambas as espécies *A. amazonicus* e *P. peltatum* são comumente utilizadas pelas populações nas áreas de coleta. A maior parte das áreas de coleta visitadas está sob ação antrópica de desmatamento.
- O uso de diferentes fontes de carboidratos na conservação *in vitro* de *A. amazonicus* influencia a altura da parte aérea. Com o aumento da concentração da sacarose há tendência de aumento na altura e número de gemas, porém a espécie apresenta crescimento *in vitro* muito lento.
- A adição de manitol e sorbitol ao meio de cultura são inadequadas para a conservação *in vitro* de microestacas de *A. amazonicus* pelas baixas taxas de sobrevivência e oxidação das microestacas.
- O sorbitol pode ser usado na conservação de *P. peltatum* em intervalo de 1% a 2% de concentração adicionado ao meio de cultura de MS.
- Para a conservação *in vitro* de *P. peltatum* em função da sacarose, manitol e sorbitol e diferentes concentrações de ácido salicílico (AS), os melhores resultados são obtidos na ausência de AS, com 81%, 87,5% e 62,5% das culturas sobreviventes respectivamente. A adição de 30 mg.L<sup>-1</sup> de AS combinado com a sacarose resulta em 81% de sobrevivência das plantas cultivadas. A partir da adição de 60 mg.L<sup>-1</sup> de AS há uma drástica diminuição da sobrevivência das plantas.
- Para a conservação de microestacas de *P. peltatum* a temperatura indicada é de 20°C de temperatura cultivadas em meio de MS1/2 (50% das concentrações de sais do respectivo meio).
- A temperatura de 10 °C não é viável à conservação da espécie estudada, uma vez que causa morte dos explantes.

- Sementes de *P. peltatum* perdem parte da viabilidade quando são apenas dessecadas. Os tratamentos com temperatura de conservação a -20 °C após a dessecação promovem a conservação e possibilitaram às sementes manterem seu poder de germinação ao longo do tempo.
- Sementes de *P. peltatum* são melhor conservadas se dessecadas por 24hs e mantidas por à -20 °C de temperatura
- Nas condições de armazenamento testadas (conservação a -20 ou criopreservação) as sementes de *P. peltatum* apresentam características de sementes ortodoxas.
- Sementes de *P. peltatum* são tolerantes à criopreservação. O uso de crioprotetores não interfere na germinabilidade das sementes.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de *A. amazonicus* e *P. peltatum* apresentarem compostos de potenciais usos no combate à malária são poucos os conhecimentos sobre a biologia dessas espécies. A maior parte das áreas de coletas visitadas está sob ação antrópica de desmatamento. Conseqüentemente, são necessários estudos mais aprofundados que proporcionem melhor conhecimento sobre as espécies, ainda que as mesmas não se encontrem na lista de espécies prioritárias para a conservação.

O cultivo *in vitro* de *A. amazonicus* apresenta uma característica peculiar, pois mesmo em meio de MS as partes aéreas não enraízam. Desta forma, poder-se-ia imaginar que a sobrevivência das estacas não suportaria o tempo de 180 dias. Apesar de toda a contrariedade as estacas de *A. amazonicus* sobreviveram e emitiram brotações e folhas, muito embora o tenham feito de forma lenta. Observamos a necessidade de testar outros reguladores de crescimento para melhor entender os mecanismos fisiológicos e bem entender os seus efeitos na morfogênese da espécie.

Na conservação *in vitro* de microestacas de *P. peltatum* referente ao uso do sorbitol observou-se uma tendência de resistência das microestacas ao aumento das condições osmóticas promovidas por esse carboidrato. Sugerimos que estudos posteriores abordem o uso do sorbitol associado à sacarose e a concentrações de AS abaixo de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  a fim de inferir outras concentrações desses reguladores osmóticos com alta eficiência na conservação destas espécies.

Este foi um trabalho pioneiro no que se refere à localização de áreas de ocorrência, cultivo e conservação *in vitro* das espécies *A. amazonicus* e *P. peltatum*. Portanto a multidisciplinaridade foi uma meta que se tentou alcançar embora em muitos casos, não foi possível.

Das três estratégias de conservação testadas: Conservação *in vitro*, conservação

de sementes sob temperaturas subzero (-20°C) e criopreservação de sementes (nitrogênio líquido), para determinar a melhor estratégia de conservação, bem como o tipo de comportamento fisiológico da semente de *P. peltatum*. De maneira geral, verificou-se que estas três estratégias podem ser utilizadas para a conservação de germoplasma de *P. peltatum*.

Entre as técnicas de conservação *in vitro* (diferentes temperaturas e reguladores osmóticos), a manutenção em diferentes temperaturas foi a que apresentou os resultados mais satisfatórios, uma vez que foi o tratamento que apresentou os menores valores de altura e número de gemas, além de não ter alterada a taxa de sobrevivência das brotações *in vitro*, quando comparadas aos melhores resultados com uso de sacarose, manitol e sorbitol adicionados ou não de AS. Ressalta-se que a combinação do uso de reguladores osmóticos ou químicos com conservação em diferentes temperaturas pode ser uma estratégia bem sucedida em novos estudos a serem realizados para se determinar as melhores condições de conservação com o uso de reguladores osmóticos e hormonais ao meio de cultura.

Entre as técnicas utilizadas para a conservação de sementes de *P. peltatum* todas se mostraram satisfatórias para a conservação e que as sementes são tolerantes à conservação à -20 °C, e também apresentaram tolerância à conservação à -196 °C, não apresentando perda da viabilidade durante o período de conservação. Este comportamento permitiu classificar as sementes de *P. peltatum* como ortodoxas, já que estas não foram danificadas pela dessecação e/ou exposição à temperaturas abaixo de zero.

As sementes não apresentaram problemas quanto à conservação, embora quando estas foram mantidas em temperatura ambiente por alguns meses, deixavam de germinar, o que pode ser devido à perda de viabilidade ou entrada em estado de

dormência. Isso indica que as sementes de *P. peltatum* não podem ser mantidas sob temperatura ambiente por muito tempo, sob risco de perderem sua viabilidade.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, Y. L.; MILHOUS, W.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F. *In vitro* antimalarial activity of crude extracts of *Pothomorphe peltata* and *P. umbellata* (PIPERACEAE). **Tropical Medicine**, v. 40, p. 91-94, 1998.

ALMEIDA, M. C. **Banco de sementes e simulação de clareiras na germinação de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.)**. 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade Federal do Acre. Rio Branco.

ALVES, R. B. N. **Caracterização morfológica, química e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen**. 2008. 129 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São Paulo.

AMORIM, C. Z.; FLORES, C. A.; GOMES, B. E.; MARQUES, A. D.; CORDEIRO, R. S. B. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, p. 101-106, 1988.

BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasílica**, v.12, n. 2, p.145-164, 1998.

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar *Smooth Cayenne* de abacaxizeiro. **Pesq. agropec. bras.**, v. 39, n. 8, p.725-733, 2004.

BARROS, S.; ROPKEL, C. D.; SAWADAL, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1. p. 53-61. 2005.

BERTONI, B. W.; PEREIRA, S. P.; ASTOFI-FILHO, S.; MAURO, C. FRANÇA, S.; PEREIRA, A. M. S. *Zeyheria montana* Mart. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.) **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda., 2007. p. 294-326.

BHAGYALAKSHMI, N.; SINGH, N. S. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with a high yield of oleoresin. **Hort Science**, v. 63, n. 2, p. 321–327, 1988.

BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. *In vitro* conservation of *Musa* germplasm: effects of mannitol and temperature on growth and storage. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 68, n. 6, p. 841-846, 1993.

BIZERRIL, M. X. A.; A. RAW. 1998. Feeding behaviour of bats and dispersal of *Piper arboreum* seeds in Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 14: p. 109–114.

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p.83-136.

BORGES, E. E. L.; VASCONCELOS, P. C. S.; CARVALHO, D. V.; BORGES, R. C. G. Estudos preliminares sobre o efeito do estresse hídrico na germinação de sementes de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra*) e cedro-rosa (*Cedrela fissilis*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 13, n. 2, p.115-118, 1991.

BORKOWSKA, B.; SZCZERBA, J. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 240, p. 911-915, 1991.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Centro de Divulgação Universitária - Estudos e Ensaios Biblioteca de Divulgação e Cultura Publicação. n. 2, ser. 1a, 1953. 523 p.

BRANDÃO, M. G. L. **Estudo Químico do *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, planta Utilizada na Amazônia como Preventivo da Malária**. 1991. 281 pp. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BROHEM, C. A.; SAWADA, T. C. H.; MASSARO, R. R.; ALMEIDA, R. L.; RIVELLI, D. P.; ROPKE, C. D.; DA SILVA, V. V.; DE LIMA, T. M.; CURTI, R.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 111-119. 2009.

CARVALHO, L. H.; FERRARI, W. M. S.; BRANDÃO, M. G. L.; KRETTLI, A. U. Plantas brasileiras: alternativas no tratamento da malária. **Ciência Hoje**, v. 22, p. 62-68, 1997.

CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006. 82 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, 21, 99-105. 1998.

CHAROENSUB, R.; PHANSIRI, S.; YONGMANITCHAI, W.; SAKAI, A. Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple mononodal culture. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 485-492, 2003.

CHAUDHURY, R.; CHANDEL, K. P. S. Germination studies and cryopreservation of seeds of black pepper (*Piper nigrum* L), a recalcitrant species. **Cryo-Letters**, v. 15, p. 145-150, 1994.

CHAUVEL, A.; LUCAS, Y.; BOULET, R. On the genesis of the soil mantle of the region of Manaus, Central Amazonia, Brazil. **Experientia**, v. 43, n. 2. PP. 234-241. 1987.

CONCEIÇÃO, A. M.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum*) cvs. Baronesa e Santo Amor: efeito sobre a formação de gemas e brotações dos segmentos caulinares. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 67-71, 1998.

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. v.



1. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. 1926, p. 6-351.
- CORREIA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M.C. 1994. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP. 162 p.
- DAT, J. F.; FOYER, C. H.; SCOTT, I. M. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. **Plant Physiology**. n. 118, p. 1455-1461.1998.
- DE FEO, V. Uso di piante ad azione antiinfiammatoria nell'Alto Ucayali, Perú Orientale. **Fitoterapia**, v. 62, n. 6, p. 481-494,1991.
- DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; GIULIETTI, A.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Etnobotanica y bioactividad de plantas medicinales utilizadas por un grupo indígena Takana de la Amazonía peruana. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 14, p. 195-208, 1995.
- DESMARCHELIER, C.; GURNI, A.; CICCIA, G.; GIULIETTI, A. M. Ritual and medicinal plants of the Esejejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 45-51, 1996.
- DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORE, L. R.; KATO, M.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. **Planta Medica**, v. 63, n. 6, p. 561-563, 1997a.
- DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. **Braz J Med Biol Res**, n. 30, p. 85-91, 1997b.
- DESMARCHELIER, C.; SLOWING, K.; CICCIA, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract. **Fitoterapia**, v. 471, p. 556-558, 2000.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA, C.C.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, p. 529-540, 1994.
- DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; TEIXEIRA, A. L. A.; GOMES, E. S.; HERNANDEZ, F. F. F. Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.] **Ciênc. agrotec.**, v. 27, n.4, p.934-938. 2003.
- DINIZ, L. R. L. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *ampelozizyphus amazonicus* DUCKE sobre a função renal**. (Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia). 2006. 116 f. ils. Universidade de Minas Gerais.
- DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2. ed. Cambridge, Estados Unidos: Cambridge University Press, 1993. p. 172-179.
- DORION, N.; KADRI, M.; BIGOT, C. *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 298, p. 335-343, 1991.

DUCKE, A. Plantas novas ou pouco conhecidas da região amazônica; *Ampelozizyphus* Ducke n. gen. **Arch. Inst. Biol. Veg.** v. 2, n. 2, p. 157-158. pl. 1-2. 1935.

DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. Florida, United States: CRC Press, 1994. 215 p.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L. B.; DELAMARE, A. P. L.; ZENI, A. L. B.; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. de; AZEVEDO, J. L. de; **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001, p. 257-278.

EIRA, M. T. S.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R.; MELLO, C. M. C.; TANAKA, D. N. Conservação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. Leguminosae. In: 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas. **Anais.**, p. 523-526, 1992.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of horticultural species. **Acta Horticulturae**, v. 298, p. 327-334, 1991.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 112, p. 9-18, 1997.

ENGELMANN, R. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 427-433, 2004.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14 ed., London: W.B. Saunders Company, 1996. 38 p.

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A. e MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, p. 407-426, 1984.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora gibberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FARIA, R. T.; ILLG, R. D. Micropropagation of *Zingiber spectabile* Griff. **Scientia Horticulturae**, v. 62, p. 135-137, 1995.

FEDERAÇÃO EUROPEIA DE BIOTECNOLOGIA. **Biodiversidade: O impacto da Biotecnologia**. Boletim Informativo, n. 11. 2001. Disponível em: [http://files.efbpublic.org/downloads/Biodiversity\\_Portuguese.pdf](http://files.efbpublic.org/downloads/Biodiversity_Portuguese.pdf). Acesso em: 16 de fevereiro de 2010.

FERRARI, W. M. S. **Avaliação da Atividade Antimalárica da Planta “Cerveja de Índio” (*Ampelozizyphus amazonicus*) utilizada como Profilático na Amazônia**. 1997. 122 f. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.

FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; ADAMI, Y. L.; CRUZ ESPINOLA-MENDES, E.; FIGUEIREDO, M. R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. The intraperitoneal *Plasmodium berghei* Pasteur infection of swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials

- in brazilian endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 94, p. 243-247, 2000.
- FIGUEIREDO, R. A.; SAZIMA, M. Pollination Biology of Piperaceae Species in Southeastern Brazil. **Annals of Botany**, v. 85, p. 455-460, 2000.
- FLEMING, T. H. 1981. Fecundity, fruiting pattern, and seed dispersal in *Piper amalago* (Piperaceae), a bat dispersed tropical shrub. **Oecologia**, v. 51, p. 42– 46.
- FLEMING, T. H. 1985. Coexistence of five sympatric *Piper* (Piperaceae) species in a tropical dry forest. **Ecology**, v. 66, p. 688–700.
- FORTES, G R de L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, 2001.
- GARCIA, L. C.; MORAES, R. P.; LIMA, R. M. B. Determinação do grau crítico de umidade em sementes de *Cenostigma tocantinum* Ducke. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 172-176, 2008.
- GENTRY, A. H. 1990. Floristic similarities and differences between southern Central america and upper Central Amazonia. In: GENTRY, A. H. (ed.), **Four Neotropical rainforests**, 141–157. Yale University Press, New Haven, Connecticut, USA.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: Part 1. The technology**. Wilts: Exegetcs, 1993. 574 p.
- GOLMIRZAIE, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweet potato germplasm. In: ARTHUR, C.; FERGUNSON, P.; SMITH, B. (Ed.). **Impact on a changing world**: program report 1997-1998. Lima: International Potato Center, 1999. p. 351-356.
- GONZALES F.; DIAZ, J. N.; LOWY P. **Flora Ilustrada de San Andrés y Providencia**. Colômbia: Sena/Universidad Nacional, 1995. p. 121-242.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 92, p.1-13, 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília. EMBRAPA-CBAB, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.
- GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J. H.; MCMAHON, J. B.; PANNELL, L. K.; CRAGG, G. M.; BOLD, M. R. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. **J. Org. Chem.**, v. 57, p. 2809-2811, 1992.
- HAMANN, O. The IUNC/WWF Plants Conservation Programme. Gland: Switzerland. **Vegetation**, v. 60, p. 147-149. 1985.

- HIDALGO, A.F.; BOMFIM-NETTO, J. V.; VIANA-JÚNIOR, J. M. **Caracterização de áreas de ocorrência e da regeneração natural de populações de saracura-mirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke - Rhamnaceae) no Estado do Amazonas**. CD de Resumos, 1ª Jornada Amazonense de Plantas Medicinais, Manaus, nov – 2005a.
- HIDALGO, A.F.; VIANA-JÚNIOR, J. M.; BOMFIM-NETTO, J. V. **Aclimação de mudas e cultivo de saracura-mirá (*Ampelozizyphus amazonicus*)**. CD de Resumos, 1ª Jornada Amazonense de Plantas Medicinais, Manaus, nov – 2005b.
- HORVÁTH, E.; SZALAI, G; JANDA T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. **J. Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 290-300. 2007.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot-tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; WANG, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (eds.) **Handbook of Plant Cell Culture**, New York: MacMillan, 1983. v. 1, p.177-277.
- HUSSEY, G. *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops. In: MANTELL, S.H.; SMITH, H. (eds.) **Plant Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University Press, 1983. p. 111-138.
- HUTCHINSON, J. 1973. **The families of flowering plants**. 3 ed., London, Clarendon Press.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Base de dados perfil dos municípios brasileiros, 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 22 de abril de 2010.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Base de dados censos demográficos, 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 22 de abril de 2010.
- ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. Piperaceae do Município do Rio de Janeiro - I. O gênero *Piper* L. **Arq. Jard. Bot. Rio de Janeiro**, v. 20, p. 145-188. 1997.
- IUCN – THE INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **Guidelines on the conservation of medicinal plants**. Gland: Switzerland. 2004. 50 p.
- JANDA, T.; SZALAI, G; TARI, I; PÁLDI, E. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. **Planta**, v. 208, p. 175-180.
- JOHARI, N.; KENG, C. L.; RATHINAM, X.; SINNIAN, U. R.; SUBRAMANIAN, S. Cryopreservation of *Brassia rex* orchid shoots using PVS2 technique. **Research Journal of Botany**, v. 4, n. 3, p. 74-88, 2009.
- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução a Taxonomia Vegetal**. 12 ed., São Paulo: Companhia Editorial Nacional, 1998. p. 306-310.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 67–71, 2001.

KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; FERRARI, W. M. S. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1033-1042, 2001.

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO V. E.; KRETTLI, A. U. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1505–1511. 2008.

KUBOTA, C.; RAJAPAKSE, N. C.; YOUNG, R. E. Low-temperature storage of micropropagated plantlets under selected light environments. **HortScience**, v. 31, n. 3, p. 449-452. 1996.

KUBOTA, Y.; MURATA, H.; KIKUZAWA, K. Effects of topographic heterogeneity on tree species richness and stand dynamics in a subtropical forest in Okinawa Island, southern Japan. **Journal of Ecology**, v. 92, n. 2, p. 230-240. 2004.

KUSUMI, K.; YAENO, T.; KOJO, K.; HIRAYAMA, M.; HIROKAWA, D. The role of salicylic acid in the glutathione-mediated protection against photooxidative in rice. **Physiol. Plant**. v. 128, p. 651-661. 2006.

LANGHANS, W.; HORST, R. K.; EARLE, E. D. Disease-free plants via tissue culture propagation. **Hort Science**, v. 12, n. 3, p. 25, 1977.

LATA, H.; MORAES, R. M.; BERTONI, B.; PEREIRA, A. M. S. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. **In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant**, v. 45, p. 1054-1057, 2009.

LÉDO, A. S.; SÁ, A. J.; SILVA-JUNIOR, J. F. Efeito do manitol na conservação *in vitro* de microestacas de Mangabeira. Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Ceará, 2009.

LEMOS, E. E. P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on intermodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, v. 25, p. 105-112, 1998.

LESCURE, J. P.; BOULET. Relationships between soil and vegetation in a tropical rain forest in French Guiana. **Biotropica**, v. 17, n. 2, p. 155-164. 1985.

LIEBERMAN, M.; LIEBERMAN, D.; HARTSHORN, G. S.; PERALTA, R. Small-scale altitudinal variation in lowland wet tropical forest vegetation. **Journal of Ecology**, v. 73, n. 2, p. 505-516. 1985.

LIMA, D. B.; MEYER, N. B.; BRANDÃO, M. G. L.; VIEIRA, M. A. R. Efeito do extrato bruto de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (cerveja de índio) sobre a diurese em ratos. 04-015, Livro de Resumos, XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia, Centro de Convenções Monte Real Águas de Lindóia, SP, 21-24 de setembro de 2003.

LIMA, R. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. **Rodriguésia**, v. 57

n. 2, p. 247-249. 2006.

LOPES, K. P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba. Areia.

LOPES-DELGADO, H.; JIMENEZ-CASAS, M.; SCOTT, I. M. Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetyl salicylic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, n. 3, p. 145-152, 1998.

LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N.; Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol**, v. 7, p. 189-196, 2001.

LOYD G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montail laural (*Kamia latifolia*) by use ok shoot tip cultures, **Comb Proc Intl Soc**, v. 30, p. 421-427. 1980.

LUZ, F. J. F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 88-96. 2001.

MALAMY, J.; CARR, J. P.; KLESSIG, D. F.; RASKIN, I. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, v. 250, p. 1001-1004. 1990.

MANSUR, E.; PACHECO, G.; VIEIRA, M. L. C. Cconservação *in vitro* de Germoplasma. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Eds.). **Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas**. Viçosa, pp. 167-188. 2009.

MANTOVANI, W. 2003. A degradação dos biomas brasileiros. In: RIBEIRO, W.C. (ed.). **Patrimônio ambiental brasileiro**. 2003. pp. 367- 439. Editora Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARTIN, C.; IRIONDO, J. M.; GONZALES-BENITO, E.; PEREZ, C. The use of tissue culture techniques in the conservation of plant biodiversity. **Agro Food Industry Hi-Tech**, Milan, v. 9, n. 1, p. 37-40, 1998.

MATOS, F. J. A. **O Formulário Fitoterápico do Professor Dias Rocha**. 2 ed., Fortaleza: Ed. UFC, 1997, 320 p.

MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. **Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas**. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 127). Brasília, 13 p., 2006.

MEIER, W.; BERRY, P. E. *Ampelozizyphus guaquirensis* (Rhamnaceae), a new tree species endemic to the Venezuelan Coastal Cordillera. **Brittonia**, v. 60, n. 2, p. 131-135. 2008.

MELO, C. M. C.; EIRA, M. T. S. Conservação de sementes de jacarandá mimoso (*Jacaranda acutifolia* Humb & Bonpl.) – Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 2, p. 193-196, 1995.

MESQUITA, J. M. O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A. P.; LOMBARDI, J. A.;

OLIVEIRA, A. B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 15, v. 1, p. 6-12. 2005.

METRAUX, J. P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID, E.; BLUM, W.; INVERARDI, B. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, v. 250, p. 1004-1006. 1990.

MEYER, N. B.; BRANDÃO, M. G. L.; VIEIRA, M. A. R. **Efeito do extrato bruto da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (cerveja de índio) sobre a diurese em ratos acordados mantidos em gaiolas metabólicas.** In: XI Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2002, Belo Horizonte, Minas Gerais.

MILLIKEN, W. **Plants for Malaria, Plants for Fever. Medicinal species in Latin America - a bibliographic survey.** DICKESON, S. (ed.). The Royal Botanic Garden, Kew (U.K.). 1997. 116 p.

MING, L. C.; SILVA, S. M. P. da; SILVA, M. A. S. da; HIDALGO, A. F.; MARCHESE, J. A.; CHAVES, F. C. M. Manejo e Cultivo de Plantas Mediciniais: Algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. In: COELHO, M. F. B.; COSTA-JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J. L. D. **Diversos Olhares em Etnobiologia, Etnoecologia e plantas medicinais:** Anais do Seminário de Mato-grossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Mediciniais. Cuiabá: Unicen, 2003, p. 149-156.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em: <<http://mobot.mobot.org/cgi-bin>> Acesso em: 13 out. 2005

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=89&idConteudo=8142>. Acesso em: 15 de setembro de 2009.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant Physiology.** New York: Springer. 329 p. 1995.

MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. Â. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 72-81, 2006.

MONETTE, P. L. Cold storage kiwifruit shoot tips *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1203-1205, 1986.

MONGELLI, E.; ROMANO, A.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. **Planta Medica**, v. 65, n. 4, p. 376-378, 1999.

MORA-HERRERA, M. E.; LOPEZ-DELGADO, H.; CASTILLO-MORALES, A.; FOYER, C. H. Salicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. **Physiol. Plant.**, v. 125, p. 430-440. 2005

MORÁN, E. F. **A ecologia humana das populações da Amazônia.** Petrópolis, RJ: Editora Vozes, 1990. 368 p.

MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; GUIMARÃES, E. F. Constituintes químicos de

*Piper solsianum* C.D.C. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 76, n. 4, p. 106-109, 1995.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de Bromeliáceas**. 2008. 67 f. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas.

MOURA, T. L. DE; ALMEIDA, W. A. B. DE; MENDES, B. M. J.; MOURÃO-FILHO F. DE A. A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MURASHIGE, T. Manipulation of organ culture in plant tissue cultures. **Botanical Bull Acad Sinica**, v. 18, p. 1-24, 1977.

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

NANDA, K. K.; JAIN, M. K.; MALHOTRA, S. Effect of glucose and auxins in rooting etiolated stem segments of *Populus nigra*. **Physiology Plantarum**. Copenhagen, v.24, p.387-391, 1971

NEGASH, A.; KRENS, F.; SCHAART, J.; VISSER, B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 107-111, 2001.

NICOLOSO, F. T.; ERIG A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciênc. agrotec.**, Edição Especial, p.1499-1506, 2002.

OLIVEIRA, M. M. Biotecnologia Molecular: Avanços e Aplicações na Área da Biotecnologia Vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, v. 66, p. 22-27, 2000.

PAULINO-FILHO, H.F.; GOTTLIEB, H.E.; TOMIKA, K.; GOTTLIEB, O.R.; YOSHIDA, M.; LEMONICA, J.P. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke- Rhamnacea. In: **I Encontro Regional de Química**, 1979, São Carlos, São Paulo.

PEIXOTO, A. L.; ROSA, M. M. T. d; BARBOSA, M. R. V.; RODRIGUES, H. C. Composição florística do entorno da Represa de Ribeirão das Lages, Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Univ. Rural**, Sér. Ciênc. da Vida, v. 17, n. 1, p. 51-74, 1995.

PELISSIER, P.; DRAY, S.; SABATIER, D. Within-plot relationships between tree species occurrences and hydrological soil constraints: na exemple in French Guiana investigated trough canonical correlation analysis. **Plant Ecology**, v. 162, n. 2, p. 143-156. 2001.

PINTO, A. C. S. **Estudo fitoquímico e biológico de *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (Piperaceae)**. 2002. 159 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas.

PINTO, A. C. S.; SILVA, L. F. R.; CAVALCANTI, B. C.; MELO, M. R. S.; CHAVES, F. C. M.; LOTUFO, L. V. C.; MORAES, M. O.; ANDRADE-NETO, V. F.; TADEI, W. P.; PESSOA, C. O.; VIEIRA, R. P. P.; POHLIT, A. M. Novos derivados antimalárica e



citotóxica de 4-nerolidilcatecol. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2731–2735. 2009.

PINTO, A. C. S.; SILVA, L. F. R.; CHAVES, F. C. M.; SANTOS, P. A.; NUNEZ, C. V.; TADEI, W. P.; POHLIT, A. M. *Piper peltatum*: biomass and 4-nerolidylcatechol production. **Planta medica**. 2010.

PIRES, J. M.; PRANCE, G. T. The vegetation types of the Brazilian Amazonia. In: PRANCE, G. T.; LOVEJOY, T. E. (Eds). **Key environments: Amazonia**. Pergamon Press, New York, p. 109-145. 1985.

PROBIO. **Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica brasileira**. Subprojeto mapeamento dos biomas brasileiros. Brasília: MMA e CNPq. Disponível em: [www.mma.gov.br/portabio](http://www.mma.gov.br/portabio), Acesso em: 2008.

PROGRAMA BIOTA. Banco de germoplasma. Centro de Referência e Informação Ambiental – CRIA. Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo. Acesso em: 08 de abril de 2010. Disponível em: <http://www.biota.org.br/iRead?57+livros.biota+129>.

PROGRAMA SPRING 5.1.5. Disponível em: <[www.inpe.gov.br](http://www.inpe.gov.br)>. Acesso: 08 de janeiro de 2009.

QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M.; PINTO, A. C. S. *et al.* Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 1, p. 93-104, 2003.

RADAMBRASIL.1978. **Levantamento dos Recursos Naturais**. DNPM/Projeto RADAMBRASIL, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.** n. 43, p. 439-463. 1992.

REIS, M. S. Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: L.C. Di Stasi, (org.). **Plantas Medicinais: arte e ciência - um guia multidisciplinar**. São Paulo, Ed. Unesp. pp. 199-215. 1996.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. A.C.; SILVA, C. F. C.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO L. C. **Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus, INPA. 1999.

RICHARDSON, J. E.; FAY, M. F.; CRONK, Q. C. B.; BOWMAN, D.; CHASE, M. W. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. **Amer. J. Bot.** v. 87, n. 9, pp. 1309-1324. 2000.

RIZZINI, C. T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Âmbito Cultural Edições LTDA, Rio de Janeiro. 1997.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.

1, p. 499-514, 1973.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVES, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-714.

ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; DUARTE, F. V. Conservação *in vitro* de *Aechmea multiflora*. 2009. Jornada da EMBRAPA. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/jornada/resumos/Resumo\\_MoemaACR\\_FernandaVDS\\_rev\\_JR\\_ED\\_\\_\\_\\_.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/jornada/resumos/Resumo_MoemaACR_FernandaVDS_rev_JR_ED____.pdf)

ROCHA, S. F. R. E SCARDA, F. M. (eds). 2003. **Plantas Medicinais: etnobotânica na várzea do Mamirauá**. SEBRAE, Amazonas.

ROIG Y MESA, J. T. **Diccionario Botanico de nombre vulgares Cubanos**. Habana: Ed. Científico-tecnica, 1988, v. 1 (A-L), 599 p.; vol. 2 (Li-Z), 1142 p.

RORIG, L. R.; POSSER, G. L. Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 72, n. 1, p. 15-17, 1991.

ROUT, G.R.; DAS, P. *In vitro* organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **J Herbs Spices Medicinal Plants**, v. 44, p. 41-51, 1997.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 2, p. 91-120, 2000.

SABA, R. T; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 106-109. 2002.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAKHANOKHO, H. F.; KELLEY, R. Y. Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 8, pp. 1474-1481. 2009.

SALA-NETO, F.; DA SILVA, J. S.; PIRES, R. O.; NASCIMENTO, N. P.; BRENNER, C.; BOUBLI, J. P.; TOSTA, C. E. **Uma nova metodologia para avaliação da atividade Antimalárica de Produtos Vegetais: Aplicação ao Estudo de 83 Espécies da Flora Brasileira**. Anais do 2º Simpósio de Malária. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 25, supl. II, p. 92, 1992.

SANTANA, J.R.F. de. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SANTOS, A. M. S. KAHWAGE, C. C.; FERREIRA, M. R. C. F; SAMPAIO, N. A. Medicinas tradicionais no vale do rio Negro (Amazonas, Brasil). Observações sobre etnofarmacologia e o uso da planta saracura-mirá (*Ampelozizyphus amazonicus*): atividade farmacológica e/ou eficácia simbólica. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi**, ser.

Ciências Humanas, v. 1, n. 1, p. 137-147. 2005.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (edição especial), p.70-84, 2000.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 60-65, 2001.

SAXENA, C.; ROUT, G.R.; DAS, P. Micropropagation of *Psoralea corylifolia* Linn. **J Med Aromatic Plant Sci**, v. 20, p. 15-18, 1998.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAÚJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIRÓZ, M. A.; GODERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semiárido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpsa.embrapa.br>>. Acesso em: 27/10/2008.

SCHWERTNER, A. B. S.; NAGAO, E. O.; HIDALGO, A. F.; ZAFFARI, G. R.. Efeito do 6- benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação invitro da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.10, n.1, p.76-81, 2008.

SHIBLI, R. A.; MOHAMAD, A. S.; WALID, S. S.; MOHAMMED, M. A. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A Review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 24, pp. 372-382. 2006.

SHORT, K.C.; ROBERTS, A.V., *Rosa* spp (Roses): *in vitro* culture, micropropagation and production of secondary products. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.), 1991. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 15, Medicinal and Aromatic Plants. III, Springer Verlag, Berlin, 1991. p. 376-397.

SILVA, C. F. N. ; NAGAO, E. O. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de cerveja do Índio (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal utilizada na prevenção da malária. In: I Jornada Amazonense de Plantas Medicinais, 2005, Manaus. I Jornada Amazonense de Plantas Medicinais, 2005.

SILVA, D. B.; WETZEL, M. M. V. S.; SALOMÃO, A. N.; FAIAD, M. G. R.; Conservação de germoplasma sementes em longo prazo. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 441-471, 2007.

SILVA, K. E.; MARTINS, S. V.; SANTOS, N. T.; RIBEIRO, C. A. A. S. Padrões espaciais de espécies arbóreas tropicais. In: MARTINS, S. V. (Ed.) **Ecologia de florestas tropicais do Brasil**. Viçosa: Editora UFV, pp. 216-244. 2009.

SILVA, M. F.; LISBÔA, P. L. B.; LISBÔA, R. C. L. **Nomes vulgares de plantas Amazônicas**. Manaus: INPA, 1977. 222 p.

SILVA, T. L. **Micropropagação, indução da calogênese e estratégias de conservação ex situ DE *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C.DC. por técnicas de**

**crecimento mínimo e temperaturas subzero e criogênicas.** 2010. 153 f. ils. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Área Agrofloresal). Universidade Federal do Amazonas.

SIPAM/SIVAM/INPE. Bases de dados online. 2008. Acesso em 22 abril de 2010. Disponível em: <<http://www.inpe.gov.br>>

SMITH, M. A. L.; KOBAYASHI, H.; GAWIENOWSKI, M.; BRISKIN, D. P. An *in vitro* approach to investigate medicinal chemical synthesis by three herbal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 105-111, 2002.

SOLLINS, P. Factors influencing species composition in tropical lowland rain forest: does soil matter? **Ecology**, v. 79, n.1, p. 23-30. 1988.

SOLTIS, P. A.; D. E; SOLTIS; M. W. CHASE. 1999. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. **Nature**, v.402, p. 402-404.

SOUZA, E. L. S. **Conservação de germoplasma *in vitro***. In: ARAÚJO, S. M. C.; OSUNA, J. A. (Ed.). In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Unesp, 1988. p. 96-101.

STROBEL, N. E.; KUC, A. Chemical and biological inducers of systemic acquired resistance to pathogens protect cucumber and tobacco from damage caused by paraquat and cupric chloride. **Phytopathology**, v. 85, p. 1306 - 1310, 1995.

SUESSENGUTH, K. Rhamnaceae. In: ENGLER A.; PRANTIL, K. **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**. Berlin. 1953. 173p.

TUCKER, S. C. Inflorescence and Flower Development in the Piperaceae III. Floral Ontogeny of *Piper*. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 9, p.1389-1401, 1972.

VALADARES, M. C.; REZENDE, K.R.; PEREIRA, E. R. T.; SOUSA, M. C.; GONÇALVES, B.; ASSIS, J. C.; KATO, M. J. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1975-1978. 2007.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. DE; VALADARES-INGLIS, M.A. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-55.

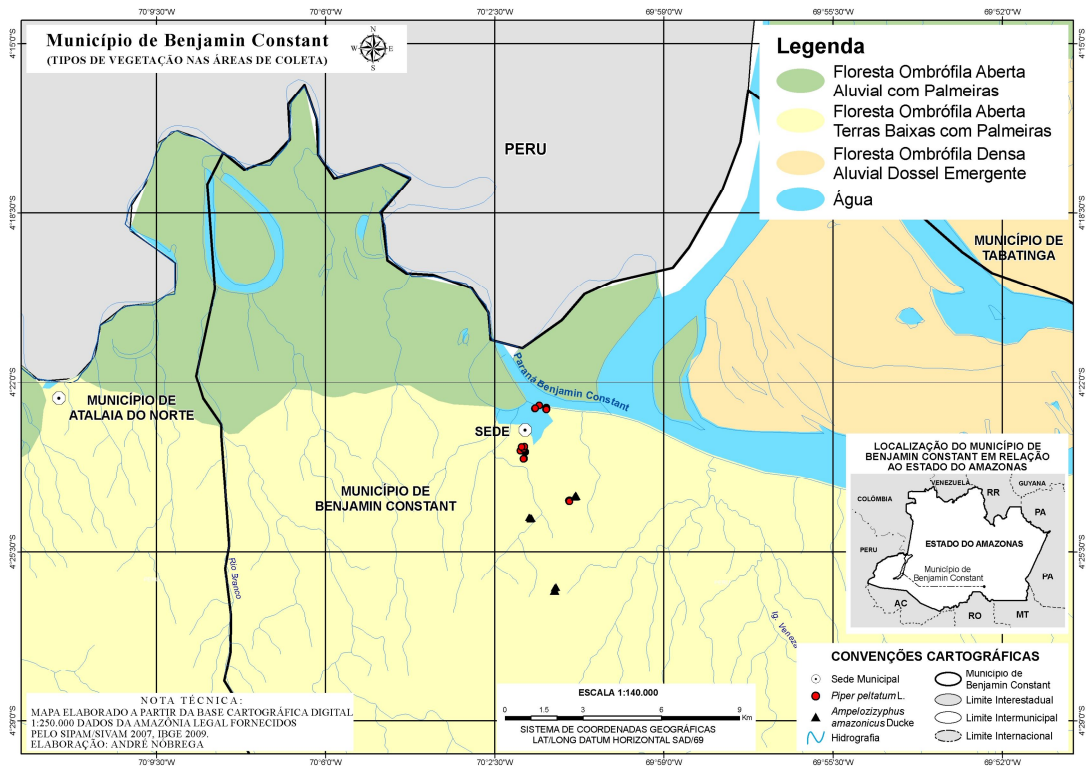
VAN DEN BERG, M. E. Piperaceae. In: VAN DEN BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia - contribuição ao seu conhecimento sistemático**. 2 ed. Belém: PR/MCT/CNPq, 1993. p. 58-133.

VELOSO, H P. Sistema fitogeográfico. In: IBGE (Ed.). **Manual técnico da vegetação brasileira**. Série Manuais Técnicos em Geociências, v. 1. Brasília: IBGE. 1992. p. 8-38.

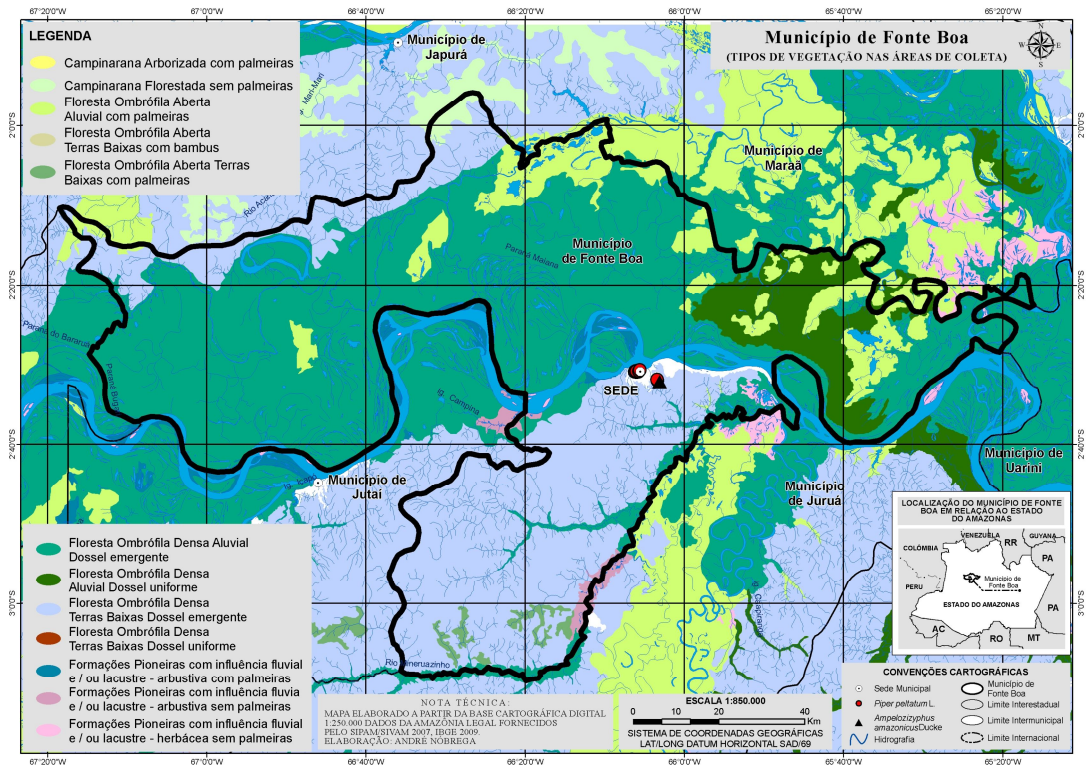
VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. IBGE, Rio de Janeiro. 1991.

- VIEGAS, J. R.; C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337. 2006.
- VILLALOBOS, V. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. **Biotech Advances**, v. 9, p. 197-215, 1991.
- WADT, L.H.O. ; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of 'Pimenta Longa' genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p.74-82, 2004.
- WANKE, S.; JARAMILLO, M. S.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S. QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales—matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, p. 477-497, 2007.
- WETZEL, M. M. V. S.; SILVA, D. B.; GOEDERT, C. O.; NETO, L. G. P. Conservação de germoplasma-semente a longo prazo no Brasil. **Magistra**, v. 19, n. 4, p. 393-398, 2007.
- WILKINS, C. P.; NEWBURY, H. J.; DODDS, J. H. Tissue culture conservation of fruit trees. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 1, n. 73/74, p. 9-20, 1988.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p. 297-330.
- YUNCKER, T. G. 1972. The Piperaceae of Brazil I: Piper - Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, v. 2, p.19-366.
- YUNCKER, T. G. 1973. The Piperaceae of Brazil II: Piper - Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorhachis*. **Hoehnea**, v. 3, p. 29-284.
- YUNCKER, T. G. 1975. The Piperaceae of Brazil IV: Index. **Hoehnea**, v. 5, p. 123-145.
- ZEE, F. T.; MUNEKATA, M. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas* spp.) germplasm. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 1, p. 57-58, 1992.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sanest - sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPel, SEI, 138p., 1984.

## **ANEXOS**

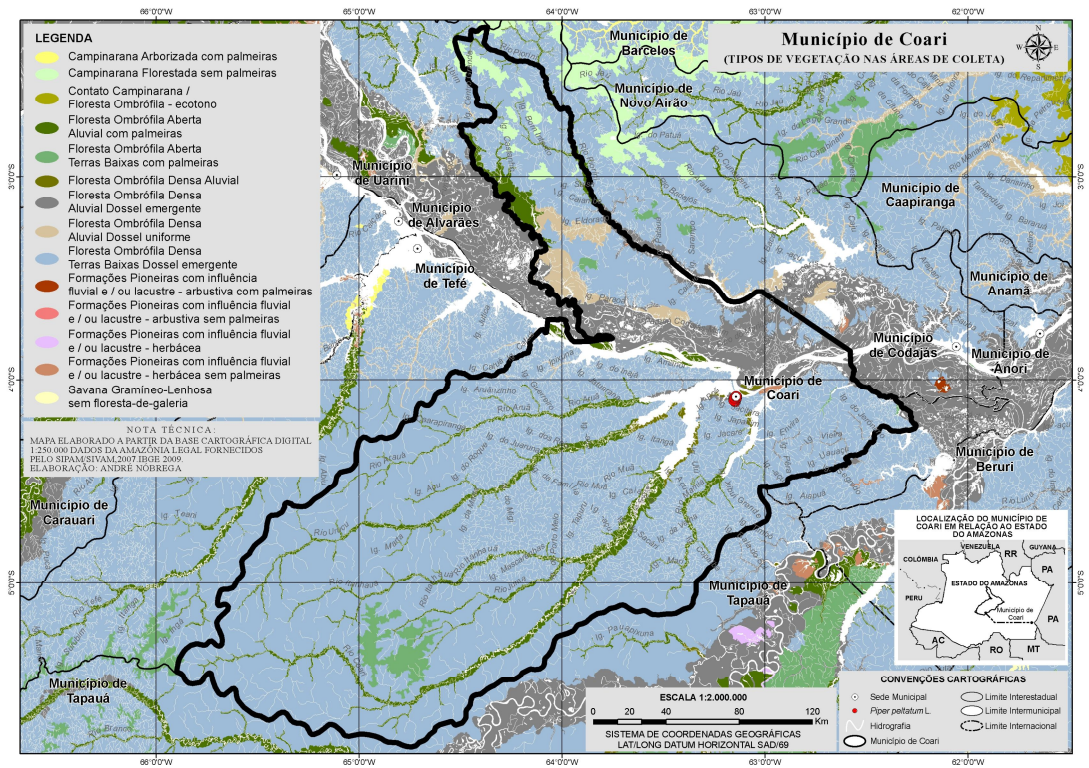


**Anexo 1:** Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Benjamin Constant, Amazonas, Brasil.

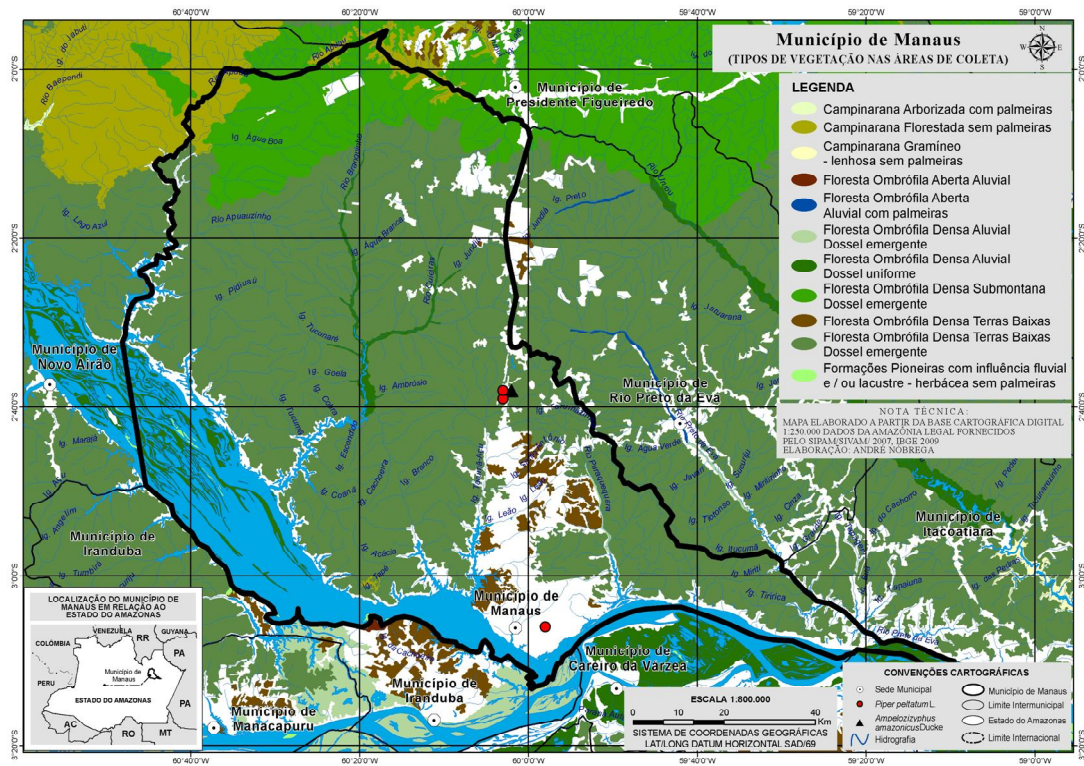


Anexo 2: Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Fonte Boa, Amazonas, Brasil.

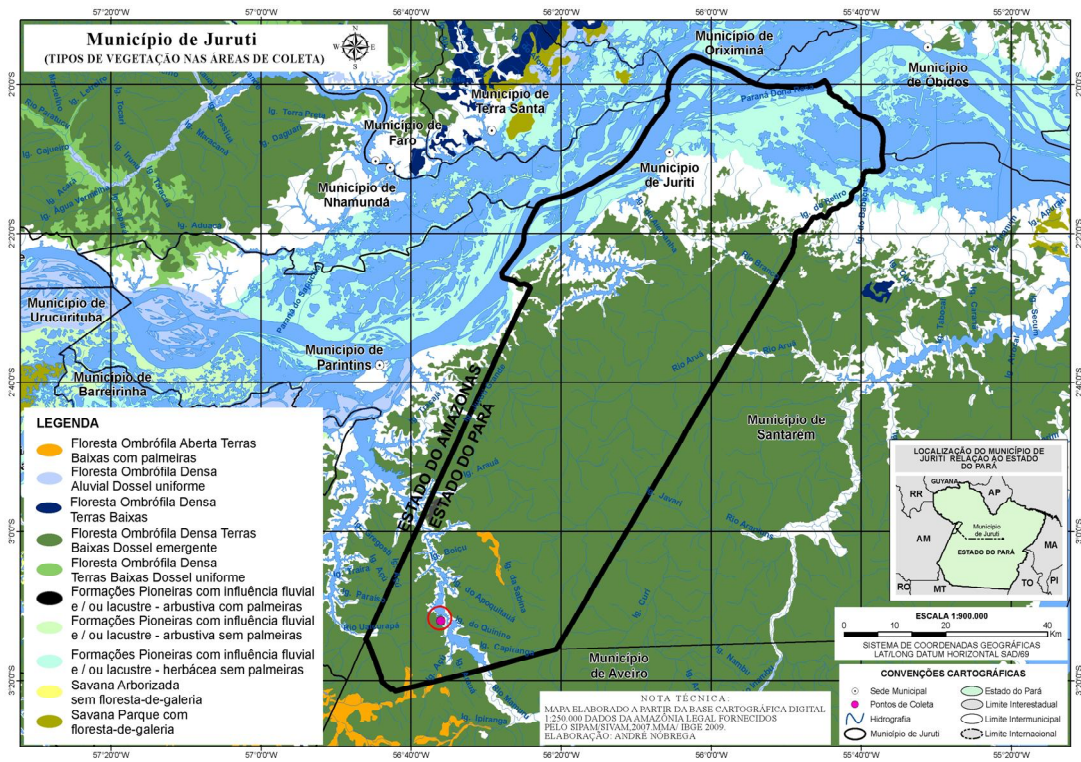




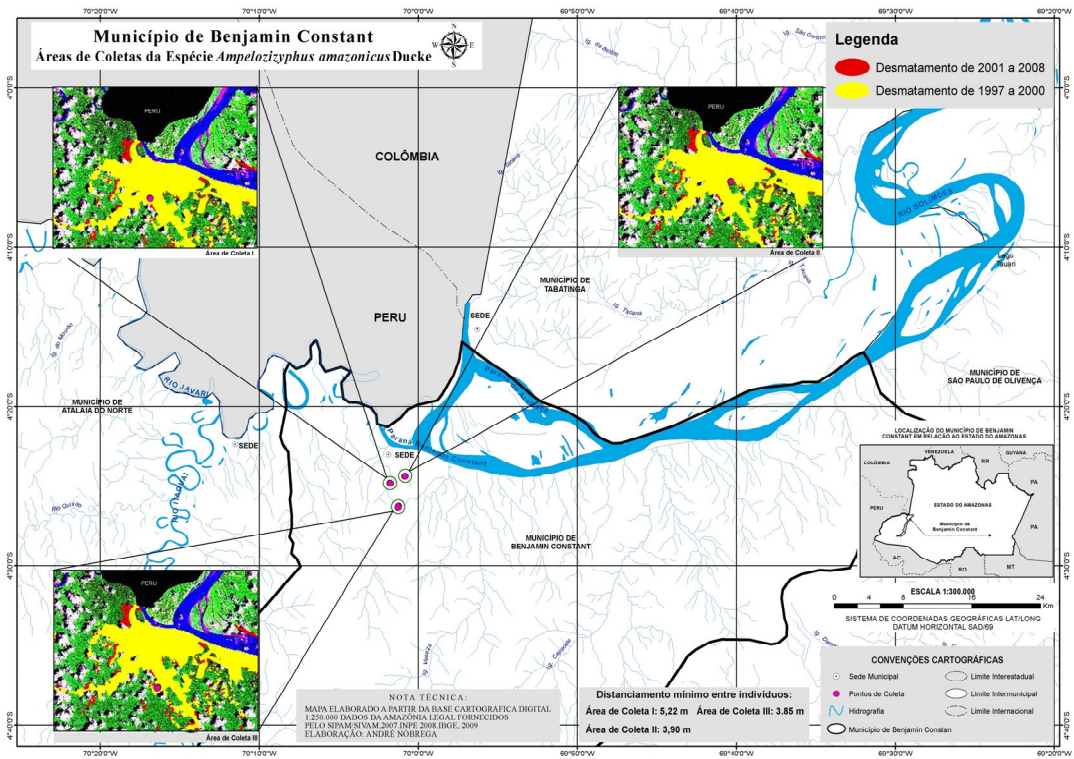
Anexo 3: Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Coari, Amazonas, Brasil.



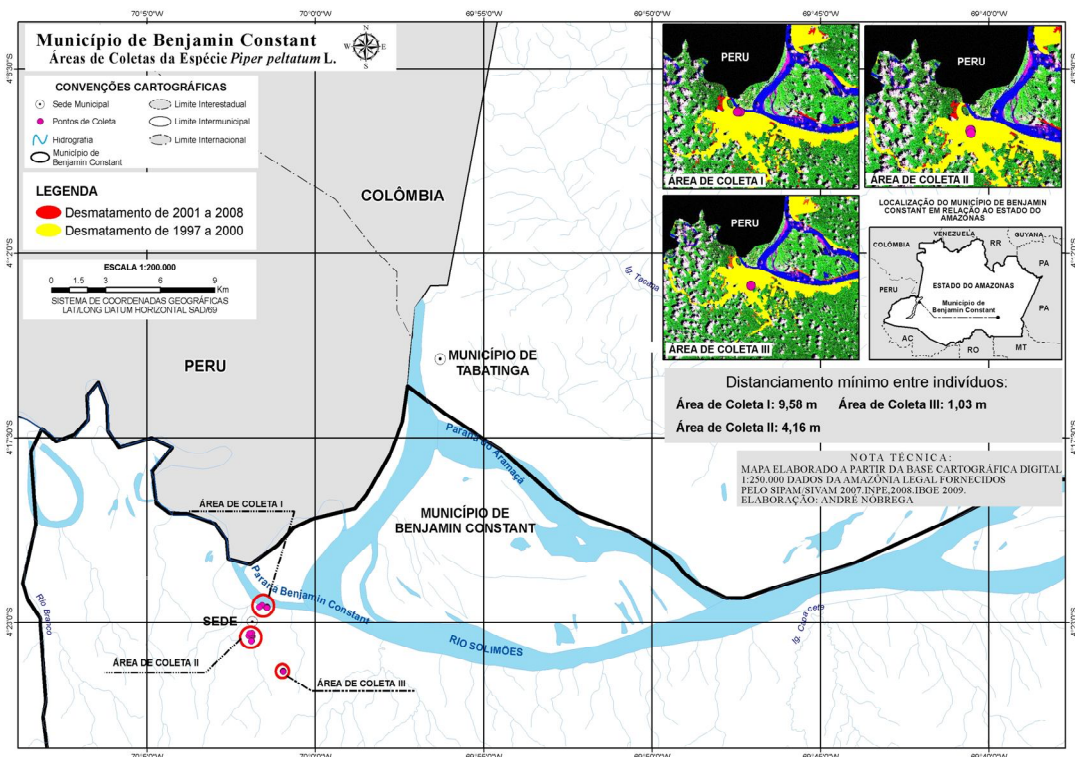
**Anexo 4:** Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Manaus, Amazonas, Brasil.



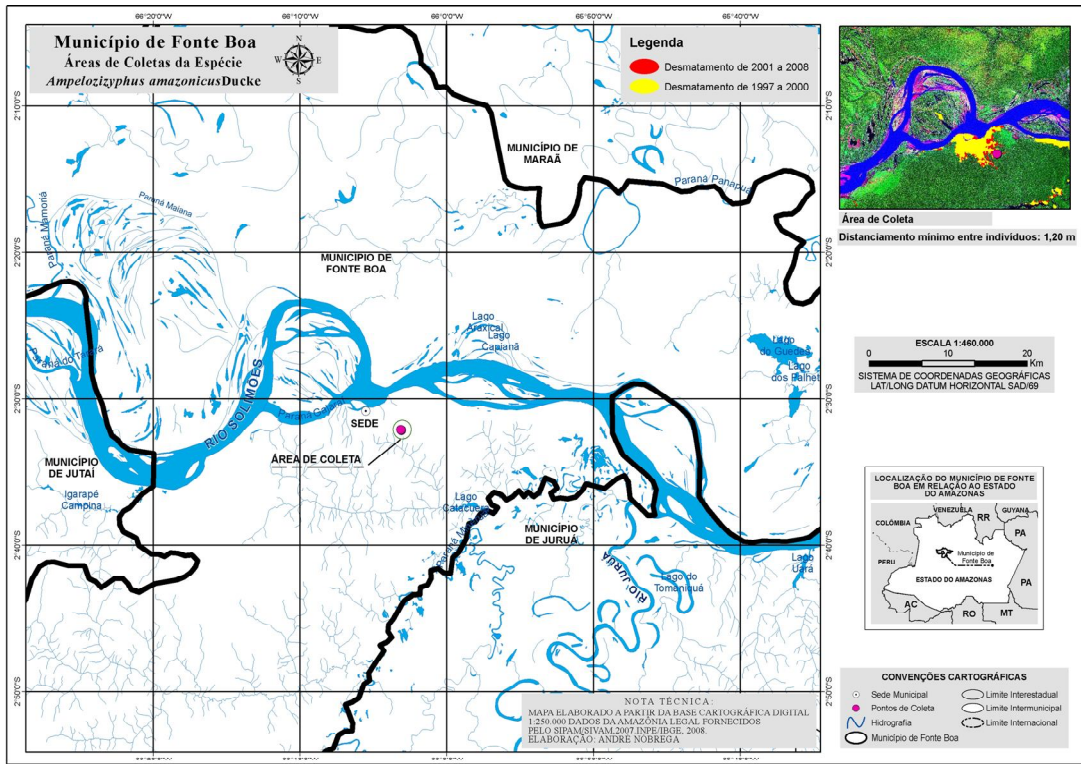
Anexo 5: Tipos de vegetação nas áreas de coleta no município de Juruti, Pará, Brasil.



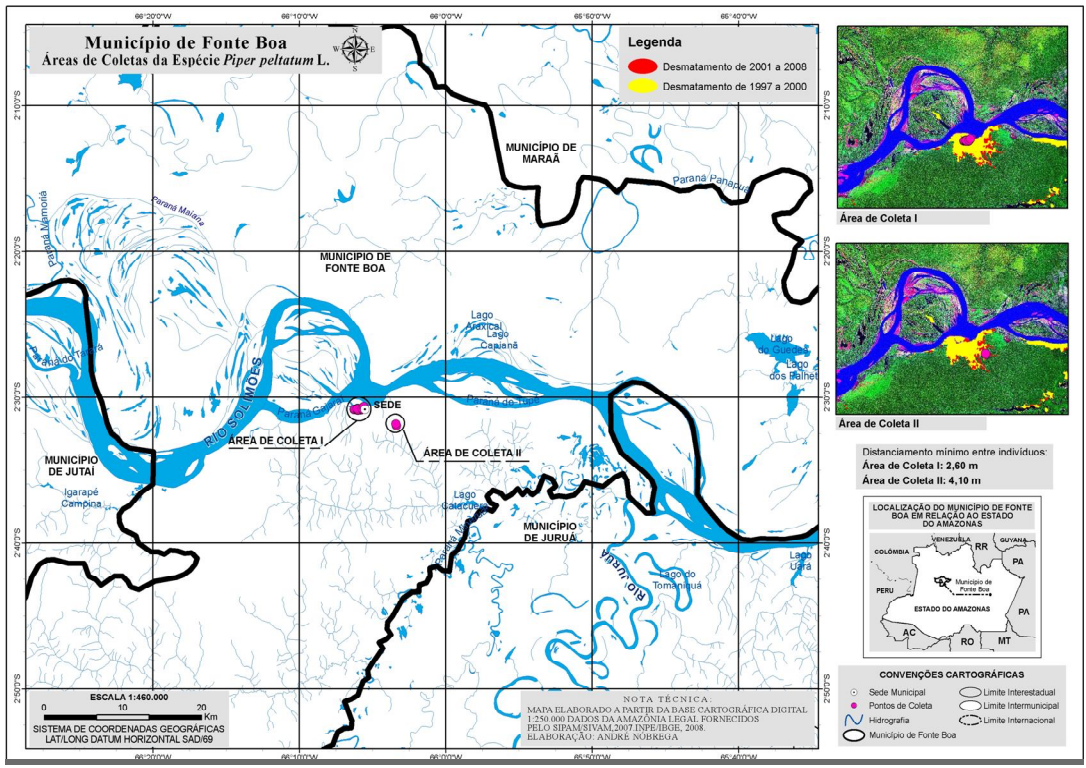
**Anexo 6:** Localização das áreas de coleta de *A. amazonicus* no município de Benjamin Constant, AM, Brasil.



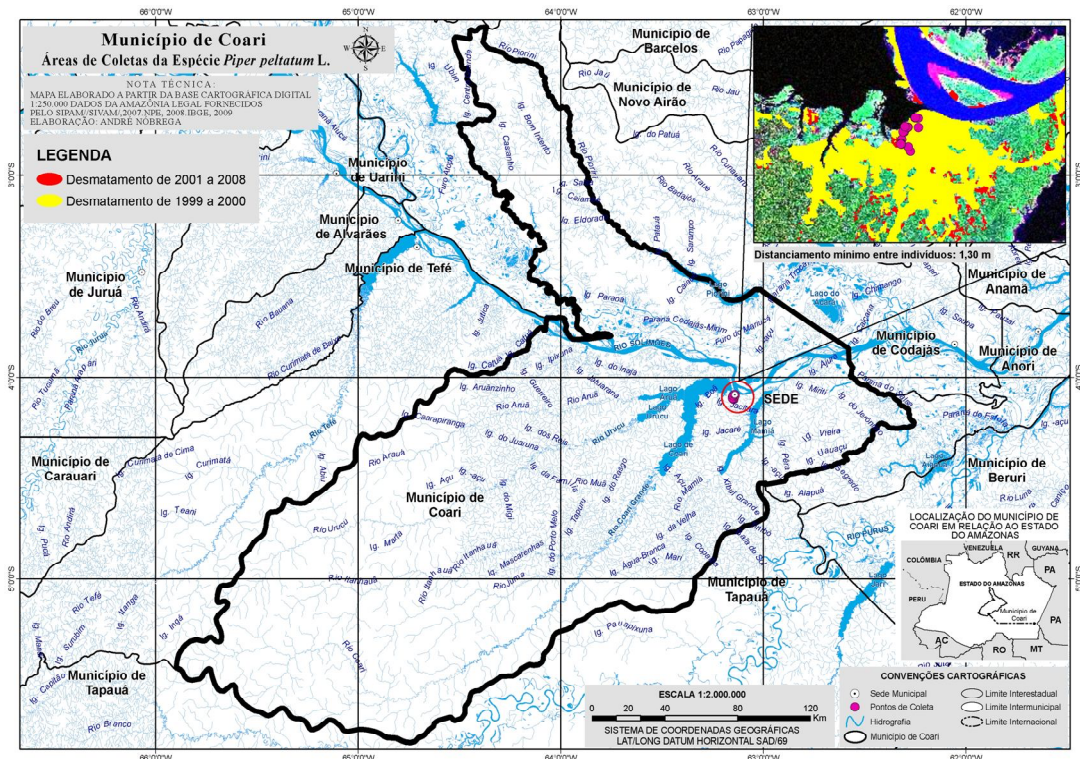
**Anexo 7:** Localização das áreas de coleta de *P. peltatum* no município de Benjamin Constant, AM, Brasil.



**Anexo 8:** Localização das áreas de coleta de *A. amazonicus* no município de Fonte Boa, AM, Brasil.

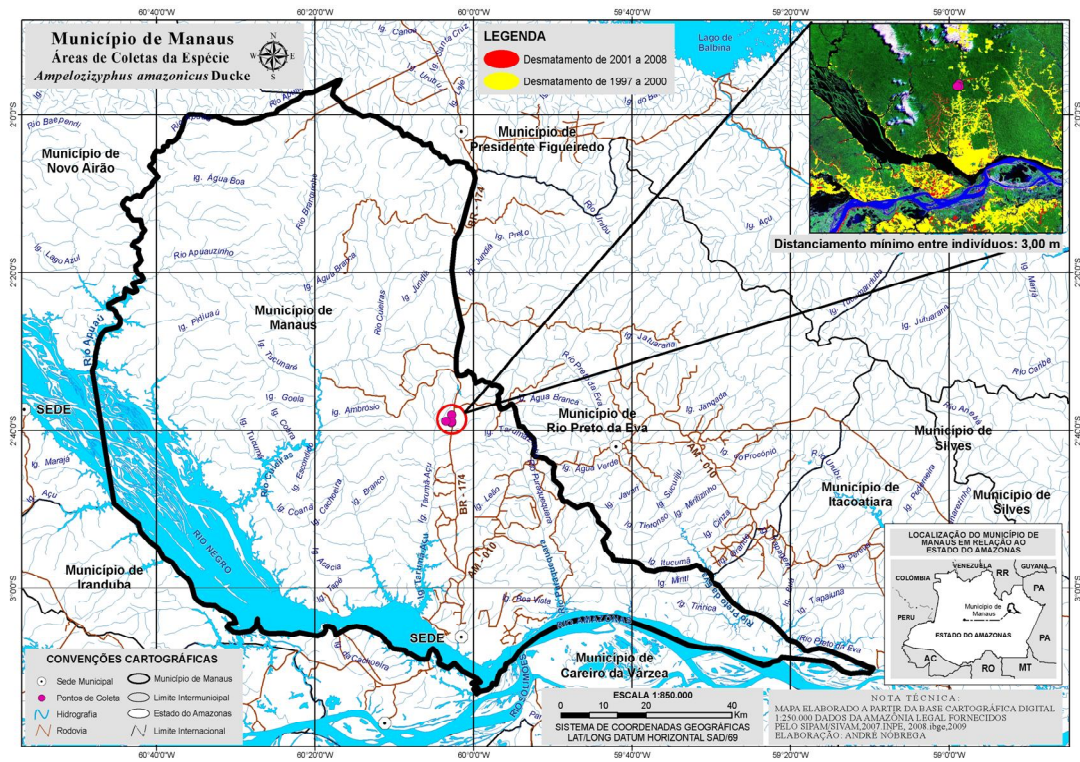


**Anexo 9:** Localização das áreas de coleta de *P. peltatum* no município de Fonte Boa, AM, Brasil.

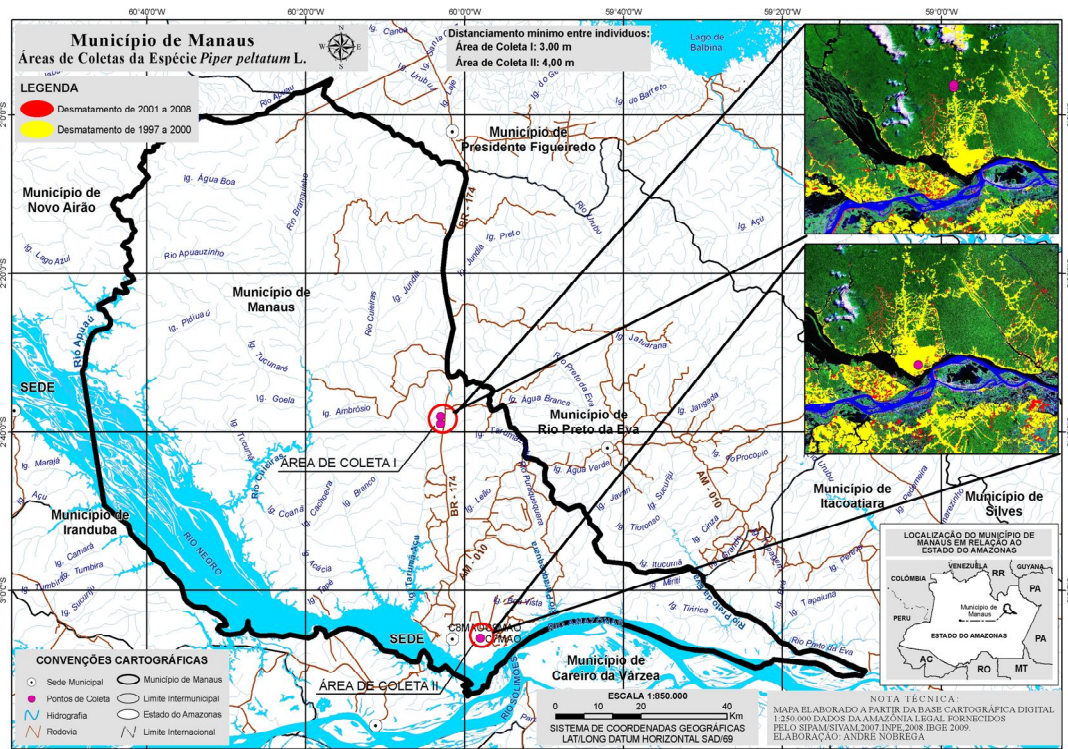


**Anexo 10:** Localização das áreas de coleta de *P. peltatum* no município de Coari, AM, Brasil.

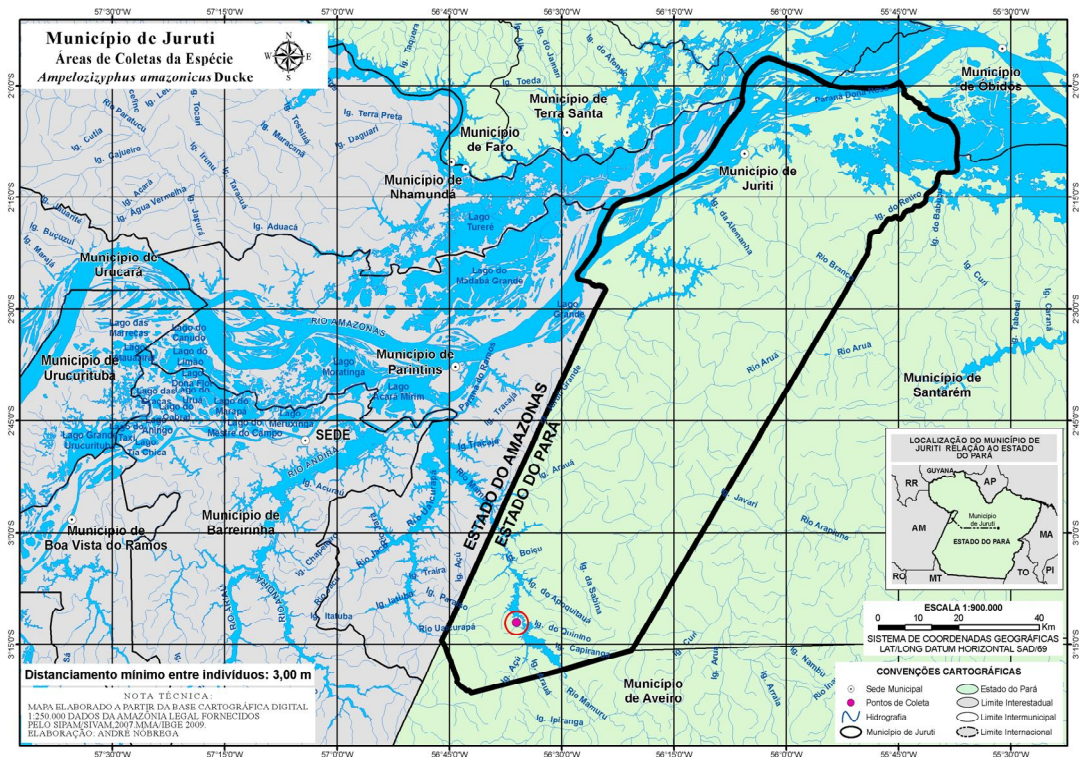




**Anexo 11:** Localização das áreas de coleta de *A. amazonicus* no município de Manaus, AM, Brasil.



**Anexo 12:** Localização das áreas de coleta de *P. peltatum* no município de Manaus, AM, Brasil.



**Anexo 13:** Localização das áreas de coleta de *A. amazonicus* no município de Juruti, PA, Brasil.

**Anexo 14:** Tabela dos resultados da conservação *in vitro* de microestacas de *P. peltatum* sob diferentes temperaturas durante 180 dias.

Temperatura de conservação	Sobrevivência (%)			Altura de brotos (cm)			Número de gemas			Número de folhas		
	Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura		
	MS	MS1/2	MÉDIA	MS	MS1/2	MÉDIA	MS	MS1/2	MÉDIA	MS	MS1/2	MÉDIA
10 °C	4,3bB	25,0bA	14,6b	2,9aA	2,2bB	2,6a	2,0bA	1,4bA	1,7b	2,0bA	2,4bA	2,2b
20 °C	62,0aB	98,9aA	80,4a	3,1aA	2,9bA	3,0a	4,0aA	4,5aA	4,2a	5,1aB	6,9aA	6,0a
25 °C	16,5bB	98,9aA	57,7a	1,4bB	3,7aA	2,5a	2,6bB	5,4aA	4,0a	2,8bB	7,9aA	5,3a
Média de meio de cultura	27,6B	74,3A		2,5B	2,9A		2,9B	3,8A		3,3B	5,7A	
<i>F</i> (A: Meio de cultura)	24,5557**			6,7747*			8,0781**			53,9138**		
<i>F</i> (B: Temperaturas):	14,1590**			2,7829 <sup>NS</sup>			43,7119**			60,5512**		
<i>F</i> (A x B)	2,7808 <sup>NS</sup>			27,4778**			15,02212**			16,1879**		