



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

ELIANA DE SOUZA E SILVA

**EXTRATOS VEGETAIS NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
Epidendrum ibaguense KUNTH**

Boa Vista, RR
2014

ELIANA DE SOUZA E SILVA

**EXTRATOS VEGETAIS NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
Epidendrum ibaguense KUNTH**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Recursos Naturais do Programa de Pós-graduação - PRONAT da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais, na área de Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gardênia Holanda Cabral

Boa Vista, RR
2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ramiro e Ana Maria e as
minhas filhas Carolina e Larissa por ser
minha razão de viver todos os dias.

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus pela oportunidade e privilégio de ter permitido chegar até aqui e em todos os momentos de minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, pela oportunidade.

A Profa. Dra Gardênia de Holanda Cabral, pela acolhida como sua orientanda, pela confiança, ensinamentos, orientação crítica, paciência, amizade e incentivos.

Ao Prof. Dr. Marcos Vital, pela ajuda, pelo seu profissionalismo e orientação no decorrer do trabalho.

Ao Prof. Henrique Eduardo Bezerra da Silva pela excelente contribuição na análise dos extratos.

A Profa Dra Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes, pelo incentivo e colaboração na elaboração do início projeto de pesquisa deste trabalho.

A Profa Dra Simone da Silva pelos seus ensinamentos na cultura de tecidos vegetal.

Aos todos os professores do Programa de Pós-graduação, pelos seus ensinamentos.

As minhas amigas Gilzonea Veloso Costa, Gilzeni Veloso e Laylah Roberta, pela ajuda constante, pelos momentos de alegria, companheirismo, tristezas e amizade que passamos juntas.

Aos colegas de turma pela amizade.

A mestranda Andréia Alencar pela contribuição no capítulo sobre contaminação microbiológica e aos amigos do Laboratório de Microbiologia, Ana, Daniele, Eliane, pela grande ajuda profissional.

A Natália Cristina, secretária eficiente, prestativa, por ajudar nas questões burocráticas.

Com um carinho todo especial aos meus pais Ramiro Francisco da Silva e Ana Maria de Souza e Silva e as minhas filhas Carolina e Larissa Santana, pela ajuda e compreensão de minha ausência em suas vidas.

Aos amigos e pessoas que embora não citadas colaboraram e incentivaram, para que este trabalho fosse cumprido.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

RESUMO

A micropropagação de orquídeas é uma técnica utilizada com vários objetivos, podendo-se destacar a multiplicação rápida de plantas, propagação de novos híbridos, produção em larga escala e obtenção de matrizes livres de patógenos. A utilização de extratos naturais com ação antimicrobiana na micropropagação mostra-se como uma forma alternativa, ecológica e econômica de obtenção de plantas isentas de micro-organismos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de extratos de *Allium sativum* (alho), de *Syzygium aromaticum* (cravo) e de própolis para evitar a contaminação com micro-organismos durante o processo de subcultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* Kunth e as possíveis interferências desses extratos no desenvolvimento vegetativo das plântulas. Foram isolados e identificados os micro-organismos *Aspergillus* sp., *Candida* sp., bactéria Gram-negativa, bactéria Gram-positiva e *Penicillium* sp. presentes em frascos com meio de cultura contaminados, oriundos do cultivo *in vitro* e do ambiente. Avaliou-se a ação antimicrobiana dos extratos sobre os micro-organismos isolados e observou-se que, o extrato de cravo inibiu o crescimento dos mesmos. Foram utilizados sete tratamentos compostos pelo meio Murashige; Skoog (1962) com metade da concentração de macronutrientes, acrescido de carvão vegetal e dos extratos de alho a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ (T1), alho a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ (T2), cravo a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ (T3), cravo a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ (T4), própolis a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ (T5), própolis a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ (T6) e o controle (T7) em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições e três plântulas por repetição. Após sessenta dias do subcultivo nos meios com os extratos avaliou-se a altura da parte aérea, o comprimento da maior raiz, o número de raízes, o número folhas, o comprimento da maior folha, o peso da massa fresca, o peso da massa seca e a taxa de multiplicação das plântulas. Houve influência dos extratos de alho, cravo e própolis no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *E. ibaguense*. O extrato de cravo apresentou ação antimicrobiana frente aos micro-organismos *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Escherichia coli*, *Penicillium* sp. e *Streptococcus pneumoniae*. Já os extratos de alho e própolis não demonstraram atividade antimicrobiana sobre nenhuma das cepas testadas. Através deste trabalho foi possível estabelecer um protocolo para o cultivo *in vitro* de *E. ibaguense* visando o controle da contaminação.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Extratos naturais. Micropropagação. Orquídeas. Contaminação. Oxidação

ABSTRACT

The micropropagation of orchids is a technique used for various purposes, may be noted the rapid multiplication of plants, propagation of new hybrid, large-scale production and obtaining free arrays of pathogens. The use of natural extracts with antimicrobial activity in micropropagation shows up as an alternative, environmentally friendly and economical way to obtain plants free of microorganisms. This study aimed to evaluate the use of extracts of *Allium sativum* (garlic), *Syzygium aromaticum* (clove) and propolis to prevent contamination with micro-organisms during the process of *in vitro* subculture of *Epidendrum ibaguense* Kunth and the possible interference of these extracts on vegetative growth of seedlings. The microorganisms *Aspergillus* sp. *Candida* sp. Gram-negative bacteria, Gram-positive and *Penicillium* sp. present in the contaminated bottles with culture, derived from *in vitro* culture and the environment, were isolated and identified. We evaluated the antimicrobial activity of the extracts on the isolated microorganisms and it was observed that the extract of clove inhibited their growth. Seven compound treatments were used by Murashige; Skoog (1962) with half the concentration of macronutrients, plus charcoal and garlic extracts to 1.0 mgL⁻¹ (T1), garlic 0.5 mgL⁻¹ (T2), cloves 1.0 mgL⁻¹ (T3), cloves 0.5 mgL⁻¹ (T4), propolis to 1.0 mgL⁻¹ (T5), propolis 0.5 mgL⁻¹ (T6) and control (T7) on a randomized complete randomized with five replications and three seedlings per replication. Sixty days of subculture in the media with the extracts evaluated the shoot height, the length of roots, number of roots, leaves number, the length of the longest leaf, the weight of the fresh weight, the weight of the mass drought and the multiplication rate of the seedlings. There were significant effects of the extracts of garlic, clove and propolis in the development of *in vitro* plantlets of *E. ibaguense*. Clove extract showed antimicrobial activity against microorganisms *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Escherichia coli*, *Penicillium* sp. and *Streptococcus pneumoniae* and the extracts of garlic and propolis showed no antimicrobial activity against any of the tested strains. Through this work, it was possible to establish a protocol for the *in vitro* cultivation of *E. ibaguense* for the contamination control.

Key words: Tissue culture. Natural extracts. Micropropagation. Orchids. Contamination. Oxidation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ocorrência de <i>Epidendrum ibaguense</i> no Brasil.....	18
Figura 2 -	Ocorrência de <i>Epidendrum ibaguense</i> no Estado de Roraima	19
Figura 3 -	Orquídea <i>Epidendrum ibaguense</i> identificada e depositada no Herbário do CBio da UFRR.....	28
Figura 4 -	Desinfestação do fruto de <i>E. ibaguense</i> com detergente líquido e álcool a 70%.....	29
Figura 5 -	Cepas utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de alho, cravo e própolis.....	36
Figura 6 -	Efeito dos extratos de alho, cravo e própolis adicionados ao meio de cultura MS na taxa de multiplicação de plântulas de <i>Epidendrum ibaguense</i> subcultivadas dentro da câmara de fluxo laminar (DCFL)	42
Figura 7 -	Efeito dos extratos de alho, cravo e própolis adicionados ao meio de cultura MS na taxa de multiplicação de plântulas de <i>Epidendrum ibaguense</i> subcultivadas fora da câmara de fluxo laminar (FCFL)....	42
Figura 8 -	Contaminação microbiana de uma plântula de <i>E. ibaguense</i> subcultivada em meio de cultura MS adicionado de extrato de cravo 0,5 mgL ⁻¹	46
Figura 9 -	Micro-organismos isolados e identificados dos frascos com meio de cultura contaminado e de áreas do Laboratório de Substâncias Bioativas do PRONAT.....	46
Figura 10 -	Ação do extrato de cravo em diferentes cargas contra o crescimento da cepa <i>Penicillium</i> sp.....	48
Figura 11 -	Concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de cravo contra a cepa de <i>Aspergillus</i> sp. contaminante de meio de cultura.....	49
Figura 12 -	Concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de cravo contra a cepa de <i>Penicillium</i> sp. contaminante de meio de cultura...	49
Figura 13 -	Ação dos discos impregnados com cravo sobre a cepa <i>Penicillium</i> sp.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições para separação por cromatografia gasosa (CG).....	31
Tabela 2 -	Meio de cultura MS com carvão acrescido de extrato de alho, cravo e própolis para os testes de desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum ibaguense</i> dentro e fora da câmara de fluxo laminar.....	33
Tabela 3 -	Efeitos dos extratos de alho, cravo e própolis no desenvolvimento de <i>E. ibaguense</i> subcultivado dentro da câmara de fluxo laminar, após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	39
Tabela 4 -	Efeitos dos extratos de alho, cravo e própolis no desenvolvimento de <i>E. ibaguense</i> subcultivado dentro da câmara de fluxo laminar, após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	39
Tabela 5 -	Resultado da análise dos extratos de alho, cravo e própolis através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	44
Tabela 6 -	Ação dos extratos de alho, cravo e própolis em diferentes cargas contra o crescimento de cepas de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>S. pneumoniae</i>	47

LISTA DE SIGLAS

g	Gramma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
UFRR	Universidade Federal de Roraima
PRONAT	Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
APA	Altura da parte aérea
CMR	Comprimento da maior raiz
CMF	Comprimento da maior folha
NF	Número de folhas
NR	Número de raízes
PF	Peso fresco
MS	Massa seca
MIC	Concentração Inibitória Mínima
CBio	Centro de Estudos de Biodiversidade
NPPGCT	Núcleo de Pesquisa e Pós-graduação em Ciências e Tecnologia
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
WFCC	World Federation for Culture Collections
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
NUREN	Núcleo de Recursos Naturais
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CG/EM	Cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massas
DCFL	Dentro da câmara de fluxo laminar
FCFL	Fora da câmara de fluxo laminar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	As orquídeas.....	15
1.2	Importância econômica das orquídeas.....	16
1.3	<i>Epidendrum ibaguense</i>	17
1.4	Cultivo <i>in vitro</i> ou cultura de tecidos vegetais.....	20
1.5	Meios utilizados no cultivo <i>in vitro</i>	21
1.6	Contaminação microbiana no cultivo <i>in vitro</i>	22
1.7	Extratos com atividade antimicrobiana.....	23
1.7.1	<i>Allium sativum</i>	24
1.7.2	<i>Syzygium aromaticum</i>	25
1.7.3	Própolis	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Escolha da espécie.....	28
3.2	Origem do fruto.....	28
3.3	Desinfestação do fruto e semeadura <i>in vitro</i>	29
3.4	Meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962)	30
3.5	Obtenção dos extratos	30
3.6	Preparação dos tratamentos e delineamento experimental.....	31
3.7	Avaliação do crescimento.....	34
3.8	Testes de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos de alho, cravo e própolis.....	34
3.8.1	Isolamento dos micro-organismos.....	34
3.8.2	Identificação dos micro-organismos isolados.....	35
3.8.3	Micro-organismos utilizados no bioensaio.....	35
3.8.4	Concentração inibitória mínima (MIC).....	36
3.8.5	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Efeito dos extratos sobre o desenvolvimento das plântulas.....	38
4.2	Perfil fitoquímico dos extratos de alho, cravo e própolis.....	43
4.3	Atividade antimicrobiana dos extratos.....	45
5	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica e a região Amazônica são consideradas os principais *habitats* brasileiros das orquídeas, onde estão presentes espécies endêmicas de relevante valor ornamental e comercial, segundo Almeida et al. (2012). E em decorrência da beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas apresentam elevado valor econômico como planta ornamental, com destaque, ainda, para sua importância na indústria medicinal, alimentícia e de cosméticos (VENTURA, 2007).

As orquídeas vêm sofrendo ação antrópica em razão de seu potencial econômico e ornamental. Haja vista que sua multiplicação por vias naturais é demorada, algumas espécies de orquídeas estão ameaçadas de extinção. Na natureza, a propagação das orquídeas ocorre pela proliferação de mudas laterais ou disseminação natural das sementes, produzidas em frutos ou cápsulas (COSTA et al., 2013).

No Brasil já foram catalogadas mais de 3.500 espécies de orquídeas, no entanto grande parte delas estão correndo risco de extinção devido à destruição de seus habitats e às coletas predatórias (UNEMOTO et al., 2007; COLOMBO et al., 2004). Constantemente espécies animais e vegetais entram na lista de ameaçadas de extinção ou são extintas devido ao impacto da destruição dos habitats pelo homem, portanto devemos estudar estratégias que possam contribuir para a perpetuação das mesmas. Outro fator relevante é que as orquídeas sinalizam quando o meio ambiente está em processo de degradação, podendo ser utilizadas como bio-indicadores ambientais.

Para ambientes em recuperação é interessante desenvolver técnicas de propagação *in vitro* de orquídeas para reintroduzi-las na natureza ou para produção em larga escala, o que poderá diminuir o impacto da sua retirada das áreas de ocorrência. A micropropagação de orquídeas tem sido utilizada no Brasil há pouco mais de 25 anos, com o objetivo principal de aumentar a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para salvar muitas espécies da extinção (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

A técnica de cultura de tecidos oferece uma excelente ferramenta de multiplicação vegetativa, pois permite a reprodução rápida de plantas com características superiores e condições genéticas e sanitárias garantidas. Diversas técnicas de cultura de tecidos são aplicadas industrialmente como alternativas

economicamente viáveis e vêm sendo utilizadas com sucesso na propagação de plantas ornamentais (COSTA et al., 2013).

O aumento da procura por orquídeas leva os produtores a comprarem mudas de laboratórios especializados. E os investimentos empregados em materiais, infraestrutura e mão-de-obra especializada levam tais organizações produtivas a minimizar as perdas e a maximizar a utilização dos fatores envolvidos na produção. Cumpre salientar que não há um protocolo único para a propagação *in vitro* de orquídeas, devendo ser ajustado de acordo com o gênero, espécie e/ou variedade, dado que cada genótipo possui exigências únicas (COSTA et al., 2013; STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

Considerando o aquecimento do mercado de flores, principalmente de orquídeas, várias tecnologias avançadas e investimentos vultuosos são aplicados em decorrência deste fato. Entretanto, ocorrem algumas limitações no processo de cultivo *in vitro* referente à contaminação dos meios de cultura por fungos e bactérias, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas de assepsia e cultivo que garantam a limpeza sem comprometer a integridade dos explantes.

O uso de antibióticos é uma estratégia utilizada na cultura de tecidos de plantas e no âmbito agrônomo, apesar de existir a desconfiança em torno de seu uso, devido à indução de resistência plasmidial. Além disso, uma dosagem não exata de antibióticos pode provocar a morte do explante.

Atualmente a utilização de antibióticos é de uso restrito da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo comercializado somente sob prescrição médica, o que dificulta o acesso a essa classe de medicamentos. Portanto, há necessidade de se desenvolver protocolos de cultura de tecido por espécie de orquídea sem o uso de antibióticos, substituindo-os por extratos vegetais com atividade antimicrobiana.

Este trabalho estudou a utilização de extratos de plantas com ação antimicrobiana, no controle de micro-organismos presentes no subcultivo de *Epidendrum ibaguense* com o objetivo de acelerar o processo de multiplicação dessa orquídea em larga escala, tornando possível o desenvolvimento desta atividade econômica entre os produtores de orquídeas do estado de Roraima e da região amazônica.

1.1 As orquídeas

A família Orchidaceae constitui uma das maiores da classe Angiospermae, com aproximadamente 850 gêneros e 20.000 espécies (LORENZI; SOUZA, 2008), além de mais de 30.000 híbridos. E em todos os continentes e nos mais variados climas são encontradas orquídeas nativas, exceto nas regiões polares e nos desertos extremamente secos (FARIA et al. 2004).

Diversos gêneros de Orchidaceae são cultivados com fins de ornamentação tendo como destaque: *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium*, *Epidendrum*, *Sophranitis* e *Dendrobium*. Do fruto de espécies de *Vanilla* é extraída a baunilha, largamente utilizada na indústria alimentícia e já produzida artificialmente (LORENZI; SOUZA, 2008).

As orquídeas, a exemplo de outras espécies vegetais, reproduzem-se por duas vias: por meio da multiplicação vegetativa ou assexuada, ou da reprodução sexuada, como consequência da polinização de uma flor e recombinação de seu material genético. Na natureza as sementes das orquídeas germinam e se desenvolvem em simbiose com fungos micorrízicos, que oferecem nutrientes necessários ao seu crescimento. Na cultura assimbiótica a semente é acondicionada em um recipiente contendo um meio de cultura estéril, proporcionando a germinação e o crescimento das mudas. Tal método é muito eficiente na germinação e cultivo de orquídeas epífitas tropicais e subtropicais, em suas fases iniciais de crescimento (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

De acordo com seu hábito de crescimento as orquídeas podem ser classificadas como terrestres, rupícolas e epífitas, sendo em sua grande maioria representadas pelas epífitas (CORREIA et al., 2011). A produção de novas orquídeas e melhores híbridos tem se concentrado principalmente em novas cores, tamanho da flor e número de flores. E aproximadamente 100.000 híbridos comerciais foram registrados em todo o mundo, tendo a vertiginosa expansão do mercado fomentado o interesse de produtores e clientes em novas orquídeas melhoradas em laboratório, com a produção comercial de orquídeas representando 8% do comércio global de floricultura (VENDRAME; MAGUIRE; CARVALHO, 2007).

Como várias espécies de orquídeas estão desaparecendo de seus *habitats* naturais devido ao extrativismo e à destruição do ecossistema, tem acarretado a

evasão de seus polinizadores específicos, o que dificulta sua propagação e reprodução (MULLER et al., 2007). Técnicas como a cultura de tecidos têm amparado a preservação destas espécies e apresentado como uma de suas precípuas vantagens, o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas (UNEMOTO et al., 2007).

1.2 Importância econômica das orquídeas

Muito apreciadas, as orquídeas estão entre as plantas maior valor comercial. Além de espécies de rara beleza ornamental são plantas que surgem naturalmente, embrenhadas no alto das árvores. Em meio à complexidade das relações da natureza, essas plantas obedecem a uma rígida organização. Sendo assim um excelente símbolo do cuidado e da conservação da natureza (MENEGUCE; OLIVEIRA; FARIA, 2004).

Em se tratando de plantas ornamentais, onde predominam plantas híbridas, como a gérbera, o cravo e a tulipa, entre outras, a clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas de orquídeas tem permitido a compatibilização de demandas específicas dos mercados interno e externo, com atributos importantes, como época de floração, coloração, tamanho e forma das flores, número de flores/plantas, comprimento e resistência das hastes florais, tamanho e vigor das plantas (KERBAUY, 1997). E dentre as tecnologias e técnicas que influenciaram a horticultura nos últimos 25 anos, a micropropagação se sobressai no desenvolvimento comercial. Sendo atualmente produzidas em torno de 180 a 200 milhões de plântulas/ano através da cultura de células e tecidos (LAMEIRA et al., 2000).

As orquídeas são comercializadas no atacado variando de R\$ 5,00 a R\$ 15,00 por muda. E a *Cattleya*, por exemplo, que se mantém florida por aproximadamente 30 dias é vendida por produtores em São Paulo por R\$ 15,00 a R\$ 20,00 o vaso, sendo a *Phalaenopsis* comercializada por R\$ 20,00 o vaso. A média de preço de vaso florido gira em entorno de R\$ 40,00 para o consumidor. E nos demais centros consumidores e de pequena produção, tais preços, já considerados altos, se elevam cerca de 30% devido à margem de comercialização. E os buquês de noivas com orquídeas variam entre R\$ 100,00 a R\$ 1.000,00 (REIS, 2011).

1.3 *Epidendrum ibaguense*

O *Epidendrum* é um gênero botânico pertencente à família Orchidaceae sendo composto por mais de 1.100 espécies. A espécie amazônica *E. ibaguense* é uma orquídea terrestre que cresce em grandes touceiras prostradas e enroscadas, desenvolvendo-se no Brasil em afloramentos rochosos, em altitudes de 200 a 1.000 metros nos estados do Amazonas, Pará e Roraima (MENEUCÉ; OLIVEIRA; FARIA, 2004). O seu nome deriva do grego *epi* = sobre + *dendrum* = árvore, fazendo referência ao seu habitat epifítico. A espécie *E. ibaguense* foi descrita em 1816 a partir de uma planta coletada em Ibagué, cidade da Colômbia (SANTOS; FERREIRA; MARQUES, 2009).

Os caules do *Epidendrum* são folhosos e com muitas raízes aéreas, sendo que a longa inflorescência sai do ápice do caule. Possui grande potencial para comercialização, visto que produz flores o ano inteiro, com coloração vermelha ou amarela (SANTOS; FERREIRA; MARQUES, 2010).

De acordo com as figuras 1 e 2 a espécie *E. ibaguense* tem sua distribuição geográfica nos estados do Amazonas, Bahia, Pará, Rio de Janeiro, Sergipe e Roraima. No estado de Roraima existem 21 espécies e ocorre nos municípios de Amajari, Iracema, Pacaraima e Rorainópolis (LUZ; FRANCO, 2012). E segundo Jardim... (2014) sua distribuição geográfica ocorre na região norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Roraima) e na região Centro-oeste (Mato Grosso).

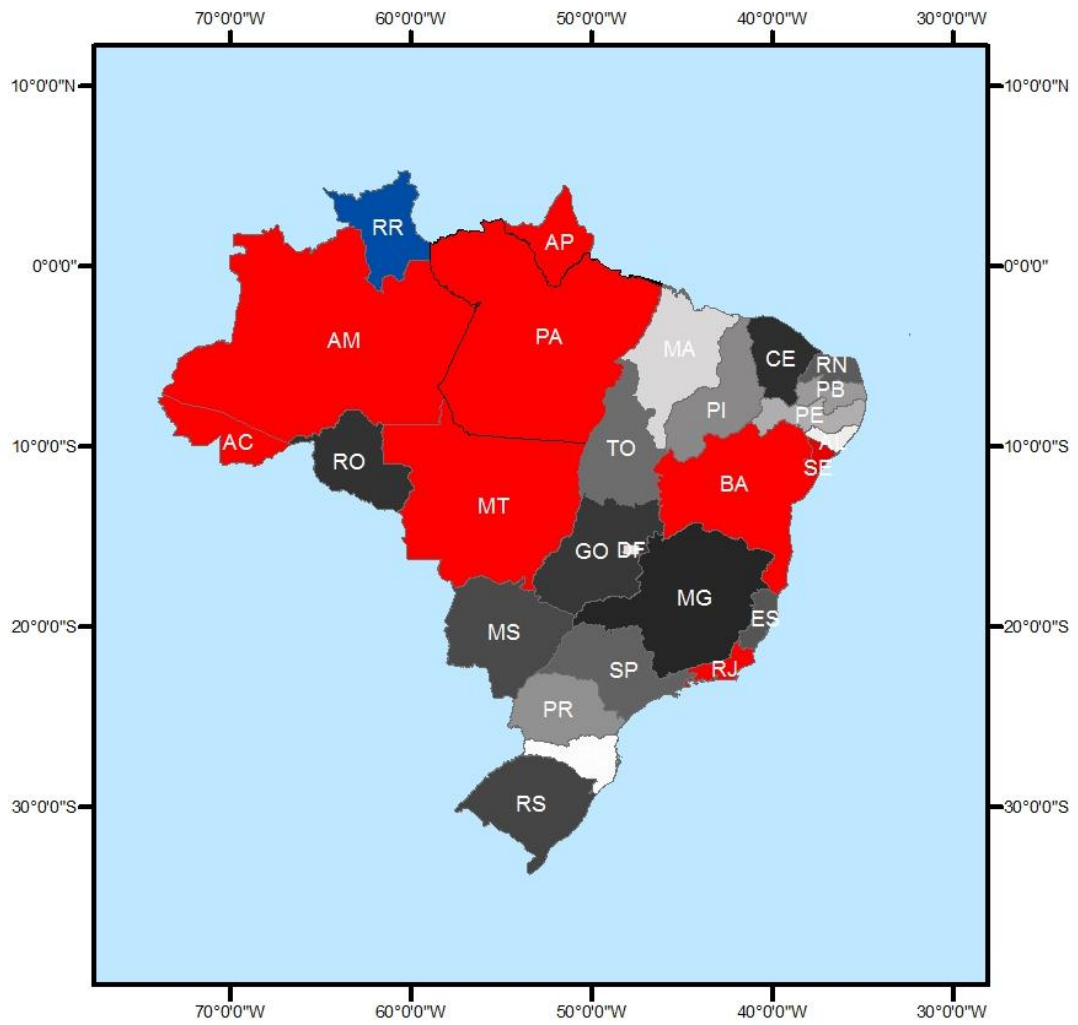
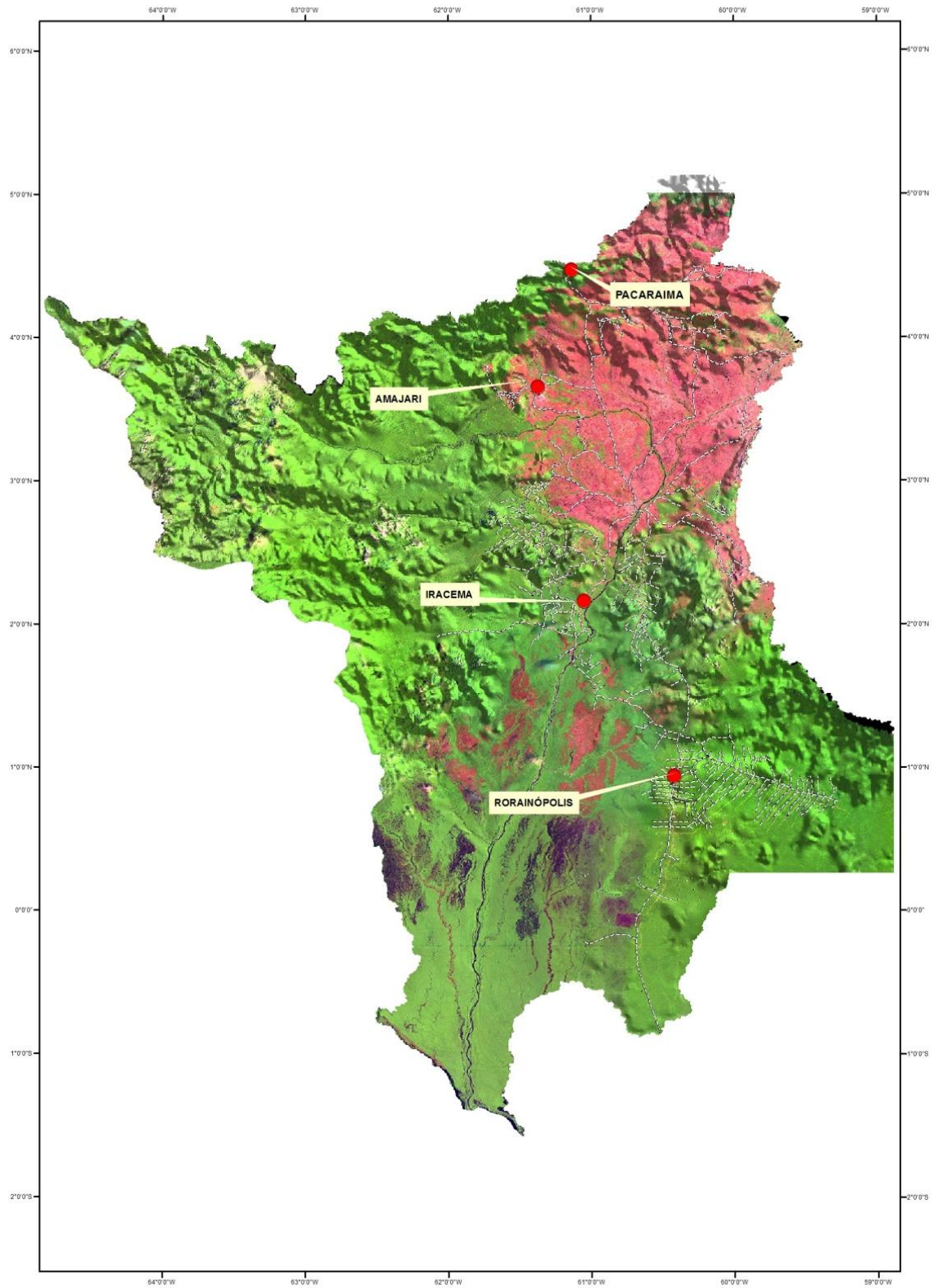
Figura 1 - Ocorrência de *Epidendrum ibaguense* no Brasil.

Figura 2 - Ocorrência de *Epidendrum ibaguense* no Estado de Roraima.



1.4 Cultivo *in vitro* ou cultura de tecidos vegetais

Cultura de tecidos vegetais é o conjunto de técnicas de cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais em meio nutritivo sintético, de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂ (QUISEN; ANGELO, 2008). Essa é uma técnica que proporciona aumento de germinação, para a maioria das espécies vegetais, além de acelerar o processo de crescimento e desenvolvimento, formando plântulas vigorosas e adaptáveis para a aclimatização (MARTINI et al., 2001).

Embora tenham sido propostos no século XIX, os princípios teóricos da cultura de tecidos de plantas, teorias de totipotência de células vegetais, foi apenas no século XX que surgiram os trabalhos de Gottlieb Haberlandt, em 1902 com o cultivo de tecidos somáticos de diversas espécies vegetais (KERBAUY, 1997).

A totipotencialidade é a propriedade que células animais e vegetais tem de dar origem a novas células e indivíduos idênticos à célula mãe. A cultura de tecidos baseia-se nesta capacidade, cultivando assepticamente qualquer parte viva da planta, em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade (LAMEIRA et al., 2000). Knudson (1922) cultivou embriões de orquídeas na ausência de micorrizas e observou que a sacarose era importante para o crescimento e desenvolvimento destes embriões *in vitro*.

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado para formação e intercâmbio de banco de germoplasma, produção de sementes sintéticas, microenxertia, estudo de biologia vegetal, além de outras aplicações (CANÇADO et al., 2009). Também apresenta importância prática para as áreas agrícola, florestal e científica, como biologia de plantas, onde aparece como uma das técnicas mais polivalentes, sendo um dos objetivos da cultura de tecidos promover uma alternativa para manipular plantas em nível molecular (QUISEN; ANGELO, 2008).

A micropropagação é uma ferramenta biotecnológica importante na obtenção de plantas livres de doenças e pragas, além de propiciar a produção de um número significativo de mudas uniformes. Esta técnica também é usada como artifício para germinar sementes de difícil propagação pelos métodos convencionais, como é o caso de algumas orquídeas (SILVA; VILLA; PASQUAL, 2009). Propiciando o aproveitamento de praticamente todas as sementes produzidas nos frutos (cápsulas)

e a regeneração de plantas adultas a partir desta. Na natureza uma cápsula que possui cerca de 3.000 sementes dá origem a poucas plantas (SANTOS; FERREIRA; MARQUES, 2009).

O cultivo *in vitro* de orquídeas constitui técnica relevante do ponto de vista comercial e também ecológico. E as plantas produzidas desta forma também podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, que é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes (MARTINI et al., 2001).

Diversas formulações de meios básicos com diferentes concentrações e/ou combinações de fitorreguladores, fungicidas e antibióticos, têm sido utilizadas nos meios de cultura, visando adequá-las às necessidades de cada espécie vegetal no cultivo *in vitro*. E a suplementação com fitorreguladores tem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz, estimulando respostas como crescimento e alongamento, enraizamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

1.5 Meios de cultura utilizados no cultivo *in vitro*

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais possuem substâncias essenciais para o seu crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro*, são conservadas no material vegetal *in vitro*. Portanto, para suprir os nutrientes necessários os meios nutritivos devem oferecer vários minerais com algumas modificações, para atender as necessidades específicas *in vitro*. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Murashige; Skoog (1962) ao adicionar extrato de folhas de fumo ao meio de cultura visando promover o desenvolvimento de calos, observou que o crescimento deste tecido foi 4 a 5 vezes maior, quando comparado com o calo mantido em meio

de White. Neste experimento demonstrou-se que, a fração ativa do extrato era inorgânica. Após este trabalho deu-se início a elaboração do meio MS, que é atualmente o meio nutritivo mais utilizado em trabalhos de cultura de tecidos (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998).

Sabe-se que o meio de cultura é essencial para o cultivo *in vitro* e pode ser formulado com diferentes combinações, de acordo com os requerimentos de cada espécie. Em geral sua composição é complexa, contendo diversos macro e micronutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, o que eleva os custos da propagação *in vitro* das espécies (HERRMANN; FREITAS; PÉRICO, 2011). Dentre os produtos que podem ser adicionados aos meios de cultura está o carvão ativado, que promove efeitos benéficos no desenvolvimento dos embriões e maior crescimento de raízes, por adsorver substâncias inibitórias presentes no meio de cultura, além de produtos tóxicos liberados pelos explantes (SCHNEIDERS et al., 2012).

Em 1922 Knudson promoveu a germinação de sementes de orquídeas em um meio nutritivo relativamente simples, composto por alguns sais minerais e açúcar em uma semeadura *in vitro* de *Cattleya massiae*. A partir de então a propagação de orquídeas evoluiu e esta metodologia tornou-se uma das principais ferramentas na propagação comercial dessas plantas (GALDIANO JÚNIOR; MANTOVANI; LEMOS, 2012). Os principais óbices na propagação *in vitro* de orquídeas estão relacionados ao tempo necessário para a produção de plântulas a partir de híbridos selecionados e a identificação do meio de cultura adequado para cada espécie (TAVARES et al., 2012).

1.6 Contaminação microbiana no cultivo *in vitro*

Dentre os maiores problemas da produção em escala comercial do cultivo *in vitro* está à contaminação do meio nutritivo por fungos e bactérias durante as etapas de propagação *in vitro*. Essa contaminação pode ocorrer no meio de cultura ou no material vegetal, competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o desenvolvimento do explante, acarretando sua perda (CAMPOS et al., 2007). E de acordo com Giladi et al. (1979) os fungicidas e bactericidas incorporados

ao meio de cultura para diminuir os problemas de contaminação, têm induzido efeitos positivos na multiplicação de plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*.

Um elevado grau de assepsia é condição limitante no cultivo *in vitro*, já que fungos e bactérias encontram no meio nutritivo utilizado, ambiente apropriado para se desenvolverem rapidamente, culminando com a morte das plântulas. Portanto, as culturas são mantidas em frascos de vidro ou outro material substitutivo, fechados e previamente esterilizados. Algumas espécies em cultura *in vitro* necessitam que haja trocas gasosas do interior dos frascos com o exterior, o que se consegue, normalmente, por meio de um pequeno espaço livre deixado entre a tampa e o frasco, por onde podem penetrar também os micro-organismos do ar. A contaminação pode acontecer também durante a introdução dos explantes nos frascos, quando são feitas as transferências de material de um frasco para outro. Daí a importância de instalações adequadas, bem como equipamentos e protocolos que possibilitem a criação de um ambiente com elevado nível de assepsia. Esse controle torna-se mais rigoroso à medida que aumenta o tamanho do laboratório, pois, com as atividades cresce também o risco de contaminação (TEIXEIRA; TORRES, 1998).

1.7 Extratos com atividade antimicrobiana

A formação de uma consciência ecológica e a busca pela preservação do ambiente natural tem gerado a necessidade de testar produtos de origem vegetal, almejando um controle de fitopatógenos (VENTUROSIO et al., 2011). Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais e aromáticas obtidos a partir da flora nativa têm apresentado potencial no controle de fitopatógenos, tanto pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fito-alexinas (ROZWALKA et al., 2008).

As tinturas são definidas pela United States Pharmacopeia (USP) como soluções alcoólicas ou hidroalcoólicas preparadas a partir de materiais vegetais ou a partir de substâncias químicas. Tradicionalmente, as tinturas de drogas potentes de origem vegetal representam a atividade de 10g da droga em cada 100 mL da tintura, e a potência é ajustada conforme a análise (GENNARO, 2004).

A escolha dos extratos de alho, cravo e própolis ocorreu devido ao conhecimento corrente dentre os orquidófilos, que utilizam esses extratos de forma empírica para evitar ou exterminar pragas como cochonilhas, pulgões etc. Os orquidófilos fazem uso desses extratos na forma de chás, extratos e caldas entre outros.

1.7.1 *Allium sativum*

O *Allium sativum* (alho) é uma erva bulbosa, pequena, de cheiro forte e característico, perene, com bulbo formado de 8-12 bulbilhos (dentes). Possui folhas lineares e longas. Suas flores são brancas ou avermelhadas, dispostas em umbela longo-penduculada. E o fruto é uma cápsula loculicida, com 1 a 2 sementes. É originária provavelmente da Europa, e largamente cultivada em todo o mundo sendo utilizada como condimento de alimentos desde a mais remota antiguidade (LORENZI; MATOS, 2002).

Apesar de ser utilizado principalmente como planta aromática e condimentar, seus constituintes ativos conferem ao alho propriedades medicinais favoráveis à saúde humana, apresentando atividade contra patógenos e pragas de espécies vegetais de interesse agrônômico, sendo empregado em muitos países como defensivo natural (SOUZA; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2007). Na composição fitoquímica ativa do alho há mais de 100 compostos biologicamente ativos, onde se destacam compostos como a alicina, o ajoeno, os tiosulfinados e os organosulfurados (LEDEZMA; APITZ-CASTRO, 2006).

A maior concentração de compostos fitoquímicos terapêuticos do alho encontra-se nos bulbos, popularmente conhecidos como dentes de alho. E o óleo essencial adquirido a partir do bulbo contém aproximadamente 53 constituintes, principalmente ajoeno, alicina e aliina que são derivados orgânicos do enxofre, os quais lhe conferem propriedades farmacológicas, dentre as quais se encontra a atividade antibacteriana (LORENZI; MATOS, 2002).

A partir da análise farmacognóstica realizada em amostras de alho por Santiago; Felício; Soares, (2011) foi registrada a presença de flavonoides, taninos, alcaloides e cumarinas encontradas no extrato hidroalcoólico de *A. sativum*. Eles

relatam que estas substâncias encontradas podem ter contribuído com a atividade antimicrobiana apresentada pelo alho.

1.7.2 *Syzygium aromaticum*

O *Syzygium aromaticum* (cravo) é uma árvore sempre verde, de copa alongada característica, de até 10 m de altura. Possui folhas inteiras, oblongas, longo-pecioladas, aromáticas, de 7-11 cm de comprimento e flores longo-pedunculadas, pequenas, aromáticas, róseas ou avermelhadas, dispostas em corimbos terminais. É originária da Índia e cultivada em vários países tropicais, inclusive no Brasil (LORENZI ; MATOS, 2002).

Como muitos outros óleos voláteis, o óleo de cravo-da-índia inibe o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua ação fungistática, sugere seu uso como uma droga antidermatofítica, além de apresentar propriedade vermífuga e larvicida. Tem como princípios ativos o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), acetileugenol, ácido gálico, compostos sesquiterpenos, furfural, vanilina e metil n-amil cetonas (ÍNDICE..., 2008). Possui diversas sinonímias como: *Eugenia caryophyllus* Thumb., *Eugenia aromaticus* L., *Eugenia aromatica* Baill., *Caryophyllus aromaticus* L., *Myrtus caryophyllus* Spreng. e *Jambosa caryophyllus* Ndz. (LORENZI; MATOS, 2002).

1.7.3 Própolis

A própolis é uma resina coletada das árvores pelas abelhas *Apis mellifera* L., constituída por inúmeras substâncias, dentre elas os flavonoides. Em função da variedade de sua composição química, apresenta várias ações farmacológicas, destacando-se as ações antiinflamatória, cicatrizante, antitumoral, antimicrobiana e principalmente a antifúngica (LONGHNI et al., 2007). É uma substância muito utilizada na medicina popular devido as citadas propriedades farmacológicas.

A composição química da própolis varia com a flora da região e com a época da colheita, assim como a espécie da abelha. Buriol et al. (2009) quando realizou um trabalho sobre a composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis encontrou a presença dos flavonóis canferida, diidrocanferida e betuletol, e

dos ácidos 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico, p-cumárico, cafeíco, 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3,4-diidroxi-5-prenilcinâmico, 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenilcinâmico, 3-prenil-4-diidrocinamoloxi-cinâmico e dicafeoilquínico.

2 OBJETIVOS

A presente pesquisa foi desenvolvida e norteada com os objetivos abaixo relacionados e serviram de orientação para o aprimoramento deste trabalho.

2.1 Objetivo Geral

Conhecer as condições de desenvolvimento do *Epidendrum ibaguense* em meio de cultura com extratos de *Allium sativum* (alho), *Syzygium aromaticum* (cravo) e própolis visando estabelecer um protocolo para controle da contaminação *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a influência dos extratos de alho, cravo e própolis no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *E. ibaguense*;
- ✓ Testar a atividade antimicrobiana dos extratos de alho, cravo e própolis frente à micro-organismos isolados e os provenientes de meio de cultura do cultivo *in vitro* contaminados e do ambiente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Escolha da espécie

A espécie *Epidendrum ibaguense* foi selecionada por ser uma orquídea nativa com potencial econômico como flor de corte, ocorrendo no estado de Roraima de acordo com Luz; Franco (2012) nos municípios de Amajari, Iracema, Pacaraima e Rorainópolis. A identificação desta espécie foi realizada pelo especialista em orquídeas Edlley Max Pessoa da Silva da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e depositada no Herbário do Centro de estudos de biodiversidade (CBio) da UFRR, com o número de acesso 6357 (figura 3).

Figura 3 - Orquídea *Epidendrum ibaguense* identificada e depositada no Herbário do CBio da UFRR.



3.2 Origem do fruto

O fruto de *E. ibaguense* foi coletado de matrizes dessa espécie cultivadas na casa de vegetação do Núcleo de Recursos Naturais (NUREN), da Universidade Federal de Roraima. A coleta foi realizada no dia 03 de dezembro de 2013 às 9 horas da manhã à temperatura de 30°C. E a pesquisa foi realizada no laboratório de substâncias bioativas do PRONAT da Universidade Federal de Roraima, no período de dezembro de 2013 a julho de 2014.

3.3 Desinfestação do fruto e semeadura *in vitro*

O fruto maduro de *E. ibaguense* foi coletado ainda fechado e transportado até o Laboratório de Substâncias Bioativas do PRONAT. Como as sementes encontravam-se no fruto íntegro, sem orifícios ou ranhuras, portanto em ambiente asséptico, não houve necessidade de promover a desinfestação das sementes, apenas da superfície do fruto, que foi lavado externamente com detergente e água corrente (figura 4) e, com o auxílio de um estilete foi feita a remoção da haste que o prendia à planta-mãe e do resto das partes florais. Após esse procedimento o fruto foi imerso em solução de álcool 70% durante 5 minutos e em seguida foi transferido para uma solução de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos, seguido de três lavagens consecutivas com 200 mL de água destilada e autoclavada, para a retirada do excesso de hipoclorito. Neste momento iniciou-se a primeira fase da pesquisa, onde o fruto foi aberto com auxílio de bisturi e com uma espátula retirou-se uma pequena quantidade de sementes, que foi semeada em frascos de vidro, de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Figura 4 - Desinfestação do fruto de *Epidendrum ibaguense* com detergente líquido e álcool a 70%.



Após a semeadura os frascos semeados permaneceram na sala de cultivo durante 15 dias, no escuro. Depois deste período, os frascos foram expostos a um fotoperíodo de 16 horas de luz com lâmpadas fluorescentes com luminosidade de $30 \mu\text{mol m}^{-2}$ (aferida pelo Luxímetro Digital Modelo: LDR-225 Marca: Instrutherm com valor médio de 2300lux) e 8 horas de escuro a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.4 Meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962)

O meio de cultura utilizado na primeira fase do experimento foi o de MS, cuja composição está descrita no anexo 1, acrescido de 2g L^{-1} de carvão ativado, 30g L^{-1} sacarose, $8,5\text{g L}^{-1}$ de ágar e água destilada para completar o volume de um litro. O pH foi ajustado para 5,7 antes da adição de ágar (Agar Agar tipo I) e da autoclavagem. Alíquotas de 30 mL deste meio foram distribuídas em frascos com capacidade de 250 mL, que foram fechados e, logo após, esterilizados em autoclave por 20 minutos a temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de $1,05\text{ kg cm}^{-2}$.

3.5 Obtenção dos extratos

As tinturas de alho e própolis utilizadas neste trabalho foram adquiridas comercialmente com concentração de 10%. E utilizou-se o óleo essencial de cravo, também comercial (Anexo 2). Foram realizadas análises fitoquímicas qualitativa dos extratos de alho, cravo e própolis no laboratório do Núcleo de Pesquisa e Pós-graduação em Ciências e Tecnologia - NPPGCT da UFRR e utilizou-se um extrator de Soxhlet para rotoevaporar todo conteúdo de água existente nos extratos de alho e própolis.

Para a identificação da composição química do extrato de alho e própolis e do óleo essencial do cravo-da-índia foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria em equipamento Shimadzu, Modelo GCMS-QP 2010. As amostras utilizadas na cromatografia foram preparadas de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 - Condições para separação por cromatografia gasosa (CG).

Condições do CG-MS	Unidades
Temperatura da coluna	60 °C
Modo de injeção	Splitless
Gás de arraste	Hélio
Rampa de aquecimento	60 °C /1min
Duração da corrida da amostra	60 min
Vazão de arraste	01 mL/min
Coluna	Rtx-5MS (30 m comprimento; 0,25 mm de diâmetro; 0,25 µm de filme
Temperatura da interface	250°C

Para realizar as diluições dos extratos de alho, cravo e própolis foram utilizados álcool a 66% para o alho e própolis e Tween[®] 80 para o óleo essencial de cravo. O monoleato de sorbitano polioxietileno é um emulsificante conhecido como Tween[®] 80, muito empregado como agente dispersante nas preparações de soluções (NASCIMENTO et al., 2008). Objetivou-se com essas diluições atingir a concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos sobre as cepas analisadas e a menor concentração que não interferisse no desenvolvimento das plântulas de *E. ibaguense*. E para avaliar se estes reagentes poderiam contribuir com o processo de oxidação fenólica foi realizado um teste *in vitro* com plântulas de *E. ibaguense*.

3.6 Preparação dos tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Substâncias Bioativas do Núcleo de Biotecnologia do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais (PRONAT), da Universidade Federal de Roraima (UFRR). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 5 repetições. Foram inoculadas 3 plântulas por repetição, totalizando 15 plântulas por tratamento.

Os explantes utilizados no subcultivo foram obtidos a partir da semeadura *in vitro* na primeira fase da pesquisa, seguindo-se o método de semeadura de Faria et al. (2012). Após completados 150 dias da germinação *in vitro* foram selecionadas as plântulas que apresentaram altura da parte aérea de aproximadamente $1,5 \pm 0,5$ cm. Na segunda fase do experimento, as plântulas foram subcultivadas em meio de cultura MS adicionados dos extratos de alho, cravo e própolis.

Avaliou-se a ação dos extratos em subcultivo realizado dentro e fora da câmara de fluxo laminar. Sessenta dias após o subcultivo nos diferentes tratamentos o desenvolvimento das plântulas foi avaliado quanto à altura da parte aérea, o comprimento da maior raiz, o número de raízes, o número folhas, o comprimento da maior folha, a massa fresca, a massa seca e a taxa de multiplicação. A partir desse momento foram realizadas observações a cada 7 dias, quanto à contaminação bacteriana, fúngica e oxidação fenólica. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos ao teste de Tukey a 5%, utilizando-se o programa estatístico GENES (CRUZ, 2006).

Após a preparação do meio de cultura MS o mesmo foi colocado em erlenmeyers para serem autoclavados por 15 minutos a 120°C. Após esfriar os erlenmeyers foram levados para a câmara de fluxo laminar, onde se distribuiu 30mL em frascos de vidro de 250 mL para todos os tratamentos. Antes da solidificação do meio foram acrescentados os extratos de alho, cravo e própolis, de acordo com a tabela 2.

Os extratos de alho e própolis acrescentados ao meio de cultura MS foram esterilizados através da filtração com membranas de éster de celulose Millipore®, com poros de 0,22 µm de diâmetro. E o óleo essencial de cravo foi adicionado diretamente ao meio de cultura sem filtrar.

Tabela 2 - Concentração dos extratos de alho, cravo e própolis utilizados nos testes de desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum ibaguense*.

Procedimento dentro e fora da câmara de fluxo laminar	Quantidade de extrato por Frasco (mL)	Número de frascos (Repetição)	Plântulas por Tratamento
T1 alho 1,0 mg.L ⁻¹	0,3	5	15
T2 alho 0,5 mg.L ⁻¹	0,15	5	15
T3 cravo 1,0 mg.L ⁻¹	0,03	5	15
T4 cravo 0,5 mg.L ⁻¹	0,15	5	15
T5 própolis 1,0 mg.L ⁻¹	0,3	5	15
T6 própolis 0,5 mg.L ⁻¹	0,15	5	15
T7 MS+carvão - controle	-	5	15

Uma semana após a preparação do meio MS com os extratos foram subcultivadas as plântulas, inoculando-se 3 por repetição, após a mensuração das variáveis: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes, número folhas, comprimento da maior folha e o peso da massa fresca. Em seguida, os frascos com as plântulas foram mantidos em sala de cultivo e desenvolvimento.

A semeadura (primeira fase do experimento) do *E. ibaguense* foi realizada dentro da câmara de fluxo laminar e o subcultivo (segunda fase do experimento) foi realizado dentro e fora da câmara de fluxo laminar, com os diferentes extratos, com o objetivo de avaliar o processo de contaminação que pode ocorrer durante a micropropagação.

Para a realização do experimento fora da câmara de fluxo laminar foram adotadas medidas de assepsia do ambiente e dos utensílios. Foi utilizada água sanitária comercial para higienizar o piso e álcool a 70% para a limpeza das paredes da bancada onde foi desenvolvido o subcultivo. Como o procedimento ocorreu fora da câmara de fluxo laminar foi utilizado lamparina com álcool para a flambagem dos instrumentos utilizados no procedimento. Após o subcultivo os frascos com as plântulas foram mantidos em sala de cultivo durante 60 dias e foram avaliados a cada 7 dias, quanto à contaminação por bactérias, fungos e oxidação fenólica.

3.7 Avaliação do crescimento

A avaliação final foi realizada 60 dias após o subcultivo, quando as plântulas foram retiradas dos frascos para a análise das variáveis biométricas: altura da parte aérea (APA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), número folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), peso da massa fresca, massa seca e taxa de multiplicação. Neste procedimento foram utilizados paquímetro digital, balança analítica de precisão (0,0001) e mufla.

Para obtenção da matéria seca, as plântulas foram pesadas e depois levadas para uma estufa com circulação forçada de ar a 135°C por duas horas, quando apresentaram peso constante. Após a secagem e pesagem do material, obteve-se a matéria seca em gramas (MIZUBUTI, 2009). O cálculo da matéria seca foi obtido seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{Matéria seca (\%)} = \frac{P'}{P} 100$$

onde: **P'** = Peso em gramas da amostra após a dessecação; e **P** = Peso em gramas da amostra antes da dessecação.

3.8 Testes de atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de alho, cravo e própolis

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no laboratório de Microbiologia do PRONAT segundo o método de Kirby e Bauer, que foi descrito em 1966 (KONEMAN et al., 1999). Esta técnica tem como princípio a inibição do crescimento de micro-organismos inoculados na superfície de um meio de cultura, através da utilização de discos do tipo blank de papel de filtro estéreis, impregnados com substâncias antimicrobianas.

3.8.1 Isolamento dos micro-organismos

A forma direta para isolamento de micro-organismos é a mais comum, quando se tem por objetivo a identificação e o controle dos contaminantes de plantas *in vitro*

(SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010). Como um dos problemas enfrentados na fase no início do estabelecimento do explante *in vitro* é a contaminação por micro-organismos, principalmente na superfície do meio, além da contaminação endógena (LONDE et al., 2007) para identificar estes contaminantes foram isolados e identificados os micro-organismos. Após a realização deste procedimento foram utilizados nos testes de atividade antimicrobiana com os extratos de alho, cravo e própolis.

Para o isolamento dos micro-organismos foram utilizados frascos com meio de cultura contaminados e placas expostas nos ambientes: sala de cultivo, câmara de fluxo laminar e bancadas do laboratório de substâncias bioativas do PRONAT. Com auxílio de uma alça de platina foi colhida uma amostra do frasco contaminado e inoculou-se em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e ágar Sabouraud. Utilizaram-se placas de Petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton para bactérias e com o ágar Sabouraud para fungos filamentosos e leveduras, que foram abertas nos ambientes citados para detecção dos micro-organismos presentes por 30 minutos.

3.8.2 Identificação dos micro-organismos isolados

A identificação dos contaminantes presentes nas placas e nos frascos foi realizada de duas formas: visualização das colônias pelo exame macroscópico das placas e dos tecidos vegetais infectados e pelo exame microscópico dos fungos filamentosos, através da preparação de lâminas. Foi realizado microcultivo em lâmina para identificação dos fungos até o gênero, seguindo as normas internacionais descritas por Lacaz et al. (2002). As leveduras foram previamente identificadas utilizando o kit de identificação de leveduras Biomérieux®.

3.8.3 Micro-organismos utilizados no bioensaio

Foram selecionados cinco micro-organismos para este bioensaio, sendo eles bactéria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*, bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e levedura *Candida* sp.

(figura 5). Utilizou-se cepas padrão ATCC para os testes de atividade antimicrobiana com os extratos de alho, cravo e própolis. As bactérias encontradas nos frascos contaminados foram separadas somente até Gram-negativa e Gram-positiva.

Figura 5 - Cepas utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de alho, cravo e própolis.

CEPAS	ORIGEM
<i>Aspergillus</i> sp.	Isolado dos frascos e demais ambientes do laboratório
<i>Candida</i> sp.	Isolado dos frascos contaminados
<i>Escherichia coli</i> - Gram negativa	ATCC 25922
<i>Penicillium</i> sp.	Isolado dos frascos contaminados e demais ambientes do laboratório
<i>Streptococcus pneumoniae</i> - Gram positiva	INCQS 00440

As bactérias *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae* foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton, e as cepas fúngicas *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. e da levedura *Candida* sp. em placas contendo ágar Sabouraud e acondicionadas em estufa por 48 horas. As bactérias ficaram incubadas a temperatura de 37°C e os fungos de 27°C. Após este período 5 colônias foram transferidas das placas de Petri para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril, para a concentração de 10⁷ UFC/mL, perfazendo a turbidez 0,5 da escala de Mac Farland.

Discos de papel estéreis com 6 mm de diâmetro foram embebidos previamente com 10 µL dos extratos de alho, cravo e própolis, além de um controle positivo com gentamicina (200mg/L) para as bactérias e itraconazol (200mg/L) para os fungos filamentosos e leveduras. Realizou-se a semeadura das suspensões utilizando a metodologia da placa cheia, através da inoculação com alça de Drigalski.

3.8.4 Concentração inibitória mínima (MIC)

A MIC foi determinada pela menor concentração observada nos testes de atividade antimicrobiana para os extratos de alho, cravo e própolis frente aos micro-organismos *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *S. pneumoniae*, *E. coli* e *Penicillium* sp. O

extrato que apresentou resultado inibitório passou por sucessivos processos de diluição. Após essas diluições, repetiu-se todo o procedimento citado no item 3.8.3 e novamente realizou-se a leitura do diâmetro dos halos inibitórios. As diluições sucessivas cessaram ao atingirmos a última concentração de extrato em disco capaz de produzir ação antimicrobiana.

3.8.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de alho, cravo e própolis frente aos micro-organismos *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *E. coli*, *Penicillium* sp., e *S. pneumoniae* foram analisadas visualmente as medias do diâmetro dos halos de inibição do crescimento, além da determinação da concentração mínima inibitória. O resultado positivo foi evidenciado pela presença de halos de inibição em torno dos discos, que foram medidos com régua.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Provenientes do subcultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* foram selecionadas 105 plântulas para o subcultivo dentro da câmara de fluxo laminar e 105 plântulas para o subcultivo fora da câmara de fluxo laminar, com o intuito de avaliar o desenvolvimento vegetativo destas plântulas em meio MS, com adição de extratos vegetais de alho, cravo e própolis e para avaliação de possíveis contaminações *in vitro*. Serão discutidos a seguir os efeitos desses extratos vegetais sobre as variáveis biométricas das plântulas e micro-organismos existentes nos meios de cultura.

4.1 Efeito dos extratos sobre o desenvolvimento das plântulas

Após 60 dias do cultivo *in vitro* foi realizada a análise de crescimento vegetativo das plântulas de *E. ibaguense* subcultivadas dentro da câmara de fluxo laminar e foi possível observar que, a maior altura da parte aérea (APA) das plântulas ocorreu no tratamento controle (MS) e no meio com própolis na concentração de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ apresentando resultado de 1,978 cm e 1,782 cm, respectivamente (tabela 3). Fora da câmara de fluxo laminar, a maior altura da parte aérea foi observada no tratamento controle (MS), embora não tenha diferido estatisticamente do tratamento com própolis a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, alho a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ e alho a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, com médias de 1,766 cm, 1,688 cm, 1,484 cm e 1,136 cm, respectivamente (tabela 4). Um resultado idêntico foi observado quando o extrato de alho promoveu o maior crescimento da parte aérea da amoreira-preta, no experimento realizado por Dias et al. (2011), quando avaliaram a aplicação de extrato de alho na quebra do repouso vegetativo de amoreira-preta. A menor altura da parte aérea foi verificada no tratamento com cravo a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, tanto no subcultivo realizado dentro, como fora da câmara de fluxo laminar.

O maior comprimento da maior raiz (CMR) foi observado no tratamento controle (MS), onde as plântulas apresentaram em média 1,19 cm de comprimento, no subcultivo realizado dentro da câmara de fluxo laminar. Observa-se, no entanto que não houve diferença estatística significativa em relação aos tratamentos com alho a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ e com própolis a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$. Já para o subcultivo realizado fora da

câmara, o maior comprimento da maior raiz ocorreu no tratamento com alho a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, com média de $0,708 \text{ cm}$ mas não houve diferença estatística significativa em relação aos outros tratamentos, com exceção do tratamento com cravo a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ que acarretou uma diminuição no tamanho da raiz de $0,198 \text{ cm}$ (tabela 4).

Tabela 3 - Efeitos dos extratos de alho, cravo e própolis no desenvolvimento de *E. ibaguense* subcultivado dentro da câmara de fluxo laminar, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Variáveis Avaliadas					
	APA (cm)	CMR (cm)	NR -	CMF (cm)	NF -	MS (%)
T1 alho 1 mgL^{-1}	0,344bc	0,484abc	0,796cd	0,232c	2,262ab	11,258a
T2 alho $0,5 \text{ mgL}^{-1}$	0,346bc	0,196bc	0,93cd	0,286bc	2,064ab	7,502a
T3 cravo 1 mgL^{-1}	- 0,473c	-0,28c	- 0,266d	- 0,2c	0,398b	6,596a
T4 cravo $0,5 \text{ mgL}^{-1}$	0,632b	0,266bc	3,394b	0,436bc	2,798ab	7,446a
T5 própolis 1 mgL^{-1}	0,684b	0,202bc	1,864bc	0,434bc	3,33a	7,114a
T6 própolis $0,5 \text{ mgL}^{-1}$	1,782a	0,906ab	3,528b	0,994ab	3,064ab	11,158a
T7 testemunha	1,978a	1,19a	6,128a	1,388a	3,33a	6,23a

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Altura da parte aérea (APA); comprimento da maior raiz (CMR); número de folhas (NF); comprimento da maior folha (CMF); número de folhas (NF); matéria seca (MS).

Tabela 4 - Efeitos dos extratos de alho, cravo e própolis no desenvolvimento de *E. ibaguense* subcultivado fora da câmara de fluxo laminar, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Variáveis Avaliadas					
	APA (cm)	CMR (cm)	NR	CMF (cm)	NF	MS (%)
T1 alho 1 mgL^{-1}	1,136a	0,708a	2,93ab	1,03a	2,662ab	6,218c
T2 alho $0,5 \text{ mgL}^{-1}$	1,484a	0,498a	3,33ab	0,702ab	4,53a	7,71b
T3 cravo 1 mgL^{-1}	- 0,154b	- 0,198b	0,0c	- 0,106b	1,064b	6,156c
T4 cravo $0,5 \text{ mgL}^{-1}$	0,72ab	0,17ab	2,194abc	0,5ab	3,466ab	6,688bc
T5 própolis 1 mgL^{-1}	0,808ab	0,288ab	1,33bc	0,236ab	4,464a	8,95a
T6 própolis $0,5 \text{ mgL}^{-1}$	1,688a	0,496a	2,396abc	0,762ab	3,398ab	6,764bc
T7 testemunha	1,766a	0,48a	4,53a	0,966a	3,33ab	6,238c

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Altura da parte aérea (APA); comprimento da maior raiz (CMR); número de folhas (NF); comprimento da maior folha (CMF); número de folhas (NF); matéria seca (MS).

O maior número de raízes (NR) foi observado no tratamento controle (MS) nos subcultivos realizados dentro e fora da câmara de fluxo laminar, com médias de 6,128 e 4,53 raízes por plântulas, respectivamente (tabela 3 e 4) embora não tenha havido diferença significativa para os tratamentos com alho a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, alho a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, cravo a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ e própolis a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ no subcultivo realizado dentro da câmara. E no tratamento com cravo a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ foi observado o menor número de raízes em relação aos outros tratamentos, mostrando que sua utilização é nociva ao desenvolvimento das raízes das plântulas. O número de raízes é uma variável importante, pois a maior produção de raízes promoverá maior superfície de contato e absorção de nutrientes entre outros fatores, o que facilita a adaptação quando se deseja desenvolver o cultivo *ex vitro* (GALDIANO JÚNIOR; MANTOVANI; LEMOS, 2012).

O maior comprimento da maior folha (CMF) ocorreu no tratamento controle (MS) e no meio com própolis a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, com médias de 1,388 e 0,994 cm, respectivamente no subcultivo realizado dentro da câmara (tabela 3). E no subcultivo fora da câmara o meio com alho a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ e o controle (MS) apresentaram os melhores resultados, com médias de 1,03 cm e 0,966 cm, respectivamente, embora não tenham apresentado diferença estatística significativa em relação aos outros tratamentos, com exceção do tratamento com cravo $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ que provocou uma diminuição do número de folhas, mostrando-se prejudicial para as plântulas (tabela 4).

Quanto ao número de folhas (NF), o meio com própolis $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ e o controle (MS) apresentaram os melhores resultados, com médias iguais de 3,33 folhas no subcultivo realizado dentro da câmara (tabela 3), mas não houve diferença estatística significativa entre os outros tratamentos, com exceção do tratamento com cravo a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ que promoveu o menor número de folhas nas plântulas (tabela 3). E no subcultivo fora da câmara observou-se que, os meios com alho a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ e com própolis a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ provocaram os maiores números de folhas, com médias de 4,53 e 4,464, respectivamente, embora não tenha havido diferença estatística significativa em relação aos outros meios, com exceção novamente do tratamento com cravo a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ (tabela 4). Em um experimento realizado por Braga et al. 2010 onde utilizaram o extrato vegetal de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) no desenvolvimento de plantas dessa mesma espécie, observaram também que houve aumento quanto ao número de folhas. Na nossa pesquisa também foi observado

que os extratos vegetais de alho e própolis proporcionaram um aumento no número de folhas das plântulas da orquídea *E. ibaguense*.

A adição de qualquer substância ao meio de cultura pode influenciar no desenvolvimento das plântulas, portanto, é possível que os constituintes químicos do extrato de cravo a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ tenham oxidado ou inibido o desenvolvimento vegetativo em todas as variáveis biométricas observadas neste experimento. Rodrigues et al. (2013) quando avaliaram o uso de hipoclorito de sódio como descontaminante no processo de inoculação de explantes de orquídeas adultas de *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguense* observaram que, o aumento da concentração de hipoclorito de sódio reduziu a massa fresca, número de brotos e altura da parte aérea para as duas espécies analisadas.

Em relação à matéria seca das plântulas de *E. ibaguense* se observa que, a maior porcentagem ocorreu no subcultivo realizado dentro da câmara de fluxo laminar no meio com alho a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, que apresentou 11,258% de matéria seca, mas não houve diferença estatística significativa em relação aos outros tratamentos (tabela 3), com a menor porcentagem de matéria seca sendo obtida no tratamento controle (MS). No subcultivo fora da câmara a maior porcentagem de matéria seca foi obtida no meio com própolis a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$. E a menor porcentagem de matéria seca foi observada no meio com cravo a $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, com média de 6,156% (tabela 4). Portanto, pode-se inferir que o meio de cultura MS adicionado dos extratos vegetais estudados favoreceu o acúmulo de matéria seca em plântulas de *E. ibaguense*.

Como a adição dos extratos vegetais de alho, cravo e própolis no meio de cultura MS promoveu aumento da matéria seca, superando inclusive o tratamento controle (meio MS), isso indica a existência de substâncias nesses extratos que favorecem o crescimento vegetativo. Alves et al. (2007) também verificaram a influência positiva de extratos vegetais no crescimento *in vitro* de *Rosa x hybrida* e relataram que, a presença destas substâncias influenciaram no crescimento *in vitro* de plântulas dessa mini-rosa.

A maior taxa de multiplicação ocorreu no meio de cultura MS com própolis a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ (T6), obtendo-se uma taxa de multiplicação de 0,6:1 com um desvio padrão de 1,183%, seguido do controle (MS) com 0,26:1 e desvio padrão de 1,032% para o subcultivo dentro da câmara de fluxo laminar. A figura 6 mostra o desvio padrão da taxa de multiplicação das plântulas de *E. ibaguense*. Fora da câmara de fluxo laminar as plântulas mostraram uma taxa de multiplicação de 0,06:1 com um

desvio padrão de 0,258% (figura 7) para os tratamentos com alho, cravo e própolis a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$. Para os demais tratamentos não houve crescimento de brotos. Observou-se que quanto maior a concentração dos extratos no meio de cultura MS, menor a taxa de multiplicação.

Figura 6 - Efeito dos extratos de alho, cravo e própolis adicionados ao meio de cultura MS na taxa de multiplicação de plântulas de *Epidendrum ibaguense* subcultivadas dentro da câmara de fluxo laminar (DCFL).

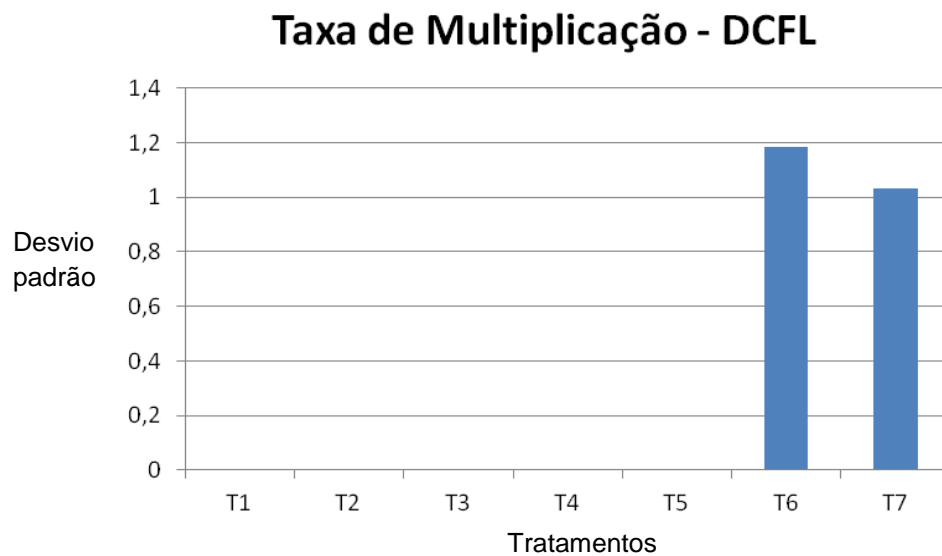
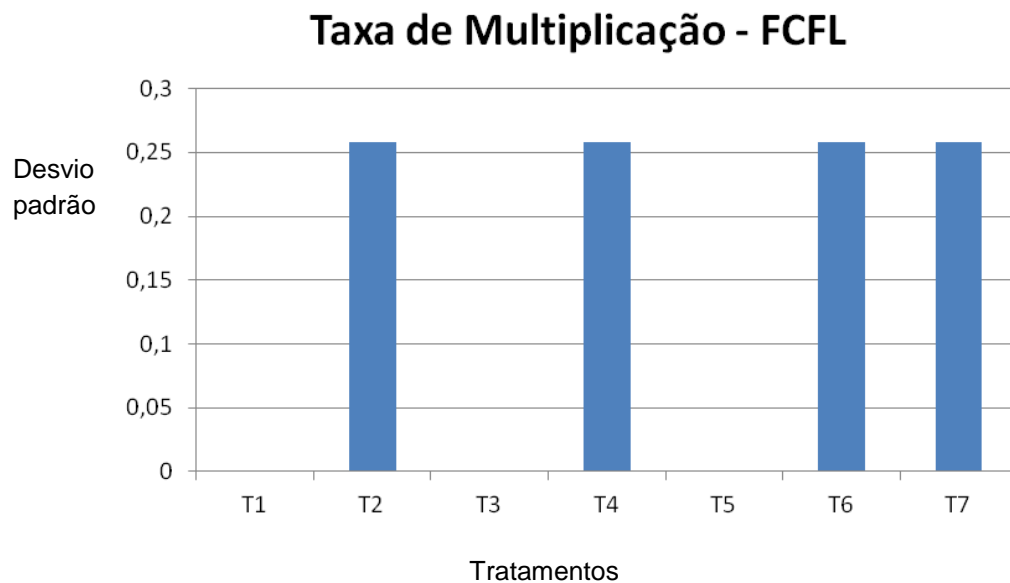


Figura 7 - Efeito dos extratos de alho, cravo e própolis adicionados ao meio de cultura MS na taxa de multiplicação de plântulas de *Epidendrum ibaguense* subcultivadas fora da câmara de fluxo laminar (FCFL).



Existem poucas referências sobre o uso do alho, do cravo e da própolis em cultura de tecidos vegetal, o que dificulta a discussão deste trabalho. De forma semelhante Andrade et al. (2008) quando estudaram o uso de antibióticos alternativos na cultura de tecidos relatam que, não foram encontrados trabalhos sobre o uso da própolis em cultura de tecidos. E afirmaram que a própolis foi eficiente no controle do crescimento de uma bactéria endógena, sendo necessário estudos para determinar a melhor concentração de utilização, assim como os efeitos no desenvolvimento de explantes de mangueira (*Mangifera indica*) no cultivo *in vitro*. Até o momento não se conhece os possíveis efeitos da utilização do extrato etanólico de própolis no equilíbrio biológico das plantas e sua ação sobre seus inimigos naturais como fungos ou insetos (PEREIRA; MAIA; PAULA, 2014).

4.2 Perfil fitoquímico dos extratos de alho, cravo e própolis

O perfil fitoquímico dos extratos de alho, cravo e própolis estão relacionados nos anexos 3, 4, e 5, onde estes constituintes químicos foram detectados pelo método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) demonstrando os tempos de retenção inicial e final. Na tabela 5 podemos observar o resultado integrado da análise desses constituintes químicos e diante desses resultados observa-se que, os compostos vegetais utilizados possuem substâncias com atividade antimicrobiana como o eugenol, fenol e ácido benzóico, entre outras.

O eugenol (tabela 5) está presente nos extratos de alho, cravo e própolis utilizados nesta pesquisa e vários estudos comprovaram sua atividade antimicrobiana, como o de Scherer et al. (2009) que demonstrou a presença do eugenol no óleo essencial de cravo-da-índia e sua ação antimicrobiana nos microorganismos *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Em nosso experimento obtivemos comprovação desta ação, pela formação de um halo de inibição produzido pelo extrato de cravo frente às cepas de *Aspergillus* sp., *S. pneumoniae*, *E. coli*, *Candida* sp. e *Penicillium* sp.

Ao analisar o perfil da composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia Silvestri et al. (2010) encontraram o eugenol como composto majoritário, o que demonstra sua atividade antibacteriana. Portanto, a

presença do eugenol nestes extratos pode ter influenciado no desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *E. ibaguense* e na atividade antimicrobiana dos extratos contra as cepas utilizadas neste experimento.

Tabela 5 - Resultado da análise dos extratos de alho, cravo e própolis através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Identificação provável	Extratos		
	Alho	Cravo	Própolis
Undecano	+	+	+
Etil benzeno	+	-	-
Eugenol	+	+	+
Orto-xileno	+	-	-
Ácido benzóico	+	+	-
Hexano	+	-	-
Decano	+	+	-
Heptano, 1-cloro	+	-	-
1-Dodecanol	+	+	+
2-Furancarboxaldeído	+	-	+
Desilane	+	-	+
1-Pentadecano	+	-	-
Fenol	+	+	+
Nonadecano	+	-	-
Ácido hexadecanóico	+	-	+
Ácido benzenopropanóico	+	-	-
Ácido metil ester octadecenóico	+	-	+
Nonane	-	+	-
Metil salicilato	-	+	-
Ciclopropano	-	+	-
Benzeno	-	+	-
1,1-Ciclopropanedicarbonitrila	-	+	-
Metil fenil benzimidazole	-	+	-
Di-n-decil-sulfona	-	+	-
Ácido metil ester octadecadienóico	-	-	+
Oxima, metoxi-fenil	-	-	+
2 Metoxi -2-trimetilsililfenil	-	-	+
n-Pentadecanol	-	-	+
4H-piran-4-ona,2,3-di-hidro-3,5-hidroxi-6-metil	-	-	+
Monoacetato de 1,2,3-propanotriol	-	-	+
1-Heptadecano	-	-	+

+ = presença de substância e - ausência de substância.

A análise do extrato de alho mostrou a presença de orto-xileno, hidrocarboneto aromático formado por uma mistura de três isômeros: orto-xileno, meta-xileno e

para-xileno. Geralmente os xilenos são liberados no ar por emissão de gases nas indústrias, na exaustão de veículos e na volatilização por seu uso como solvente. O xileno é irritante dos olhos, pele e mucosas e sua via de exposição é a inalatória (CETESB, 2012). Venâncio (2010) quando analisou a composição química e atividade antimicrobiana de extratos à base de *A. sativum* e *A. tuberosum* também demonstrou a presença de xilenos em suas amostras.

Em sua pesquisa, utilizando cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura Pereira; Aquino Neto (2000) relataram que o extrato acetônico bruto de própolis é uma amostra complexa, que possui vários ácidos e compostos fenólicos, e que sobrecarregam as fases estacionárias apolares necessárias para o trabalho em temperaturas elevadas (STUCKENBRUCK; AQUINO NETO 1990). Portanto, quando se realiza a análise do extrato de própolis com CG-EM utiliza-se alta temperatura, o que dificulta a identificação de algumas substâncias, que podem estar presentes, mas são volatilizados antes da detecção. E no experimento realizado por Torres et al. (2008) quando analisaram o extrato de própolis por meio da técnica de CG-EM, estes também encontraram várias substâncias dentre elas o ácido hexadecanóico, o ácido 9-octadecenóico e o ácido octadecanóico, corroborando assim com o nosso trabalho onde estas substâncias também foram identificadas.

4.3 Atividade antimicrobiana dos extratos

Ao utilizar o extrato de cravo no meio MS em subcultivo fora da câmara de fluxo laminar a contaminação fúngica e bacteriana foi de 0,95% até os 21 dias da pesquisa. E até o final da pesquisa, aos 60 dias, não houve contaminação. No meio contaminado pode-se observar que, o extrato de cravo a $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ incorporado ao meio de cultura impediu que a contaminação aumentasse e não houve impedimento ao crescimento vegetativo, pois a plântula não apresentou sinais de oxidação, apresentando crescimento da altura da parte aérea de 0,331 cm (Figura 8).

Figura 8 - Contaminação microbiana de uma plântula de *E. ibaguense* subcultivada em meio de cultura MS adicionado de extrato de cravo 0,5 mgL⁻¹



Na figura 9 estão apresentados os resultados dos micro-organismos encontrados em frascos com meio de cultura contaminados e nos ambientes do Laboratório de Substâncias Bioativas do PRONAT. Na bancada, na câmara de fluxo laminar e na sala de cultivo não foram detectadas contaminação bacteriana, embora tenha sido encontrado contaminação por *Aspergillus sp.*, *Candida sp.* e *Penicillium sp.*, organismos comumente encontrados nos ambientes. Os frascos com meios contaminados apresentaram contaminação por *Aspergillus sp.*, bactéria Gram negativa, bactéria Gram positiva e *Penicillium sp.* O que também foi detectado por Londe et al. (2007) quando analisaram o efeito do benomyl e fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile*.

Figura 9 - Micro-organismos isolados e identificados dos frascos com meio de cultura contaminado e de áreas do Laboratório de Substâncias Bioativas do PRONAT.

Micro-organismos	Bancada	Câmara de Fluxo Laminar	Frascos de cultivo <i>in vitro</i>	Sala de cultivo
<i>Aspergillus sp.</i>	+	+	+	+
Bactéria Gram-negativa	-	-	+	-
Bactéria Gram-positiva	-	-	+	-
<i>Candida sp.</i>	+	+	-	+
<i>Penicillium sp.</i>	+	+	+	+

Presença de micro-organismo (+); Ausência de micro-organismo (-)

As médias dos halos de inibição do crescimento provocado pelos extratos testados frente às cepas de *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *S. pneumoniae*, *E. coli* e *Penicillium* sp. são visualizados na tabela 6 e demonstram a ação antimicrobiana do extrato de cravo frente as cepas estudadas. Scherer et al. (2009) quando estudaram a ação do óleo de cravo-da-índia também demonstraram sua ação antimicrobiana frente aos micro-organismos *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium* e *Staphylococcus aureus*.

Dos extratos testados contra os micro-organismos *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *S. pneumoniae*, *E. coli* e *Penicillium* sp. o extrato de cravo apresentou um halo de inibição ao crescimento bacteriano e fúngico superior ao alho e própolis. Os extratos de alho e própolis nas concentrações de 10 e 20% não apresentaram halo de inibição em relação aos micro-organismos testados neste trabalho. Resultado semelhante foi encontrado por Cavalcante (2011) onde na concentração de 20% a tintura de *A. sativum* não apresentou atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

Tabela 6 - Ação dos extratos de alho, cravo e própolis em diferentes cargas contra o crescimento de cepas de *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *E. coli*, *Penicillium* sp. e *S. pneumoniae*.

Extratos	Micro-organismo	Carga (%/disco)/halo (mm)		
		20	10	1
Alho	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-
	<i>Candida</i> sp.	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	-
	<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-
	<i>S. pneumoniae</i>	11	-	-
Cravo	<i>Aspergillus</i> sp.	14	15	13,6
	<i>Candida</i> sp.	13,6	9	-
	<i>E. coli</i>	13,6	11	-
	<i>Penicillium</i> sp.	15	15,3	13,6
	<i>S. pneumoniae</i>	14,6	14	-
Própolis	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-
	<i>Candida</i> sp.	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	-
	<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-
	<i>S. pneumoniae</i>	14	-	-

Sinal (-) indica que não apresentou halo de inibição.

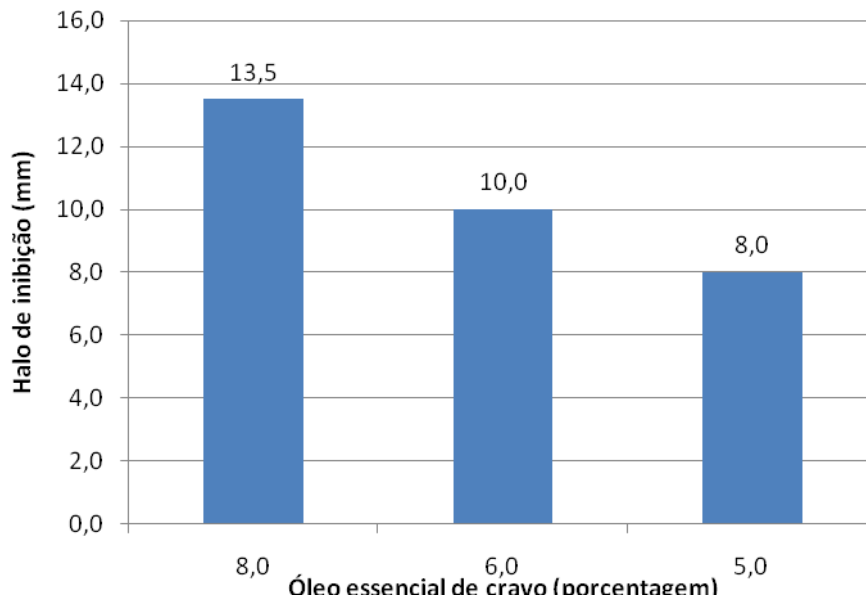
Com relação aos halos de inibição dos extratos de alho, cravo e própolis (tabela 7) sobre os micro-organismos *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *E. coli*, *Penicillium* sp. e *S. pneumoniae* observa-se que, os extratos de alho e própolis não apresentaram inibição ao crescimento das cepas testadas e o extrato de cravo foi o único que apresentou inibição do desenvolvimento micelial dos micro-organismos estudados, nas concentrações analisadas. Portanto, foi realizada a concentração mínima inibitória somente do extrato de cravo (figura 10), pois este apresentou inibição de todas as cepas testadas. Não foi observada atividade antimicrobiana da própolis sobre *Candida albicans* e *S. aureus* no trabalho realizado por Silva et al. (2006) e neste trabalho também não detectamos essa atividade no extrato de própolis.

Figura 10 - Ação do extrato de cravo em diferentes cargas contra o crescimento da cepa *Penicillium* sp.

<i>Penicillium</i> sp.	Carga (%/disco)/halo (mm)				
	1	0,5	0,25	0,1	0,05
Halo de inibição	13,6	13	12	11,6	11

De acordo com a figura 11 pode-se observar que, o extrato de cravo controlou o crescimento do fungo filamentosso *Aspergillus* sp. a partir da concentração de 5%, quando apresentou concentração mínima inibitória de 8mm. Resultado similar foi obtido por Venturoso et al. (2011) onde demonstraram em sua pesquisa sobre a atividade fungistática no desenvolvimento de fitopatógenos, que o cravo-da-índia apresentou ação antimicrobiana sobre *Aspergillus niger* e *Penicillium*. E que o cravo na concentração de 5% apresentou-se eficaz, diminuindo o crescimento micelial de *Cercospora kikuchii*.

Figura 11 - Concentração mínima inibitória (MIC) do extrato de cravo contra a cepa de *Aspergillus sp.* contaminante de meio de cultura.



Com relação ao fungo filamentosso *Penicillium sp.* pode-se observar que, o óleo essencial de cravo controlou o crescimento deste micro-organismo a partir da concentração de 0,05%, onde apresentou concentração mínima inibitória de 11mm (Figura 12 e 13).

Figura 12 - Concentração mínima inibitória (MIC) do óleo essencial de cravo contra a cepa de *Penicillium sp.* contaminante de meio de cultura.

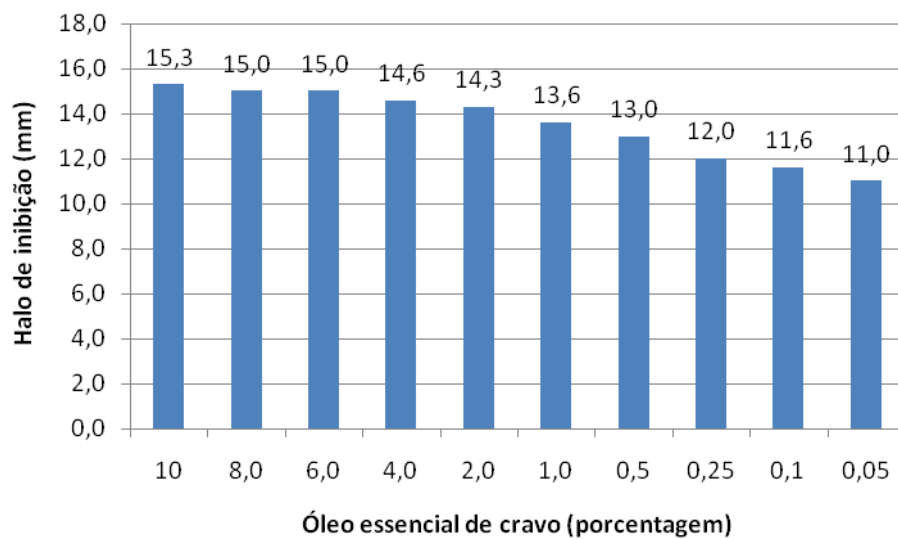


Figura 13 - Ação dos discos impregnados com o óleo de cravo sobre o crescimento de *Penicillium* sp.



Diante destes resultados é possível inferir que, a adição de extratos de alho, cravo e própolis acrescidos de carvão ativo ao meio de cultura MS no subcultivo de *E. ibaguense* contribuiu para a redução da contaminação.

5 CONCLUSÕES

Houve influência dos extratos de alho, cravo e própolis no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Epidendrum ibaguense*.

Os extratos de alho e própolis não demonstraram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Escherichia coli*, *Penicillium* sp. e *Streptococcus pneumoniae*.

O extrato de cravo apresentou ação antimicrobiana para as cepas testadas.

Foi possível estabelecer um protocolo para o cultivo *in vitro* de *E. ibaguense* para o controle da contaminação.

REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista virtual de química**, Rio de Janeiro, v.4, n.2, p.146-161, 2012.

ALMEIDA, M. et al. Morfofisiologia de plântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden cultivadas *in vitro* sob influência de paclobutrazol. **Revista brasileira de biociências**, Porto Alegre, v.10, n.1, p.20-25, jan./mar. 2012.

ALVES, D. S. et al. Influência de extratos vegetais no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Rosa x hybrida*. **Ciência agrotecnológica**, Lavras, v.31, n.6, p.1888-1892, Nov./dez., 2007.

ANDRADE, S. R. M. et al. Controle do crescimento e identificação de microrganismos contaminantes visando à micropropagação de gemas laterais de mangueira. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2008, 27 p.

ANDRADE, S. R. M. et al. **Uso de antibióticos alternativos para controle de bactérias endógenas visando a micropropagação da mangueira**. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados, 2004. Disponível em: http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/versãomodelo/html/2004/posteres/p2004_49.shtml. Acesso em: 13 set. 2014.

BRAGA, R. S. et al. **Efeito do extrato vegetal no desenvolvimento de plantas de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) em plantio florestal**. Resumo expandido. In: Simpósio de meio ambiente, 6., 2010, Viçosa. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/.../EfeitoExtratoCuraua.pdf>. Acesso em 11 ago. 2014.

BURIOL, L. et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química nova**, São Paulo, v.32, n.2, p.296-302, fev. 2009.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, v.1, p. 11-20.

CAMPOS, M. R. C. et al. Contaminação Microbiana na Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista brasileira de biociências**, Porto Alegre, v.5, n.1, p.405-407, jul. 2007.

CANÇADO, G. M. A. et al. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, p.64-74, nov./dez. 2009.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de tinturas de produtos naturais sobre *Candida* spp. **International journal of dentistry**. Recife, v.10, n.1. 2011.

CETESB. **Ficha de informação toxicológica:** xileno. São Paulo: CETESB, 2012. 2p. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br%2Fuserfiles%2Ffile%2Flaboratorios%2Ffit%2Fxileno.pdf&ei=MnQkVOznDoGjyATY_oKoBQ&usg=AFQjCNGXeQmq-GaCDXPkXFCtrfjOZdWg8g&bvm=bv.76247554,d.b2U. Acesso em: 11 jul. 2014.

COLOMBO, L. A. et al. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta scientiarum agronomy**, Maringá, v.26, n.2, p.253-258, abr./jun. 2004.

CORREIA, D. et al. **Método de aclimatização de orquídeas em garrafas PET.** Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 3 p. (Circular Técnica 34).

COSTA, M. A. P. C. et al. Micropropagação de Orquídea. In: JUGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas.** 2 ed. rev. e ampl. Brasília: Embrapa, 2013. 407 p.

CRUZ, C. D. **Programa Genes:** biometria. Viçosa: Editora UFV, 2006. 382 p.

DIAS, J. T. et al. Extrato de alho na quebra do repouso vegetativo de amoreira-preta cultivada organicamente. **Revista trópica - Ciências agrárias e biológicas**, v.5, n.2, p.23. 2011.

FARIA, R. T. et al. A Seleção de genótipos de *Dendrobium* (Orchidaceae) na fase de propagação *in vitro*. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v.25, n.4, p.309-314, 2004.

FARIA, R. T. et al. **Produção de orquídeas em laboratório.** Londrina: Mecenas, 2012. 124 p.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E. G. M. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden; Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizantes comercial. **Comunicata scientiae**, Teresina, v.3, n.3, p.210-214, mai. 2012.

GENNARO, A. R. **Remington:** a ciência e a prática da farmácia. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2228 p.

GILADI, A. A.; GOREN, R. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v.10, p.357-362, 1979.

GRATTAPALIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa SPI - CNPH. 1998. 183-260 p.

HERRMANN, M. H.; FREITAS, E. M.; PÉRICO, E. *In vitro* culture of orchid's seedlings in an alternative culture medium. **Revista brasileira agrociências**, Pelotas, v.17, n.1-4, p.162-166, jan./mar. 2011.

ÍNDICE terapêutico fitoterápico: ITF. Petrópolis: EPUB, 2008. 328 p.

JARDIM botânico do Rio de Janeiro. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 23 mai. 2014.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas “*in vitro*”: uma realidade. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.1, p.30-33, mai. 1997.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical gazette**. Chicago, v.73, n.1, p.1-25, 1922.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Buenos Aires: Panamericana, 1999. 1432 p.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LAMEIRA, O. A. et al. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41 p. (Documentos, 66).

LEDEZMA, E.; APITZ-CASTRO, R. Ajoene, El principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), um nuevo agente antifúngico. **Revista iberoamericana de micologia**, Bilbao, v.23, n.2, p.75-80. 2006.

LONDE, L. N. et al. Effects of Benomyl and identification of phytopathogens in MS medium in order to control contamination in micropropagation of *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience journal**, Uberlândia, v.23, n.3, p.94-100, jul./sep. 2007.

LONGHNI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista brasileira de farmacognosia**, Maringá, v.17, n.3, p.388-395, jul./set. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

LORENZI, H; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 704 p.

LUZ, J.; FRANCO, J. **Orquídeas de Roraima**. Brasília: Embrapa, 2012. 181 p.

MARTINI, P. C. et al. Propagação de orquídeas *Gongora quinquenerves* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.36, n.10, p.1319-1324, out. 2001.

MENEGUCE, B.; OLIVEIRA, R. B. D.; FARIA, R. T. Propagação vegetativa de *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Semina: ciências agrárias**, Belém, v.25, n.2, p.101-106, abr./jun. 2004.

MIZUBUTI, I. Y. et al. **Métodos laboratoriais de avaliação de alimentos para animais**. Londrina: EDUEL, 2009. 228 p.

MULLER, T. S. et al. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista brasileira de biociências**, Porto Alegre, v.5, n.2, p.252-254, jul. 2007.

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

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta amazônica**, Manaus, v.38, n.3, p.503-508, 2008.

PEREIRA, A. S.; AQUINO NETO, F. R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química nova**, São Paulo, v.23, n.3, p. 370-379, mai./jun. 2000.

PEREIRA, C. S.; MAIA, L. F. P.; PAULA, F. S. Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. **Revista ceres**, Viçosa, v.61, n.1, p.098-104, jan./fev. 2014.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? In: Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, 9., 2011, Brasília **Políticas públicas e a perspectiva da economia ecológica**. Brasília : Ecoeco, 2011. p. 1-21. Disponível em: <http://www.ecoeco.org.br/publicacoes/encontros/223-ix-encontro-nacional-brasilia-df>. Acesso em: 15 set. 2014.

RODRIGUES, D. T. et al. Chemical sterilization in *in vitro* propagation of *Arundina bambusifolia* Lindl. And *Epidendrum ibaguense* Kunth. **Revista ceres**, Viçosa, v.60, n.4, p.447-451, jul./ago. 2013.

ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.301-307, mar./abr. 2008.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; MARQUES, M. G. **Micropropagação de *Epidendrum ibaguense* - efeito de reguladores de crescimento no desenvolvimento *in vitro* de plântulas**. Porto Velho: Embrapa, 2009. Circular Técnica 105.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; MARQUES, M. G. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* KUNTH. **Plant cell culture e micropropagation**, Lavras, v.6, n.2, p.90-98, jan./jun. 2010.

SANTIAGO, D. M.; FELÍCIO, V. P. T.; SOARES, S. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do *Allium sativum* L. **Revista mineira de ciências da saúde**. Patos de Minas, v.3, p.18-34. 2011.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista brasileira de plantas e medicamentos**, Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446 p.

SCHNEIDERS, D. et al. Germinação, Crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya spp.*, Orchidaceae). **Revista ceres**, Viçosa, v.59, n.2, p.185-191, mar./abr. 2012.

SILVA, E. F.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Culture Medium Knudson modified utilized *in vitro* cultivation of orchid`s hybrid. **Scientia agraria**, Curitiba, v.10, n.4, p.267-274, jul./aug. 2009.

SILVA, R. A. S. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1842-1848, nov./dez. 2006.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) **Revista ceres**, Viçosa, v.57, n.5, p.589-594, set./out. 2010.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia brasileira**, Areia, v. 32, n.6, p. 465-71. 2007.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista brasileira de horticultura ornamental**, Campinas, v.7, n.1, p.25-33, jan.-mar. 2001.

STUCKENBRUCK, P.; AQUINO NETO, F. R. Behavior of phenolic compounds related to Wood tar in quantitative HRGC with on-column injection. **Journal of high resolution chromatography**. v.13, p.209-212, mar. 1990.

TAVARES, A. R. et al. Orchi *in vitro* growth as effected by nitrogen levels in the culture medium. **Horticultura brasileira**, Brasília, v.30, n.1, p.119-124, jan./mar. 2012.

TEIXEIRA, S. P.; TORRES, A. C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, v.1, p. 11-20.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, p. 11-20.

TORRES, R. N. S. T., et al. **Constituintes voláteis de própolis piauiense**. Química nova, São Paulo, v.31, n.3, p.479-485, mar. 2008.

UNEMOTO, L. K. et al. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista brasileira de agrocência**, Pelotas, v.13, n.2, p.267-269, abr./jun. 2007.

VENÂNCIO, P. C. **Composição química e atividade antimicrobiana e de extratos à base de (*Allium sativum* e *Allium tuberosum*) sobre a infecção estafilocócica: estudo *in vitro* e *in vivo*, em ratos**. 47p. Tese (Doutorado em odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2010.

VENDRAME, W. A.; MANGUIRE, I.; CARVALHO, V. S. *In vitro* Propagation and Plantlet regeneration from *Doritaenopsis purple* Gem "Ching Hua" flower explants. **American Society for Horticultural Science**, Florida, v. 4, n. 5, p.1.256-1.258, aug. 2007.

VENTURA, M. G. **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias**. 110p. Tese (Doutorado em fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

VENTUROSO, L. R. et al. Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arquivo do instituto biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.89-95, jan./mar. 2011.

ANEXOS

Anexo 1 - Composição do meio de cultura MS (Murashige; Skoog 1962).

Componentes	Concentração (gL ⁻¹)
Macronutrientes	
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	165
Nitrato de potássio (KNO ₃)	190
Cloreto de cálcio diidratado (CaCl ₂ .2 H ₂ O)	44
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	17
Sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	37
Micronutrientes	
Ferro-EDTA	
Sulfato de ferro hidratado (FeSO ₄ H ₂ O)	2,78
Etileno diaminotetracético dissódico (N ₂ EDTA.2H ₂ O)	3,73
Sulfato de manganês (MnSO ₄ .4H ₂ O)	1,690
Sulfato de zinco heptaidratado (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,860
Sulfato de cobre heptaidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,0025
Molibdato de sódio diidratado (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,025
Iodeto de Potássio (KI)	0,083
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	0,620
Cloreto de cobalto hexaidratado (CoCl ₂ .6 H ₂ O)	0,0025
Compostos orgânicos	
Tiamina.HCl (vitamina B ₁)	0,02
Piridoxina.HCl (vitamina B ₆)	0,1
Ácido nicotínico (vitamina PP)	0,1
Glicina	0,4

Anexo 2 - Especificação técnica dos extratos utilizados no presente experimento de acordo com os laudos de análise

Produto natural	Lote	Concentração	Teor
Alho	5719	10%	55%
Cravo	25559/13	Óleo essencial	-
Própolis	ALL 053785	10%	66%

Anexo 3 - Constituintes químicos identificados no extrato do alho detectado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa, com os tempos de retenção (inicial, final).

Tempo Inicial	Tempo final	Identificação provável
4.070	4.080	Ethylbenzene
4.405	4.415	o- Xylene
4.525	4.535	Benzoic acid, 2-methoxy, methyl ester
4.730	4.740	Hexane, 2,2,3,3-tetramethyl
7.680	7.690	Undecane
11.325	11.335	Undecane
16.965	16.975	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)
20.415	20.425	Disilane, hexakis(4-methylphenyl)
22.670	22.680	Eugenol
24.025	24.035	1-Pentadecene
29.240	29.250	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)
44.595	44.605	Hexadecanoic acid, methyl ester
50.275	50.285	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)
50.480	50.490	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)
51.090	51.100	Octadecanoic acid, methyl ester

Anexo 4 - Constituintes químicos do extrato de cravo detectado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa, com os tempos de retenção (inicial e final).

Tempo Inicial	Tempo final	Identificação provável
4.095	4.105	Benzoic acid, 2-methoxy-, methyl ester
4.130	4.140	Nonane
6.835	6.845	Undecane
6.965	6.975	Undecane
10.455	10.465	Undecane
10.525	10.535	Undecane
14.365	14.375	1-Dodecanol
17.310	17.320	Phenol, 4-(2-propenyl)-
4.095	4.105	Benzoic acid, 2-methoxy-, methyl ester
4.130	4.140	Nonane
5.935	5.945	Benzene, (1,2,2-trimethylpropyl)-
6.585	6.595	1-Decene
6.835	6.845	Undecane
6.965	6.975	Undecane
8.765	8.775	1-Methyl-2-phenylbenzimidazole
9.055	9.065	Di-n-decylsulfone
10.245	10.255	Phenol, 2-methoxy-
10.455	10.465	Undecane
10.525	10.535	Undecane
14.365	14.375	1-Dodecanol
14.560	14.570	Methyl salicylate
14.735	14.745	Dodecane
17.310	17.320	Phenol, 4-(2-propenyl)-

Anexo 5 - Constituintes químicos do extrato da própolis detectados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, com os tempos de retenção (inicial e final).

Tempo Inicial	Tempo final	Identificação provável
5.050	5.060	Oxime-, methoxy-phenyl-
7.525	7.535	Undecane
10.550	10.560	1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine
11.275	11.285	Undecane
15.205	15.215	1-Dodecanol
16.965	16.975	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-
17.150	17.160	2,2'-Bis-trimethylsilylbenzhydryl methyl ether
24.040	24.050	1-Tetradecene
29.260	29.270	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-
32.355	32.365	n-Pentadecanol
5.050	5.060	Oxime-, methoxy-phenyl-
7.525	7.535	Undecane
10.550	10.560	1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine
11.275	11.285	Undecane
13.250	13.260	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
15.205	15.215	1-Dodecanol
16.965	16.975	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-
17.510	17.520	1,2,3-Propanetriol, monoacetate
22.695	22.705	Eugenol
24.040	24.050	1-Tetradecene
29.260	29.270	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-
32.355	32.365	1-Heptadecene
44.605	44.615	Hexadecanoic acid, methyl ester
45.770	45.780	n-Hexadecanoic acid
50.100	50.110	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester
50.280	50.290	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-