

Metodologia Científica: Cultivo in vitro de Unha-de-gato

Introdução

As espécies *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, popularmente conhecidas por unha-de-gato, são trepadeiras lenhosas pertencentes à família das Rubiaceas, originárias da Floresta Amazônica e de outras áreas tropicais das Américas do Sul e Central. Seu nome é derivado dos espinhos semelhantes a ganchos que crescem ao longo da trepadeira e parecem as unhas do gato (Figuras 1 e 2). Conforme Pereira (2004), às duas espécies se atribuem efeitos imunoestimulantes, anti-inflamatórios e inibidores de crescimento de células cancerígenas. Os princípios ativos de maior interesse são os alcaloides oxindólicos e os compostos glicosídeos do ácido quinóico, que demonstram ser os responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios (AQUINO et al., 1991).

As inúmeras propriedades medicinais têm aumentado a demanda por essas plantas, favorecendo assim o desmate e transporte ilegal, podendo provocar uma redução de sua variabilidade genética e até mesmo sua extinção. Torna-se necessário, portanto, o desenvolvimento de técnicas alternativas para a propagação e possível domesticação dessas espécies. Dentre elas, tem-se a micropropagação, que compreende vários métodos de propagação assexuada in vitro, ou seja, no laboratório. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, denominados explantes, são isolados de uma planta matriz, desinfetados e cultivados sob condições assépticas, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado (ANDRADE, 2002). A utilização desse método permite a produção de mudas com alta qualidade fitossanitária, durante todo o ano. Além disso, todo o processo pode ser realizado em um pequeno espaço físico, sob condições controladas.

Entretanto, o uso da unha-de-gato como produto comercial (fitoterápico) apresenta algumas dificuldades, entre elas a falta de homogeneidade na constituição química das plantas comercializadas. Esse problema ocorre pelo fato da matéria-prima ser proveniente de áreas naturais sem nenhum controle de qualidade. Nesse sentido, a tecnologia de clonagem in vitro, apoiada por um trabalho de seleção de características desejáveis, poderá contribuir para a obtenção de plantas com maior homogeneidade e de qualidade garantida (OBREGÓN VILCHES, 1996).

Fotos: Andréa Raposo



Figura 1. *Uncaria tomentosa* com ramos floridos (a); ramos contendo espinhos retos (b).

Fotos: Andréa Raposo



Figura 2. *Uncaria guianensis* com ramos floridos (a); ramos contendo espinhos curvos (b).

Metodologia

Os meios de cultura devem ser distribuídos em tubos de ensaio (20 mm x 150 mm) ou frascos de vidro transparente com capacidade de 250 mL, do tipo maionese, fechados com papel alumínio e tampas plásticas, respectivamente, e autoclavados por 18 minutos a 1,1 Kgf/cm², em temperatura de 121 °C. Antes da autoclavagem, o pH do meio deve ser ajustado em 5,8. As culturas devem ser mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 °C ± 2 °C, dispendo de luminosidade (38 μmol.m².s⁻¹) fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Etapas da micropropagação:

1) Desinfestação e germinação das sementes in vitro

As sementes devem ser lavadas em água corrente e depois em água destilada. Em câmara de fluxo laminar, devem ser desinfestadas com a imersão em álcool etílico a 70% (v/v), por 1 minuto e, em seguida, mergulhadas por 30 minutos em hipoclorito de sódio a 1,5% e lavadas por três vezes em água destilada autoclavada.

Após esse procedimento devem ser inoculadas, individualmente, em tubos de ensaio (20 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura de MS/4 (com 25% da concentração de sais do meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) e WPM (Wood Plant Medium), elaborado por Loyd e McCowb (1980), para *U. tomentosa* e *U. guianensis*, respectivamente, suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar (a quantidade de ágar pode variar de acordo com o fabricante), onde devem permanecer por 60 dias (Figura 3).

Fotos: Renata Beltrão Teixeira



Figura 3. Plântulas de *Uncaria guianensis* em meio de cultura WPM (a) e *Uncaria tomentosa* em meio de cultura MS/4 (b), após 60 dias de inoculação.

2) Multiplicação in vitro

Após 60 dias de incubação, as plântulas germinadas in vitro, em câmara de fluxo laminar, devem ser retiradas dos tubos de ensaio com o auxílio de uma pinça longa e colocadas sobre placas de Petri contendo papel esterilizado. Em seguida, com auxílio de bisturi, as folhas e raízes devem ser retiradas e o caule seccionado, de maneira que os entrenós (segmentos nodais), com aproximadamente 2 cm, permaneçam com pelo menos duas gemas axilares.

Devem ser inoculados de quatro a cinco segmentos nodais por frasco de vidro do tipo maionese (250 mL de capacidade) contendo 30 mL de meio de cultura MS/4 e WPM para *U. tomentosa* e *U. guianensis*, respectivamente, suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar. Não é necessário adicionar citocininas para induzir a formação de brotações múltiplas, já que se mostraram tóxicas para essas espécies, com uma produção massal de calos na base dos explantes (Figura 4).

As culturas devem ser mantidas em sala de crescimento e subcultivadas a cada 30 dias com a renovação do meio de cultura. É possível cultivá-las por até cinco subcultivos sucessivos. O número médio de brotos regenerados por segmento nodal, em cada subcultivo, com a utilização desse protocolo, é de 1,5 broto/explante.

3) Enraizamento

Broto entre 3,0 cm e 4,0 cm de altura devem ser retirados dos frascos, em câmara de fluxo laminar, com pinça longa, e colocados sobre papel toalha, em bancada. Se ocorrer a presença de raízes, devem-se retirá-las com um corte feito na base do explante. Folhas velhas e amareladas também devem ser retiradas. Os brotos devem ser inoculados quatro a cinco por frasco de vidro do tipo maionese (250 mL de capacidade) contendo 30 mL de meio de cultura MS/4 e WPM, respectivamente para *U. tomentosa* e *U. guianensis*, suplementados com sacarose (15 g.L⁻¹), carvão ativado (1,0 g.L⁻¹) e gelificado com ágar (6 g.L⁻¹). As culturas devem permanecer entre 40 e 60 dias em sala de crescimento (Figura 5).

Fotos: Renata Beltrão Teixeira

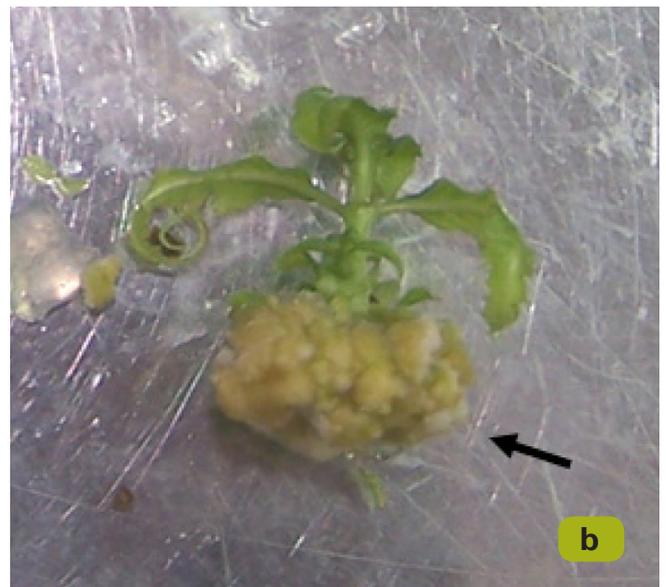
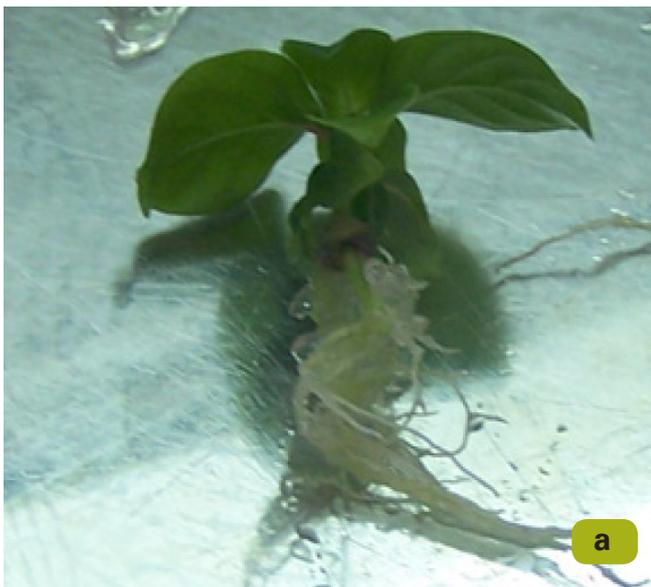


Figura 4. Brotações adventícias de *Uncaria guianensis* oriundas de experimento de multiplicação utilizando a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP): tratamento controle, sem adição de BAP (a); tratamento com 4 mg.L⁻¹ de BAP (b) e presença de calos na base do explante (seta).

Foto: Renata Beltrão Teixeira



Figura 5. Enraizamento de brotações adventícias de *Uncaria tomentosa*.

4) Aclimatização

Após 50 dias, as brotações com raízes devem ser retiradas do meio de enraizamento e lavadas em água destilada por duas vezes para remover o meio de cultura aderido às raízes. Devem-se, então, transferi-las para recipientes plásticos esterilizados com capacidade de 3 litros (câmaras plásticas), contendo uma parte de substrato comercial e uma parte de vermiculita (Figura 6), e incubá-los em câmara incubadora tipo B.O.D., com temperatura de 28 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz. Após 60 dias, as mudas devem ser transferidas para tubetes, contendo substrato comercial, e mantidas em casa de vegetação, por cerca de 3 meses, sendo irrigadas duas vezes ao dia. Passado esse tempo poderão ser plantadas no campo.



Fotos: Renata Beltrão Teixeira



Figura 6. Mudas de *Uncaria guianensis* (a) e *U. tomentosa* (b) em processo de aclimatização em câmaras plásticas, contendo uma parte de substrato comercial e uma parte de vermiculita.

Referências

ANDRADE, M. R. S. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002.

AQUINO, R.; FEO, V. de; SIMONE, F. de; PIZZA, C.; CIRINO, G. Plant metabolites: new compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 453-459, 1991.

LOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

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

OBREGÓN VILCHES, L. **Uña de gato, género *Uncaria***: estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano, 1996.

PEREIRA, R. de C. A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willddenow Ex Roemer & Schultes DC e *Uncaria guianensis* (AUBLET) Gmelin (Unha de Gato)**. 2004. 186 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Circular Técnica, 57

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Acre

Endereço: Rodovia BR 364, km 14, sentido Rio Branco/Porto Velho, Caixa Postal 321, Rio Branco, AC, CEP 69908-970

Fone: (68) 3212-3200

Fax: (68) 3212-3284

<http://www.cpaufac.embrapa.br>

sac@cpafac.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2011): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Maria de Jesus Barbosa Cavalcante

Secretário-Executivo: Suely Moreira de Melo

Membros: Andréa Raposo, Elias Melo de Miranda, Ernestino de Souza Gomes Guarino, Maykel Franklin Lima Sales, Romeu de Carvalho Andrade Neto, Tádario Kamel de Oliveira, Tatiana de Campos, Uilson Fernando Matter, Virginia de Souza Álvares

Expediente

Supervisão editorial: Claudia C. Sena/Suely M. Melo

Revisão de texto: Claudia C. Sena/Suely M. Melo

Normalização bibliográfica: Riquelma de S. de Jesus

Tratamento das ilustrações: Bruno Imbroisi

Editores eletrônicos: Bruno Imbroisi