

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LEANDRO BARROS DOS SANTOS

**MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS: UMA
REVISÃO**

Florianópolis - SC
2023

Leandro Barros dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da UFSC como requisito básico para a obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas. Orientadora: Profa. Dr. Ana Maria Viana

Florianópolis - SC

2023

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos, sua graça foi fundamental para alcançar este objetivo.

Sou imensamente grato à minha orientadora Dra. Ana Maria Viana, por sua compreensão e paciência por ser minha fonte constante de força, pela sua orientação valiosa, incentivo e conhecimento compartilhado ao longo deste trabalho. Suas orientações foram fundamentais para o desenvolvimento deste TCC.

Não posso deixar de expressar minha profunda gratidão à minha esposa Margarete Ferreira, cujo apoio inabalável foi crucial durante os momentos difíceis desta jornada acadêmica. Em um momento em que considerei desistir, seu apoio psicológico e amor incondicional foram a âncora que me sustentou. Suas palavras de estímulo e apoio emocional foram fundamentais para que eu continuasse firme em meu propósito de concluir minha graduação.

Quero expressar minha imensa gratidão aos meus amados filhos, Sophia Kaktin e Deivid Levi, cuja presença em meus pensamentos foi uma constante inspiração. A perspectiva de um dia poder ser uma fonte de inspiração para os estudos de vocês foi meu combustível durante essa jornada acadêmica. O constante apoio de vocês em minha vida foi um lembrete de que meus esforços aqui também influenciam na jornada educacional que vocês estão trilhando.

RESUMO

A micropropagação *in vitro* de plantas medicinais contribui para a conservação da biodiversidade e a sustentabilidade dessas espécies, que estão sob constante pressão devido à exploração excessiva e ao uso não regulamentado. Essa técnica pode ajudar a aliviar a pressão ecológica sobre as plantas, proporcionando um meio para a produção em larga escala de plantas de alta qualidade, minimizando a necessidade de colheita na natureza e contribuindo para a proteção e conservação. O objetivo deste trabalho foi avaliar artigos científicos produzidos no período 2020-2023, através dos levantamentos conduzidos no periódico internacional Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture e na base de dados da plataforma Science Direct. Os artigos foram separados dependendo da finalidade da utilização dos sistemas de micropropagação: produção de óleos essenciais, produção de outros metabólitos secundários, produção em larga escala de mudas e desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro*. Em cada caso os artigos foram avaliados quanto às espécies estudadas, propriedades medicinais, os métodos utilizados, enfatizando o papel das nanopartículas e da utilização de biorreatores de imersão temporária. A análise dos artigos permitiu identificar as seguintes abordagens benéficas na área de micropropagação de plantas medicinais, algumas não usuais, como uso de elicitores bióticos em culturas de ramos para aumentar a produção de metabólitos secundários em larga escala; a utilização de microrganismos endofíticos, para promover o enraizamento das plantas micropropagadas, em substituição aos reguladores de crescimento; adoção de métodos de enraizamento e aclimação das plantas *ex vitro*; desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotróficos, sem adição de sacarose e de outras moléculas orgânicas ao meio de cultura; utilização das nanopartículas nas várias fases da micropropagação e utilização de diferentes tipos de biorreatores de imersão temporária. A intensificação das pesquisas sobre essas abordagens permite prever o desenvolvimento de protocolos cada vez mais otimizados de micropropagação com redução dos custos de produção em larga escala e aumento da qualidade das plantas produzidas.

Palavras-chave: micropropagação, plantas medicinais, metabólitos secundários, conservação *in vitro*, nanopartículas, mudas em larga escala, biorreatores.

ABSTRACT

In vitro micropropagation of medicinal plants contributes to the conservation of biodiversity and the sustainability of these species, which are under constant pressure due to overexploitation and unregulated use. This technique can help relieve ecological pressure on plants by providing a means for large-scale production of high-quality plants, minimizing the need for harvesting in the wild, and contributing to protection and conservation. The objective of this work was to evaluate scientific articles produced in the period 2020-2023, through surveys conducted in the international journal *Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture* and in the database of the Science Direct platform. The articles were separated depending on the purpose of the use of micropropagation systems: production of essential oils and other secondary metabolites, large-scale production of plantlets and development of *in vitro* conservation protocols. In each case, the articles were evaluated regarding the species studied, medicinal properties, and the methods used, emphasizing the role of nanoparticles and the use of temporary immersion bioreactors. The analysis of the articles allowed us to identify the following beneficial approaches in the area of micropropagation of medicinal plants, some unusual, such as the use of endophytic microorganisms, to promote the rooting of micropropagated plants, replacing growth regulators; the adoption of methods of rooting and acclimatization of plants *ex vitro*; development of photoautotrophic micropropagation systems, without the addition of sucrose and other organic molecules to the culture medium; intensification of the use of nanoparticles in the various stages of micropropagation and use of different types of temporary immersion bioreactors. The intensification of research aimed at optimizing these approaches allows us to predict the development of increasingly efficient micropropagation protocols, reducing large-scale production costs and increasing the quality of the plants produced.

Keywords: micropropagation, medicinal plants, secondary metabolites, *in vitro* conservation, nanoparticles, large-scale seedlings, bioreactors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micropropagação de espécies medicinais para a produção de óleos essenciais. Artigos publicados no período 2022-2023. ----- 29

Tabela 2 – Micropropagação para a produção de comercial de mudas de espécies medicinais. Artigos publicados no período 2021-2023. ----- 31

Tabela 3 – Micropropagação para a produção de comercial de mudas de espécies medicinais. Artigos publicados no período 2021-2023. ----- 37

Tabela 4 – Artigos publicados no período (2019-2023) sobre conservação *in vitro* de germoplasma através da criopreservação, por longo prazo ou pelo método de restrição do crescimento, por curto e médio prazo. ----- 45

Tabela 5 – Artigos publicados no período 2020-2023 sobre efeitos das nanopartículas adicionadas ao meio de cultura para otimizar a micropropagação e produção de metabólitos secundários. ----- 53

Tabela 6 – Artigos publicados entre 2020-2023 sobre a utilização de biorreatores de imersão temporária na micropropagação em larga escala de plantas medicinais. --- 59

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AgNPs	Nanopartículas de prata
AgNO₃	Nitrato de prata
BAP	Benzilaminopurina
6-BA	6 - benziladenina
BIT	Biorreator de imersão temporária
°C	Graus Celsius
CuNPs	Nanopartículas de cobre
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
2iP	2 - isopenteniladenina
GA₃	Ácido giberélico
g	Grama
g/L	Gramas por litro
HCl	Ácido clorídrico
IAA	Ácido indol acético
IBA	ácido indolbutírico
L	Litro
LED	Diodo de emissão de luz
LED RGB	Diodo de emissão de luz vermelha, verde e azul
M	Molar
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MS	Meio de cultura Murashige & Skoog
mM	milimolar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
NAA	Ácido α-naftalenoacético
nm	nanômetro
NL	Nitrogênio líquido
PAL	Fenilalanina Amônia Liase

PPDF	Densidade fotossintética de fluxo de fótons
pH	Potencial hidrogeniônico
Q	Quercetina
RCP	Reguladores de crescimento de plantas
SNP	Nitroprussídeo de sódio
TDZ	Tidiazuron
TIS	Sistema de imersão temporária
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	10
2. OBJETIVOS -----	12
2.1. Objetivo geral -----	12
2.2. Objetivos específicos -----	12
3. METODOLOGIA -----	13
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	13
4.1. Micropropagação: histórico e conceitos -----	13
4.2. Fases e fatores que influenciam a micropropagação -----	16
4.2.1. Seleção dos explantes -----	17
4.2.2. Desinfecção dos explantes -----	18
4.2.3. Contaminação das culturas mantidas <i>in vitro</i> -----	19
4.2.4. Oxidação -----	20
4.2.5. Multiplicação, enraizamento e aclimatização -----	21
4.3. Micropropagação de plantas medicinais -----	22
4.3.1. Micropropagação para a produção de óleos essenciais <i>in vitro</i> -	22
4.3.2. Micropropagação para a produção <i>in vitro</i> de outros metabólitos secundários -----	24
4.3.3. Micropropagação para a produção comercial em larga escala de mudas -----	33
4.3.4. Micropropagação para conservação <i>in vitro</i> -----	41
4.3.5. Aplicação da nanotecnologia para otimizar procedimentos utilizados na micropropagação -----	47
4.3.6. Utilização de biorreatores de imersão temporária na micropropagação -----	55
4.3.7. Vantagens e desafios da micropropagação-----	61
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS -----	61
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são fontes de compostos bioativos de importância tanto na medicina popular tradicional de vários países como matéria prima para a fabricação de medicamentos pelas indústrias farmacêuticas e, de acordo com a OMS, mais de $\frac{3}{4}$ da população mundial, principalmente localizada nos países pobres utilizam as plantas medicinais nos primeiros cuidados com a saúde (ARORA *et al.*, 2022).

O consumo de fitoterápicos no Brasil, apesar de representar uma fração do mercado farmacêutico total, mostra um significativo potencial para crescimento, (SILVA *et al.*, 2018). O potencial é ainda mais notório quando se considera a rica biodiversidade do país, pois o Brasil possui a flora mais extensa e diversificada, com mais de 55 mil espécies descritas, representando cerca de 22% do total mundial. Paralelo a essa biodiversidade, nota-se uma tradição robusta no uso de plantas medicinais, evidenciando um acervo considerável de conhecimento tradicional associado (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Entretanto, apesar da riqueza em biodiversidade, o país enfrenta um problema recorrente de exploração predatória e práticas de cultivo inadequadas, as quais têm levado a drásticas reduções nas populações naturais de plantas medicinais. Esta situação resulta na perda de espécies de plantas fontes de metabólitos valiosos, ainda não completamente explorados pela química e farmacologia. É importante citar que diversas espécies de plantas medicinais já tiveram sua eficácia e segurança comprovadas cientificamente, legitimando-as como valiosos recursos terapêuticos. Por outro lado, a exploração ilegal dessas culturas impede o aproveitamento pleno desses benefícios, prejudicando o desenvolvimento de medicamentos baseados em recursos naturais (DE SOUZA, 2019).

No cenário mundial, a pressão sobre as populações naturais de espécies de plantas medicinais, decorrente da demanda crescente de matéria prima pelas indústrias farmacêuticas associada à exploração predatória e à influência de fatores antropogênicos e mudanças climáticas, colocam em risco de extinção e diminuem a variabilidade genética de muitas espécies, principalmente as árvores de importância medicinal (ARORA *et al.*, 2022). Esses autores afirmam que a conservação das espécies de plantas medicinais no ambiente natural pode ser dificultada por vários fatores, entre eles as dificuldades na produção e conservação de sementes, a baixa

eficiência dos mecanismos tradicionais de reprodução vegetativa, processos fundamentais para a produção de mudas e regeneração das populações ameaçadas.

As culturas de células, tecidos e órgãos de plantas desempenham um papel fundamental na investigação dos processos de desenvolvimento das plantas *in vitro*, permitindo o estudo detalhado das bases fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Entre as técnicas de cultura de tecidos disponíveis como abordagens biotecnológica de produção de plantas em larga escala destaca-se a micropropagação (GEORGE *et al.* 2008).

A biotecnologia oferece, portanto, várias estratégias amplamente utilizadas em todo o mundo e que visam otimizar os sistemas de micropropagação de plantas medicinais *in vitro*, para suprir as demandas por plantas de alta qualidade pelas indústrias farmacêuticas (SELWAL *et al.*, 2023; SRIVASTAVA. & CHATUVERDI, 2022). Além disso os sistemas de micropropagação de plantas têm sido utilizados para viabilizar a produção de biomassa de ramos *in vitro*, para aumentar produção de metabólitos secundários de interesse e prover plantas como fontes de explantes, para as abordagens de conservação de germoplasma *in vitro* de plantas medicinais (SHAMITA *et al.*, 2023; SHARMA *et al.*, 2021).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi elaborar uma revisão bibliográfica sobre os artigos científicos publicados no período 2020-2023 sobre micropropagação de plantas medicinais, com a finalidade de avaliar os principais avanços nas metodologias e as tendências futuras na área da micropropagação *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foi, a partir da leitura dos artigos científicos publicados no período 2020-2023 e compilar as informações sobre os seguintes tópicos:

- Espécies estudadas
- Finalidades dos estudos de micropropagação realizados com as plantas medicinais
- Métodos de cultivo clássicos e inovadores adotados em cada abordagem
- Uso das nanopartículas nas diferentes fases da micropropagação das plantas medicinais.
- Uso de biorreatores de imersão temporária no escalonamento da produção de ramos e de plantas micropropagadas.
- Vantagens, dificuldades e perspectivas futuras na área de micropropagação

3. METODOLOGIA

O levantamento bibliográfico sobre micropropagação *in vitro* de plantas medicinais foi realizado no período compreendido entre 2020-2023, para garantir a atualidade e relevância dos estudos analisados.

A pesquisa foi realizada nas bases de dados do periódico internacional Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC) e na plataforma Science Direct, que agrupa vários outros periódicos internacionais. Outras bases de dados foram utilizadas como PubMed, Web of Science, Scopus e Google Scholar.

As palavras-chave utilizadas na busca foram: micropropagation medicinal plants, plant essential oil micropropagation, volatile compounds micropropagation, temporary immersion bioreactor, nanoparticles micropropagation, micropropagation secondary metabolites, clonal micropropagation medicinal plants, micropropagation plant conservation.

Os recursos utilizados foram computador, acesso à internet, acesso à Rede Virtual Privada (VPN) da Universidade Federal de Santa Catarina.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. MICROPROPAGAÇÃO: HISTÓRICO e CONCEITOS

A cultura de tecidos e órgãos vegetais desempenha um papel fundamental na investigação dos processos de desenvolvimento das plantas *in vitro*, permitindo o estudo detalhado de suas bases estruturais, fisiológicas, bioquímicas e moleculares e a capacidade de manipular a morfogênese das plantas está diretamente relacionada à compreensão precisa do conceito de totipotência (GEORGE et al., 2008).

Assim, células, tecidos ou órgãos com diferentes níveis de especialização podem adquirir novas habilidades devido à influência de sinais químicos específicos,

como reguladores de crescimento, que afetam seletivamente a expressão de determinados genes (CASTRO *et al.*, 2017). Isso resulta em dois níveis básicos de resposta morfogênética: a organogênese, que envolve a formação de órgãos a partir de tecidos diferenciados da planta e que induz variabilidade genética e a embriogênese somática, que possibilita a regeneração de embriões somáticos e plantas completas a partir de células indiferenciadas (LÓPEZ-PUC *et al.*, 2018).

Cabe ainda destacar que a compreensão desses processos morfogênicos foi fundamental para o avanço da biotecnologia vegetal e para o desenvolvimento de técnicas mais eficientes de regeneração de plantas *in vitro*, a partir de qualquer tecido da planta. Um outro aspecto a ser considerado é que a regeneração de plantas via organogênese direta, através das células somáticas do explante ou indireta, através dos calos é uma abordagem que gera variabilidade genética somaclonal e não é a adequada para a propagação clonal de mudas. A aplicação adequada dessas técnicas permite a regeneração em larga escala de plantas com várias características desejáveis, como resistência a doenças, tolerância a estresses ambientais e alto potencial agrônomico (LATTUADA, 2019), mas apenas a micropropagação por culturas de meristemas ou de explantes contendo as gemas apicais ou axilares podem conferir a estabilidade genética e viabilizar a clonagem.

A micropropagação envolve a multiplicação clonal em grande escala de um genótipo selecionado, por meio de técnicas de cultura *in vitro*, sendo considerada a ciência e a arte de multiplicar plantas *in vitro*. Dentre as principais vantagens da micropropagação, destacam-se a alta taxa de multiplicação de ramos e produção de plantas, a rapidez do processo, o controle preciso das condições de cultivo, a possibilidade de propagar plantas ao longo de todo o ano, a obtenção de propágulos livres de doenças e pragas, o baixo custo após o estabelecimento e otimização do protocolo, o espaço reduzido necessário com controle do ambiente de cultivo, o armazenamento de germoplasma a longo prazo e a capacidade de propagar plantas que são difíceis de multiplicar por meio das técnicas tradicionais, como sementes, enxertia, estaquia e alporquia (GEORGE *et al.* 2008; SELWAL *et al.*, 2023). A técnica da micropropagação *in vitro*, portanto é amplamente utilizada na propagação comercial clonal de várias espécies vegetais, devido às suas numerosas vantagens.

Um dos eventos que demonstrou a viabilidade da micropropagação como processo comercialmente viável foi o trabalho de Dubois *et al.* (2010), que multiplicou

com sucesso orquídeas por meio da cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, para potencializar a produção de plantas de forma mais rápida e em maior número. Esta aceleração no processo de propagação de orquídeas foi um marco importante para demonstrar a viabilidade dos sistemas de micropropagação (LEROY *et al.*, 2014).

Além de permitir a rápida multiplicação de mudas, pois em condições controladas os cultivos não estão expostos aos efeitos das flutuações climáticas e aos ataques por pestes e patógenos, a produção de plantas saudáveis *in vitro* além de viabilizar a manutenção de acervos de plantas de genótipos selecionados, é fonte de explantes saudáveis para a produção de mudas de alta qualidade continuamente para a agricultura (PÉREZ-TORNERO *et al.*, 2018).

Recentemente, a Embrapa Clima Temperado aprimorou protocolos para a produção de matrizes de morangueiro. Isso possibilitou a produção anual de dezenas de milhares de matrizes, distribuídas pelo Brasil. Embora existam várias empresas de micropropagação no Brasil, a produção de matrizes e mudas ainda não atende totalmente à demanda, demonstrando a necessidade de expansão desta área (SOUZA *et al.*, 2020).

Com o progresso da pesquisa em melhoramento vegetal, novas variedades com características agrícolas desejáveis estão sendo desenvolvidas rapidamente. Isto impulsionou a necessidade de sistemas de produção em larga escala de plantas, para a utilização e distribuição rápida dessas variedades. Pesquisas em cultura de tecidos visam aumento da eficiência da micropropagação para facilitar a comercialização das novas plantas de elite (MISHRA *et al.*, 2019).

A micropropagação tem sido aplicada com sucesso a várias espécies, incluindo hortaliças, ornamentais, frutíferas, medicinais e espécies florestais (DAMIAN *et al.*, 2020). Por exemplo, através da micropropagação, centenas de mudas de bananeira podem ser geradas em oito meses, um número significativamente superior ao que seriam obtidos através de métodos convencionais. Nesse caso várias abordagens biotecnológicas têm sido empregadas, incluindo a micropropagação de vários cultivares com características de tolerância a fatores bióticos e abióticos, para aumentar o valor comercial (JUSTINE *et al.*, 2023).

Da mesma forma, orquídeas, que geralmente levariam cerca de dois anos para produzir uma muda de boa qualidade por métodos convencionais, podem produzir centenas de mudas no mesmo período de tempo através do cultivo *in vitro* (MARTINEZ *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de método fotoautotrófico de micropropagação pode baratear os custos de produção e otimizar as taxas de produção de plantas em função do tempo de cultivo. Nesse método as plantas são mantidas em meio de cultura desprovido de moléculas orgânicas como açúcares, vitaminas e reguladores de crescimento e o explante tem que ser capaz de fazer sua própria fotossíntese para produzir os metabólitos secundários. Para isso a intensidade luminosa e a concentração de dióxido de carbono devem ser ajustadas para promover a fotossíntese e o crescimento das plantas (ZAREI *et al.*, 2021).

A micropropagação é uma realidade comercial em diversos países, principalmente na Europa Ocidental e Estados Unidos (ALVARD *et al.*, 2019). Estudos recentes demonstram que várias empresas em escala mundial utilizam essa tecnologia para atender a demanda de produção de plantas saudáveis e de alta qualidade, de diferentes espécies, utilizando biorreatores para a produção em larga escala, como será abordado nos tópicos subsequentes.

4.2. FASES E FATORES QUE INFLUENCIAM A MICROPROPAGAÇÃO

Com base no trabalho de George *et al.* (2008), o processo de micropropagação *in vitro* é dividido em três estágios: o estabelecimento das culturas assépticas é o primeiro estágio e envolve a seleção do genótipo saudável a ser micropropagado, a escolha dos explantes, a desinfecção e a inoculação em um meio cultura esterilizado. O segundo estágio é caracterizado pela multiplicação dos ramos, através de subculturas sucessivas em meio de cultura contendo reguladores de crescimento, em especial citocininas na proliferação de gemas meristemáticas que produzirão múltiplos ramos é promovida. Esse processo é fundamental para aumentar a taxa de multiplicação e maximizar a produção de mudas a partir do explante inoculado.

Os ramos produzidos na fase de multiplicação são transferidos para o meio de cultura contendo auxinas, para promover o enraizamento e a produção da planta

completa. Uma vez enraizadas as plantas produzidas são transplantadas para um substrato ou solo, para a aclimação *ex vitro*. Nessa fase os efeitos dos estresses hídrico, nutricional e de exposição aos patógenos do ambiente devem ser minimizados para as plantas se adaptarem às condições do crescimento *ex vitro* e tornarem-se autotróficas, independentes da sacarose e dos nutrientes presentes no meio de cultura (GEORGE *et al.*, 2008).

Na transição do meio de cultura para o estado autotrófico da situação *ex vitro*, as plantas sofrerão modificações para otimizar a capacidade de realizar a fotossíntese e adquirir nutrientes por meio de suas próprias raízes. Essa transição exige cuidados especiais de manutenção das plantas em ambientes com umidade relativa controlada, para garantir a sobrevivência das plantas nos estágios iniciais de remoção do meio de cultura para a condição *ex vitro*.

Alguns dos fatores que podem interferir nas fases da micropropagação mencionadas acima e interferir no fracasso ou sucesso dos sistemas de micropropagação de plantas *in vitro* e que serão considerados a seguir são: a seleção dos explantes adequados, a eficiência do processo de desinfecção, a contaminação que pode ocorrer nos sistemas já estabelecidos, a oxidação dos explantes.

4.2.1. Seleção dos explantes

É importante ressaltar que a escolha adequada do explante utilizado na cultura de tecidos é crucial para o sucesso da micropropagação. Os explantes preferidos são geralmente aqueles de natureza juvenil, obtidos a partir de plantas jovens produzidas a partir de sementes inoculadas *in vitro* ou a partir de partes jovens de plantas adultas, pois apresentam maior capacidade de crescimento. Ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são explantes frequentemente utilizados devido à eficiência na regeneração de plantas *in vitro* (DE ARAÚJO CARVALHO, 2019).

Os tipos de explantes utilizados na micropropagação clonal são segmentos de pontas dos ramos, contendo as gemas apicais e alguns primórdios foliares; segmentos nodais, contendo as gemas axilares; gemas apicais e axilares isoladas e domos meristemáticas devem ser obtidos de plantas saudáveis, estar em crescimento ativo, livres de estresse e de pragas ou doenças. Os ápices caulinares, que são

regiões de intenso crescimento no caule compostas por tecidos meristemáticos, são altamente proliferativos e têm uma alta capacidade de diferenciação celular. As gemas axilares, que são estruturas localizadas nas axilas das folhas, com alta atividade meristemática, são igualmente aptas para regeneração de novos ramos e de plantas inteiras, a partir do momento em que os ramos gerados são enraizados. Meristemas isolados são tecidos meristemáticos específicos retirados de uma planta e têm a capacidade formarem novas plantas se forem cultivados *in vitro*, mantendo a fidelidade genética, importante nos processos de clonagem de genótipos.

Com base em recentes estudos descritos por Mishra *et al.* (2019), a seleção do tamanho do explante é associada com múltiplos fatores como a capacidade de regeneração do tecido, a taxa de multiplicação celular, o fornecimento adequadamente balanceado de nutrientes e hormônios e minimização de potenciais contaminações. Em algumas situações, explantes menores podem apresentar melhor sobrevivência e desenvolvimento dos que os explantes maiores, que podem apresentar maior resistência no início do processo de estabelecimento *in vitro*.

4.2.2. Desinfecção dos explantes

Essa fase requer a manutenção de condições assépticas para prevenir a contaminação dos explantes com microrganismos e patógenos externos, um ponto fundamental para qualquer processo de cultura de tecidos bem-sucedido.

O processo de desinfecção, conforme descrito por Mishra *et al.* (2019), inicia-se com o tratamento da planta original, que visa combater microrganismos presentes. Para plantas cultivadas em campo, recomenda-se a coleta de ramos jovens em crescimento ativo na fase inicial de brotação. A desinfecção de tecidos infectados internamente é desafiadora e, se fungos ou bactérias internos forem encontrados, é aconselhável a busca por outras fontes de material vegetal, preferindo-se as plantas cultivadas em ambientes controlados.

O tipo de agente esterilizante mais comum utilizado na desinfecção é o hipoclorito de sódio puro ou comercial, mas outros agentes são utilizados como o

álcool 70%, cloreto de mercúrio. Vários tipos de antibióticos podem ser utilizados para conter a contaminação endógena. Detergentes como Tween 20, facilitam o contato dos agentes esterilizantes com o tecido vegetal ao reduzir a tensão superficial. O detergente é usado em pequena quantidade, sendo que a concentração e o tempo de exposição aos agentes desinfectantes podem variar conforme o tamanho e a natureza do tecido.

Mahajan *et al.* (2022) apontam as nanopartículas de prata como agentes de desinfecção de alta eficácia, em várias espécies de plantas, sendo usadas, isoladamente ou em combinação com os vários agentes esterilizantes convencionais e podendo também serem adicionadas ao meio de cultura, para combater a infecção por fungos e bactérias.

4.2.3. Contaminação das culturas mantidas *in vitro*

A técnica de micropropagação em plantas, frequentemente enfrenta o desafio da contaminação por microrganismos, tanto superficiais quanto internos (contaminação endógena), que pode limitar o estabelecimento bem-sucedido do cultivo *in vitro* de certos explantes (LATA *et al.*, 2019). As contaminações bacterianas e fúngicas são os problemas mais comuns na micropropagação, com a contaminação bacteriana geralmente resultante da contaminação endógena dos explantes e plântulas. Já a contaminação fúngica tende a ocorrer por problemas na manipulação durante o subcultivo, pela presença de esporos no ambiente, bem como por infestações de ácaros. Para atenuar esses problemas, esses autores sugerem o cultivo da planta doadora em condições parcialmente controladas, como casas de vegetação ou em áreas cobertas com tela. Esta medida permite um melhor controle sobre a irrigação, adubação e o manejo de pragas e doenças, reduzindo assim o risco de contaminação.

4.2.4. Oxidação

Os danos mecânicos causados aos explantes durante a inoculação estimulam a produção das enzimas polifenolases, que oxidam os compostos fenólicos. A oxidação de compostos fenólicos presentes nos explantes representa um dos problemas mais críticos na fase inicial de estabelecimento do cultivo *in vitro* de várias espécies, pois os compostos fenólicos oxidados exsudam para o meio de cultura, formando uma barreira ao redor dos explantes tornando difícil a absorção de nutrientes e inibindo o crescimento celular (JUSTINE *et al.*, 2022).

A oxidação fenólica na micropropagação de plantas é altamente influenciada por fatores variáveis, como a espécie e o genótipo da planta, bem como o tipo de explante utilizado (BILAL *et al.*, 2017). Esses autores relatam que normalmente, explantes mais jovens apresentam taxas de oxidação mais baixas em comparação com explantes mais velhos. Da mesma forma, o momento do ano também tem um impacto significativo na oxidação, com períodos mais propícios ao crescimento das plantas demonstrando menores taxas de oxidação fenólica dos explante.

A adição de compostos antioxidantes (como cisteína e ácido ascórbico) e adsorventes (como carvão ativado e PVP) ao meio de cultura pode ser crucial na prevenção da oxidação. Isso é particularmente importante nas fases iniciais do cultivo, onde a oxidação tende a ser mais pronunciada (BILAL *et al.*, 2017). O ácido ascórbico sequestra as espécies reativas de oxigênio (ROS) que são formadas na região de corte do explantes, minimizando os danos a serem causados nas células (JUSTINE *et al.* 2022). Os efeitos da oxidação podem ser minimizados pelo cultivo em meio líquido, principalmente nos biorreatores de imersão temporária, em que as moléculas dos compostos fenólicos oxidados são liberadas e diluídas no meio de cultura (MIRZABE *et al.* 2022).

4.2.5. Multiplicação, enraizamento e aclimação

Vários fatores podem influenciar a fase de multiplicação de ramos como o genótipo, o meio de cultura, os reguladores de crescimento, o tipo de meio de cultura sólido, líquido ou a cultura em biorreatores de imersão temporária, os fatores físicos como temperatura, intensidade luminosa, tipo de fonte luminosa (fluorescente ou LED) (JUSTINE *et al.*, 2022).

O meio de cultura utilizado nos sistemas de micropropagação contém todos os nutrientes essenciais (macronutrientes e micronutrientes), além de vitaminas e reguladores de crescimento. Também são necessárias fontes adequadas de carbono e oxigênio. Vários tipos meios de cultura podem ser usados, mas o meio Murashige e Skoog (MS) contém todos os componentes necessários para o crescimento adequado das plantas cultivadas. Isso inclui macronutrientes inorgânicos, micronutrientes inorgânicos, vitaminas, fontes de nitrogênio orgânico, açúcares, reguladores de crescimento e, se for caso disso, componentes orgânicos opcionais e agente gelificante (GEORGE *et al.*, 2018).

O nível endógeno e de atividade de citocininas em certos genótipos pode ser muito baixo e diminuir a proliferação de ramos, sendo necessário suplementar o meio de cultura com níveis exógenos maiores de citocininas para aumentar as taxas de multiplicação (JUSTINE *et al.*, 2022). Para ser eficaz, o protocolo de cultura de tecidos deve ser cuidadosamente desenvolvido para cada tipo de planta a ser micropropagada. Isso inclui não apenas a seleção da composição do meio MS adequado, mas também o uso dos corretos reguladores de crescimento (GEORGE *et al.*, 2018).

As culturas podem ser estabelecidas em meio líquido ou sólido sendo que, no caso das culturas líquidas, será necessário garantir uma agitação adequada para permitir a aeração dos explantes. Caso contrário, o explante pode ser inoculado sobre algodão ou 'pontes' de papel para prevenir a submersão (GEORGE *et al.*, 2018). Além desses tipos de meio de cultura o cultivo pode ser realizado em diferentes tipos de biorreatores de imersão temporária (JUSTINE *et al.*, 2022).

Na fase de enraizamento as auxinas desempenham papel fundamental, em especial o ácido indolbutírico, por estimular a iniciação do primórdio radicular, através do estímulo à divisão celular, diferenciação e crescimento e o carvão ativado também pode ser necessário, dependendo da espécie. Vários fatores podem interferir no sucesso de aclimação das plantas como o genótipo, a temperatura, a umidade, a composição do substrato e o genótipo da planta micropropagada (GEORGE *et al.* 2018).

4.3. MICROPROPAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

A multiplicação de plantas medicinais *in vitro* é uma estratégia fundamental para a preservação e propagação dessas espécies importantes para as indústrias farmacêuticas. Vários autores têm estudado e revisado este tema em suas pesquisas, como veremos em seguida.

Sistemas de micropropagação de plantas medicinais tem sido utilizados na multiplicação clonal em larga escala para viabilizar o suprimento de mudas de genótipos selecionados, para viabilizar a produção de biomassa de ramos utilizados na produção de metabólitos secundários, como óleos essenciais e outros metabólitos, que são melhor produzidos por ramos e folhas e também para fornecer explantes contendo as gemas axilares e apicais no desenvolvimento de sistemas de conservação de germoplasma *in vitro*.

Abaixo são apresentados exemplos de estudos publicados recentemente sobre espécies medicinais em que micropropagação foi utilizada para atingir esses objetivos.

4.3.1. Micropropagação para a produção de óleos essenciais *in vitro*

A Tabela 1 mostra a lista de artigos científicos sobre a micropropagação de plantas medicinais aromáticas, para a produção de óleos essenciais publicados apenas no período 2022-2023 no periódico Plant Cell Tissue and Organ Culture e na base de dados da plataforma Science Direct.

Para cada uma das espécies são apresentadas na Tabela 1 as propriedades medicinais, os métodos utilizados na micropropagação e os fatores manipulados, os resultados na produção de óleos essenciais e de outros metabólitos secundários, cujos tipos variaram conforme a espécie e as referências dos artigos.

Foram publicadas 5 revisões sobre as seguintes espécies de plantas medicinais mais utilizadas na medicina popular: *Foeniculum vulgare* (erva-doce-nacional, a maioria dos compostos bioativos são voláteis monoterpênicos, diterpenos, sesquiterpenos e compostos majoritários anetol e estragol) (JADID *et al.*, 2023), *Ocimum sanctum* (manjeriço sagrado) (KUMARI *et al.*, 2022), *Basilicum polystachyon* (DAS *et al.*, 2023), *Artemisia annua* (SONI *et al.*, 2022) e *Carlina acaulis* (SPINOZZI *et al.*, 2023) Além das revisões foram publicados outros artigos científicos sobre *Lavandula stoechas* (ASADOLLABEI *et al.*, 2023), *Mentha spicata* (BHARATI *et al.*, 2023) e *Zataria multiflora* (ASADOLLABEI *et al.*, 2022).

É possível observar na Tabela 1 que em todos os estudos o objetivo foi desenvolver sistemas de micropropagação e estimular a produção *in vitro* de compostos específicos, principalmente os óleos essenciais. Esses compostos voláteis normalmente são produzidos em glândulas secretoras presentes nas folhas de várias plantas medicinais. Os tipos de explantes utilizados para iniciar a micropropagação nos diferentes estudos citados foram gemas apicais de plântulas germinadas *in vitro*, pontas de ramos contendo as gemas apicais de plantas adultas (*Lavandula stoechas*, *Carlina acaulis*, *Basilicum polystachyon*, *Zataria multiflora*, *Foeniculum vulgare*) e segmentos nodais contendo gemas axilares (*Mentha spicata*, *Foeniculum vulgare*).

Os métodos utilizados para potencializar a produção de óleos essenciais e outros compostos fenólicos variaram de acordo com a espécie estudada, desde a manipulação de reguladores de crescimento no meio de cultura, estratégia utilizada na maioria das espécies, até a adição de elicitores ao meio de cultura, como quitina e nanopartículas de cobre (CuONPs). Essas nanopartículas estimularam a produção de lavandulol e outros compostos fenólicos em *Lavandula stoechas* e quando adicionadas ao meio de cultura *Zataria multiflora* estimulou a produção de timol e carvacrol (ASADOLLABEI *et al.*, 2023; ASADOLLABEI *et al.*, 2022).

Em *Mentha spicata*, a abordagem utilizada para estimular a produção de óleos essenciais foi através da adição de orizalina, agente anti-mitótico, ao meio de cultura para induzir a produção de plantas poliploides, que produziram maiores quantidades

de óleos essenciais e de outros compostos aromáticos majoritários como carvona, limoneno, carveol e acetato de dihidrocarvil (BHARATI *et al.*, 2023)

Uma das plantas medicinais mais utilizada pelo setor das indústrias farmacêuticas é *Ocimum sanctum* e vários esforços têm sido utilizados para otimizar a taxa de multiplicação, com otimização da produção em massa de plantas e a produção de metabólitos secundários utilizando diferentes técnicas biotecnológicas, como a utilização de elicitores bióticos e abióticos (KUMARI *et al.*, 2022). Esses autores relatam vários estudos realizados sobre a micropropagação de *O. americanum* e *O. sanctum*, utilizando as gemas axilares como explantes e protocolos completos para a máxima multiplicação de ramos, visando potencializar a produção de mudas e a produção de compostos de interesse *in vitro* foram desenvolvidos.

Em todos os cultivares de *Artemisia annua* a artemisina, composto antimalárico, é produzida apenas nos tricomas glandulares, em apenas pequenos grupos de células, o que causa uma limitação na biossíntese e dificulta a produção em quantidade suficiente para atender a demanda global (JUDD *et al.*, 2019). Esses autores relatam que a baixa quantidade de tricomas (apenas 2% da biomassa seca da planta) torna a produção de artemisina baixa e instável. Além disso, nos tricomas ocorre também a biossíntese de grande número de óleos essenciais, cuja biossíntese pode competir e diminuir ainda mais a biossíntese da artemisina. Através de autopolinização foram produzidas plantas que expressaram a via biossintética para a produção de artemisina em folhas sem tricomas. Foram induzidos calos a partir de segmentos dessas folhas inoculados *in vitro*, que regeneraram plantas que foram micropropagadas, a partir da cultura de segmentos nodais e formação de ramos múltiplos, gerando plantas produtoras de artemisina por folhas sem tricomas glandulares, o que otimizou a produção (JUDD *et al.*, 2019).

4.3.2. Micropropagação para a produção *in vitro* de outros metabólitos secundários

A Tabela 2 apresenta um sumário dos artigos científicos publicados no período 2020-2023, em que a micropropagação foi utilizada para gerar biomassa de ramos para a produção de metabólitos secundários de interesse, mostrando a espécie, os

metabólitos de interesse produzidos pelas plantas, os tipos de cultura utilizadas e os elicitores utilizados para aumentar a produção.

Entre os artigos listados na Tabela 2 aparecem duas revisões sobre as espécies *Hypericum perforatum* (SHAMITA *et al.*, 2023) e *Catharanthus roseous* (ACHARJEE *et al.*, 2022), duas espécies medicinais importantíssimas para a produção de antidepressivo e antitumoral, respectivamente, pelas indústrias farmacêuticas. Nessas revisões os autores descrevem as várias estratégias biotecnológicas utilizadas para aumentar a produção de alcalóides em diferentes sistemas de culturas *in vitro* como micropropagação, culturas de calos, suspensões celulares, culturas de raízes e culturas embriogênicas, incluindo a engenharia genética (transformação genética e edição de genes) e aplicação das técnicas de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica em *Catharanthus roseous* (ACHARJEE *et al.*, 2022).

A análise da Tabela 2 indica que as culturas de ramos foram realizadas em meio sólido, líquido sem agitação ou com agitação, dependendo da espécie estudada. Em meio líquido a proliferação e o crescimento dos ramos é aumentada, devido à otimização da absorção dos nutrientes e outras moléculas presentes no meio de cultura, pelo melhor contato dos tecidos vegetais com os componentes do meio de cultura (MIRZABE *et al.*, 2022).

Observa-se na Tabela 2 que diferentes estratégias foram empregadas para potencializar a produção dos metabólitos secundários como a iluminação das culturas com diferentes tipos de LED (*Nasturtium officinale*) (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ *et al.*, 2022); o fornecimento de precursores específicos para otimizar as vias de biossíntese do composto (*Aronia sp.*, *Hypericum perforatum*) (SZOPA *et al.*, 2020; SHAMITA *et al.*, 2023); a adição de óxido nítrico ao meio de cultura, sinalizador dos mecanismos de defesa antioxidantes que leva à biossíntese de polifenóis (*Scutellaria lateriflora*, *Salvia abrotanoides*) (KAWAKA *et al.*, 2020; ROSTAMI *et al.*, 2022); manipulação de reguladores de crescimento (IAA, BA, metil jasmonato e ácido jasmônico (*Musa spp.*, *Schisandra henryi*, *Chamerion angustifolium*, *Hypericum perforatum*, *Catharanthus roseous*); elicitor abiótico UV (*Catharanthus roseous*). Em *Hypericum perforatum* a produção de hiperecina e pseudohiperecina aumentou com a adição de outros elicitores como pectina, dextrina, ácido cinâmico e nanoperlites (partículas do mineral perlita) e outros reguladores de crescimento como BA e IAA (SHAMITA *et al.*, 2023).

Bhaskar *et al.* (2022) ressaltam, nessa revisão, a importância da utilização de elicitores bióticos como bactérias, fungos, algas e polissacarídeos (alginato, agropectina, carragenano, quitina, quitosana, dextrana, laminarina, manana, pectina, ulvana, extrato de levedura, polissacarídeos de extrato aquoso de micélios) na produção de metabólitos secundários, por diferentes tipos de culturas *in vitro* de espécies medicinais (culturas de calos, raízes, suspensões celulares e culturas de ramos). Essa estratégia, ao lado de outras como a manipulação do meio de cultura, fornecimento de precursores, biotransformação e o uso de biorreatores na micropropagação contribuíram para superar a limitação da produção de compostos bioativos *in vitro*.

Os autores relatam ainda que poucos são os artigos que utilizam os elicitores bióticos em culturas de ramos. Entre os 59 artigos que listam na revisão, em que bactérias foram utilizadas, são citados apenas 3 artigos científicos com a utilização de elicitores bióticos em culturas de ramos: em culturas de ramos de *Dionaea muscipula* a *Cronobacter sakazakii* promoveu a produção de fenólicos; (*Pseudomonas* sp em culturas de ramos de *Rosmarinus officinalis* promoveu a produção de ácido rosmarínico e em culturas de ramos de *Hypericum perforatum*, a *Stenotrophomona maltophilia* e *Pseudomonas fluorescens* promoveram a produção de hipericina e pseudohipericina.

Entre os 17 artigos citados na revisão de Bhaskar *et al.* (2022), em que foram utilizados fungos como elicitores, apenas um foi em culturas de ramos axilares de *Centella asiática* em que a elicitação com *Colletotrichum lindemuthianum* provomeu a produção de asiaticosídeo. Na lista de artigos de elicitação com algas entre 16 citações apenas em 2 foram em culturas de ramos: em cultura de ramos de *Capsicum frutescens* a produção de vanilina, vanililamina e capsaicina foi promovida por *Botryococcus braunii* e em culturas de ramos de *Picrorhiza kurroa* a produção de picrosídeo-I foi promovida por *Kappaphycus alvarezii*.

Entre 53 citações sobre a utilização de polissacarídeos na elicitação apenas 10 citações são com culturas de ramos: quitina, pectina, alginato e extrato de levedura promoveram a produção de esteviosídeo em *Stevia rebaudiana*; em *Hypericum adenotrichum* a adição de manana promoveu a produção de hipericinas; ulvana promoveu a produção de ácido glucurônico em *Phaseolus vulgaris* e de fenólicos em *Olea europae*;, em *Fagopyrum tataricum* extrato de levedura promoveu a produção de

flavonoides; quitosana promoveu a produção de compostos fenólicos em *Brassica oleracea* e de compostos fenólicos e flavonoides em *Fagonia indica*.

Bhaskar *et al.* (2022) ressaltaram o grande potencial ainda a ser explorado sobre a aplicação de elicitores bióticos às culturas de ramos de maior número de espécies medicinais, para otimizar a produção de metabólitos secundários por sistemas de micropropagação em larga escala.

Tabela 1. Micropropagação de espécies medicinais para a produção de óleos essenciais. Artigos publicados no período 2022-2023

Espécie/importância	Método de cultura	Resultados	Referências
<i>Lavandula stoechas</i> (Indústrias de alimentos, farmacêutica e de perfumes)	Gemas apicais de plântulas produzidas a partir da germinação <i>in vitro</i> de sementes foram cultivadas <i>in vitro</i> em 1 mg/L BAP e 0,1 mg/L thidiazuron, elicitores quitina, CuONPs	Os elicitores promoveram a produção de fenólicos, flavonoides, antocianinas, lavandulol, 1,8-cineol, germacreno D e E-nerolidol nas plantas micropropagadas	Asadollabei <i>et al.</i> (2023)
<i>Mentha spicata</i> (medicinal, problemas digestivos, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anticâncer, antidiabético, anti-inflamatório devido aos óleos essenciais)	Segmentos nodais micropropagados tratados com orizalina no meio de cultura, para induzir plantas poliploides e aumentar a produção.	Aumentou em 49% o teor de óleos essenciais, compostos aromáticos majoritários carvona e limoneno além de carveol, acetato de dihidrocarvil nas plantas poliploides cultivadas <i>in vitro</i>	Bharati <i>et al.</i> (2023)
<i>Foeniculum vulgare</i> (gastrointestinal, desordens hormonais, doenças reprodutiva e respiratória, atividade anti-oxidante, antimicrobiana, anti inflamatório, anti ansiedade, anticâncer)	Segmentos nodais cotiledonares, gemas apicais e laterais em meio de cultura contendo 1mg/L BAP e 29,9 µM de sulfato de zinco, para multiplicação de ramos.	Produção de mudas e fonte de explantes para calos e suspensões celulares para produzir alcalóides, fenólicos, ácidos graxos, amino ácidos, óleos essenciais, mono-, di- e sesquiterpenos, anetol, estragol.	Jadid <i>et al.</i> (2023)
<i>Ocimum sanctum</i> (fonte de medicamentos para indústrias farmacêuticas, antioxidantes e metabólitos secundários benéficos no tratamento de várias doenças)	Gemas axilares inoculadas em meio de cultura contendo 1mg/l BA e 0,5 mg/L GA; enraizamento em 1 mg/l NAA, máxima multiplicação com 0,2 mg/L BAP.	Produção de mudas, fontes de antioxidantes e compostos fenólicos, óleos essenciais (eugenol).	Kumari <i>et al</i> (2022)
<i>Basilicum polystachyon</i>	Pontas de ramos contendo gemas apicais em meio de cultura com BAP e cinetina, enraizamento dos ramos em meio com AIB.	Propagação clonal em larga escala para a produção de óleos essenciais,	Das <i>et al.</i> (2023)

(utilizado na Asia e Africa na etnomedicina para tratamentos de várias doenças)		ácidos fenólicos (ácido cafeíco, p-cumárico e rosmarínico)	
<i>Artemisia annua</i> (erva medicinal utilizada comercialmente com propriedades anti-malárico, anti-tumor, anti-oxidante, anti-fúngico, anti inflamatórios, anti protozoários)	Micropropagação e manipulação genética para otimizar a produção por plantas.	Promoveu a produção de artemisina e monoterpenos, sesquiterpenos e outros óleos essenciais, canfora, cariofileno, flavonoides, compostos alifáticos e cumarinas	Soni <i>et al</i> (2022)
<i>Carlina acaulis</i> (uma das mais importantes plantas medicinais da Europa, propriedade diurética, antibacteriana, antifúngica, tratamento de gastrite, doenças da pele, acne, eczema, úlceras. Inseticida, acaricida,	Pontas de ramos de plântulas cultivadas em meio de cultura com combinações de BAP, cinetina e zeatina e NAA, enraizamento em NAA e IAA, aclimação em mistura areia:vermiculita (1:1).	Plantas micropropagadas crescidas no campo para a produção de triterpenos, polifenóis, compostos voláteis, poliacetilenos, inseticida acaricida floresceram e produziram sementes.	Spinozzi <i>et al.</i> (2023)
<i>Zataria multiflora</i> (utilizada nas indústrias farmacêutica e de alimentos)	Gemas apicais em meio de cultura contendo BAP e TDZ, enraizamento em meio de cultura com AIB, foram expostas a elicitores adicionados ao meio de cultura, incluindo quitina e CuONPs de óxido de cobre e analisadas após 5-10 dias	Plantas micropropagadas produziram níveis maiores de antocianinas, fenólicos totais, flavonois flavonoides e dos óleos essenciais timol e carvacrol, dependendo da concentração de CuONPs	Asadollahei <i>et al.</i> (2022)

Tabela 2. Micropropagação para produção de biomassa de ramos e produção de compostos fenólicos, alcalóides e outros compostos. Artigos publicados no período 2020-2023.

Espécies	Metabólitos de interesse	Método de cultura/elicitores	Referências
<i>Aronia melanocarpa</i> <i>Aronia arbutifolia</i>	Ácido neoclorogênico, clorogênico, criptoclorogênico, isoclorogênico e rosmarinico, cafeico, antioxidantes	Culturas de ramos em meio líquido MS com BA e NAA, com agitação fornecendo os precursores fenilalanina, ácido cinâmico, ácido benzoico e ácido cafeico resultou em alta produção de depsídeos (ácido cafeico e ácido ferúlico).	Szopa <i>et al.</i> (2020)
<i>Eryngium alpinum</i>	Ácidos fenólicos e flavonoides	Cultura de ramos em meio semi-sólido e líquido estacionário ou com agitação MS com BAP, IAA e GA ₃ , melhor proliferação de ramos, maior acúmulo de ácidos fenólicos e flavonóides.	Kikowska <i>et al.</i> (2020)
<i>Scutellaria lateriflora</i>	Tratamento de epilepsia, flavonoides e verbascosídeo	Cultura de ramos em agitação, meio MS semi-sólido com BA e NAA gerou maiores níveis de flavonoides e verbascosídeo meio líquido com agitação e com precursor hidroquinona por biotransformação aumentou os níveis de arbutina	Kawka <i>et al.</i> (2020)
<i>Schisandra henryi</i>	Lignanas e ácidos fenólicos, flavonoides, triterpenoides	Cultura de ramos, MS semi-sólido com BA, IBA, GA ₃ produziu maiores níveis de lignanas e triterpenoides.	Jaferník <i>et al.</i> (2020)
<i>Chamerion angustifolium</i>	Oenoteína B e ácidos fenólicos	Cultura de ramos em meio MS sólido com 2iP produziu maiores níveis de oenoteína e ácidos fenólicos.	Dreger <i>et al.</i> (2020)
<i>Musa</i> spp.	Fenólicos totais e atividade antioxidante	Culturas de ramos, MS semi-sólido com IAA, BAP, elicitores 200 µM de ácido jasmônico, temperaturas de 20°C, sacarose (40-45 g/L) aumentou os fenólicos totais e atividade antioxidante.	Ayoola-Oresanaya <i>et al.</i> (2021)
<i>Nasturtium officinale</i>	Glicosinolatos e compostos fenólicos e antioxidantes	Culturas de ramos, MS semi-sólido com NA e NAA, diferentes comprimentos de onda de LED RGB (50% verde, 35% vermelho, 15% azul) produziu maior biomassa, maior nível de glicosinolatos.	Klimek-Szczykutowicz <i>et al.</i> (2022)

<i>Salvia abrotanoides</i>	Ácidos fenólicos, ácido rosmarínico.	Cultura de ramos, meio MS semi-sólido com cinetina, IAA elicitados com sodium nitroprussídeo (SNP doador de oxido nítrico (NO) induziu acúmulo de ácido rosmarínico e outros ácidos fenólicos	Rostami <i>et al.</i> (2022)
<i>Catharanthus roseous</i>	Antitumoral, alcaloides, vincristina, vimblastina, ajmalicina, vindolina, catarantina	Micropropagação para produção de mudas e biomassa para produção de alcalóides, vindolina alcaloide majoritário derivado de culturas de ramos, vimblastina produção muito maior associada com a multiplicação de ramos. Culturas de ramos mostraram aumento na produção de leurosina e vimblastina após exposição ao UV, IAA e BA aumentaram a produção de ajmalicina e culturas de ramos, maior do que em folhas de plantas em condições naturais.	Acharjee <i>et al.</i> (2022)
Várias espécies de plantas medicinais	Elictores bióticos estimulam produção de metabólitos secundários	Culturas de ramos elicitadas com bactérias, fungos, algas e polissacarídeos aumentaram os níveis de ácido rosmarínico, hipericina e pseudo hipericina, compostos fenólicos, vanilina, vanililamina, capsaicina em culturas de ramos de algumas espécies medicinais.	Bhaskar <i>et al.</i> (2022) pctoc ssung
<i>Tuberaria lignosa</i>	Antioxidante, antitumoral, enzimas antioxidantes	Cultura de ramos apicais, meio MS com BAP para suprir mudas de alta qualidade para a indústria farmacêutica. Plantas aclimatadas aumentaram a atividade de enzimas antioxidantes.	Rebelo <i>et al.</i> (2022)
<i>Hypericum perforatum</i>	Antidepressivo, flavonoides, naftodiantronas, hiperforina, quercetina, rutina, ácidos fenólicos	Cultura de ramos em meio MS líquido, agitação 140 rpm, a produção dos metabólitos secundários hiperecina e pseudohiperecina foi promovida por aminoácidos precursores; metil jasmonato, pectina, dextrina, nano-perlites ácido cinamico, reguladores de crescimento (BA e IAA) e sacarose.	Shamita <i>et al.</i> (2023)

4.3.3. Micropropagação para a produção comercial em larga escala de mudas

A Tabela 3 mostra um resumo das principais informações sobre os 11 artigos científicos publicados no período 2021-2023, citando a espécie de plantas estudadas, as propriedades medicinais e objetivos do trabalho, os métodos de micropropagação utilizados e as referências. Os protocolos de micropropagação foram desenvolvidos, com sucesso, para viabilizar a produção comercial clonal em massa de mudas de várias espécies de plantas medicinais. Entre os 11 artigos foi publicada uma revisão sobre espécies de árvores medicinais (ARORA *et al.*, 2022).

Observa-se na Tabela 3 que na maioria das espécies estudadas foram utilizados segmentos nodais como explantes iniciais, as citocininas foram utilizadas na fase de multiplicação dos ramos e as auxinas, em especial o ácido indolbutírico (IBA), utilizadas no enraizamento *in vitro*, protocolo tradicional utilizado em sistemas de micropropagação. Porém, variações desse protocolo foram adotadas em menor número de espécies, como será ressaltado a seguir, tornando mais eficientes os processos envolvidos na micropropagação.

Em *Hybanthus enneaspermus* a adição de nanopartículas de prata (AgNPs) e BAP, no meio de cultura de multiplicação de ramos e das AgNPs e IBA, no meio de cultura de enraizamento promoveu a produção do máximo número de ramos e da maior porcentagem de enraizamento, respectivamente (SATISH *et al.*, 2022).

Zarei *et al.* (2021) demonstraram que as dificuldades encontradas no sistema de micropropagação tradicional fotomixotrófico utilizado para *Cannabis sativa* foram eliminadas quando testaram o sistema fotoautotrófico. No sistema fotomixotrófico a fonte de carbono adicionada ao meio de cultura, fornece os esqueletos de carbono para sustentar o crescimento das plantas *in vitro* e a produção dos metabólitos secundários. Esses autores relatam que em *Cannabis* o processo de micropropagação além de demorar de 8-12 semanas, causa a vitrificação, pelo excesso de umidade acumulado dentro dos frascos, diminuindo as taxas de multiplicação, enraizamento e de aclimatação. No método fotoautotrófico utilizado na micropropagação de *Cannabis* o meio de cultura utilizado constou apenas de uma solução de fertilizantes contendo 5 mM do tampão MES, para estabilizar o pH 5,6,

tendo sido eliminados do meio de cultura as moléculas orgânicas (açúcar, vitaminas, hormônios). As culturas foram mantidas em ambientes com concentração de 900-1000 $\mu\text{M.mol CO}_2/\text{mol}$ e ajuste da intensidade luminosa ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) aumentou a taxa de enraizamento para 90%, reduzindo o tempo em 2 semanas e diminuiu para 4 dias o período de aclimação *ex vitro*, além de que a concentração de dióxido de carbono, possibilitou o melhor crescimento dos ramos, em 6 semanas de cultivo e o enraizamento e aclimação nas 4 semanas subsequentes do cultivo.

Manipulações na ventilação de frascos de cultura, que permitiram a ventilação natural, promoveram o crescimento e a eficiência de enraizamento dos ramos em culturas micropropagadas de *Lippia dulcis* (ROCHA *et al.*, 2022). Em culturas de pontas de ramos de *Jasminanthes tuyetanhia*, em sacos de nylon com membrana Millipore, a ventilação promoveu maior crescimento dos ramos do que o cultivo em sacos de nylon sem ventilação ou em frascos de vidro fechados (NAM *et al.*, 2022).

Em *Zingiber officinale* (ZHOU *et al.*, 2022) e nas várias espécies de árvores medicinais listadas na revisão de Arora *et al.* (2022) o enraizamento e a aclimação *ex vitro* foram conduzidos com sucesso. Em *Handroanthus impetiginosus* os ramos micropropagados foram transferidos para meio de cultura sem e com IBA, onde permaneceram por 3 dias, antes de serem transferidos para meio de cultura sem IBA, em que foram inoculados com 100 μL de meio cultura de linhagens endofíticas de culturas de *Rhizobium* sp e *Paenibacillus* sp., que aumentaram significativamente a porcentagem de enraizamento dos ramos que não foram pré-induzidos com IBA (YARTE *et al.*, 2022).

A importante revisão publicada por Arora *et al.* (2022), sobre as árvores medicinais, reúne muitos artigos científicos sobre a propagação *in vitro*, conservação *in vitro* a longo prazo e produção de compostos de bioativos de interesse para as indústrias farmacêuticas. Esses autores afirmam que, apesar da grande quantidade de pesquisas realizadas, poucos foram os metabólitos secundários de árvores medicinais produzidos em escala comercial destacando-se o taxol, ampotecina e azadiractina. Entre os estudos de culturas de tecidos realizados em 58 espécies citadas, 43 foram sobre micropropagação envolvendo a multiplicação de ramos, enraizamento e produção de plantas, sendo que na grande maioria os segmentos nodais foram utilizados como explante inicial. Em pouquíssimos casos foram utilizadas

as pontas de ramos, as gemas apicais, segmentos nodais cotiledonares como explantes.

Esses autores relatam que os meios de cultura mais utilizados na micropropagação de espécies de árvores medicinais foram o MS e o WPM (meio específico para plantas lenhosas). A citocinina mais utilizada foi o BAP, apesar de outras como cinetina, zeatina, tidiazuron e metapolina terem sido eficientes na proliferação de ramos a partir das gemas axilares. O agente geleificante mais utilizado na maioria das espécies foi o ágar em meio sólido, e outros suplementos como fontes de carbono, nitrogênio, glutamina, prolina, arginina e ácido cítrico promoveram a proliferação de ramos em algumas espécies. O enraizamento *in vitro* na maioria dos casos ocorreu com a adição do ácido indol butírico (IBA) ao meio de cultura. Nas duas últimas décadas os autores observaram que o enraizamento *ex-vitro*, conduzido ao mesmo tempo que a aclimatação, tem sido o método mais utilizado para enraizar os ramos as árvores medicinais. Afirmam que as raízes formadas são bem desenvolvidas, apresentado pelos radiculares, que podem otimizar a absorção de nutrientes e facilitar a aclimatação das plantas (ARORA *et al.*, 2022).

Os artigos recentes levantados nessa revisão mostraram que, o uso de AgNPs com BAP na multiplicação de ramos, o cultivo fotoautotrófico, a adoção de ventilação natural nos frascos de cultura, o enraizamento promovido pela inoculação de microrganismos endofíticos e a eficácia do enraizamento e aclimatação *ex vitro*, conduzidos simultaneamente, foram procedimentos de impacto positivo nos protocolos de micropropagação de plantas medicinais, para produção de mudas em larga escala.

Tabela 3. Micropropagação para a produção de comercial de mudas de espécies medicinais. Artigos publicados no período 2021-2023.

Espécies	Propriedades da espécie e objetivos do trabalho	Métodos de cultivo	Referências
<i>Stephania dentifolia</i>	Medicina tradicional, múltiplos alcalóides, micropropagação, produção de plantas saudáveis <i>in vitro</i> , desenvolver método eficiente de micropropagação	Segmentos nodais de plantas saudáveis, multiplicação em meio MS + 1 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA + 0,5 mg/L cinetina + 0,1 mg/L tidiazuron + 2 g/l carvão ativado; enraizamento em ½ MS + 0,5 mg/L IBA, aclimação solo:perlite (3:1)	Yu <i>et al.</i> (2023)
<i>Basella alba</i>	Antifúngica, antioconvulsão, anti-inflamatória, analgésica, fenólicos e flavonoides, produção em massa de plantas	Pontas de ramos, nós, multiplicação em meio MS + 0,1 mg/L BA + 0,5 mg/L cinetina + 0,1 mg/L IAA; enraizamento em MS + 0,5 mg/L IBA; aclimação em solo	Ranganatha <i>et al.</i> (2023)
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre, desenvolver sistema de aclimação para aumentar a sobrevivência	Meristemas, multiplicação em meio MS + 1 µM 6-BA + 0,5 µM NAA, com 1 µM de 6-BAP e 0,5 µM ANA promoveu cluster multiplicação de ramos; os ramos sem raiz transferido para bandejas contendo 8-10 cm de substrato perlite:vermiculite (1:1) umedecido com solução de ½ MS + 1 mg/L NAA para o enraizamento ex-vitro e aclimação	Zhou <i>et al.</i> (2022)
<i>Hybanthus enneaspermus</i>	Infecção urinária, inflamação, leucorreia, asma, alcalóide, sitosterol, antraquinonas, diosgenina, triterpenos, desenvolver micropropagação clonal eficiente para implementar edição de genes	Pontas de ramos, multiplicação em meio MS + com 1,5 mg/L BAP + 3 mg/L AgNPs; enraizamento <i>in vitro</i> em MS + 1 mg/l AIB + 1 mg/L AgNPs; aclimação em solo esterilizado.	Satish <i>et al.</i> (2022)
<i>Lippia dulcis</i> (hortelã-doce)	Aromática, controle de glicose, sedativo, micropropagação para produção de mudas em recipiente com ventilação natural (cultura fotoautotrófica)	Segmentos nodais, ventilação natural, tipos de tampas dos recipientes de cultura, membrana NVS4 (ventilação natural com tampas dos frascos com 4 orifícios com 4 membranas porosas) contendo meio	Rocha <i>et al.</i> (2022)

		MS + agar, sem sacarose, sem regulador de crescimento, cultivados com intensidade luminosa de $42 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ sem reguladores de crescimento promoveu o crescimento, desenvolvimento, acúmulo de compostos fenólicos e defesa antioxidante por mecanismo não enzimático	
<i>Alangium salviifolium</i>	Medicina ayuverdica, laxativo, hemorragia, pressão sanguínea, alcalóides, compostos fenólicos, flavonoides, salicina, caempferol, desenvolver método eficiente de propagação para propagação em larga escala	Segmentos nodais, multiplicação em meio WPM + $1,42 \mu\text{M}$ IAA e $1,11 \mu\text{M}$ BA; enraizamento em WPM + $2,46 \mu\text{M}$ AIB; aclimação em solo:peat moss:humus (1:1:1).	Pandey <i>et al.</i> (2022)
<i>Jasminanthes tuyetanhae</i>	Medicina popular, telosmosideos, testar o efeito da cultura com ventilação no crescimento dos ramos e eficiência de enraizamento <i>in vitro</i> .	Segmentos nodais de plantas <i>ex-vitro</i> , multiplicação em MS + 30g/L sacarose + 0,5 mg/L BA; enraizamento em MS + 0,5 mg/L IBA; pontas de ramos cultivadas em embalagem de nylon com membrana de ventilação millipore de $0,47 \mu\text{M}$ + intensidade luminosa de 40-45 μM de fótons/ m^2/s a ventilação aumentou a eficiência do enraizamento em relação aos frascos de vidro fechados e os sacos de nylon sem ventilação, promovendo o melhor crescimento dos ramos e formação de raízes secundárias.	Nam <i>et al.</i> (2022)
<i>Lippia javanica</i>	Medicinal, óleos essenciais e compostos voláteis com aplicações farmacêuticas, desenvolver protocolo eficiente de micropropagação <i>in vitro</i>	Segmentos nodais, multiplicação em MS + 2 mg/L 6-BAP + 0,5 mg/L cinetina; enraizamento em MS + 1 mg/L IBA; aclimação em solo.	Mood <i>et al.</i> (2022)
Várias espécies de árvores medicinais importantes	Micropropagação de diferentes espécies de árvores medicinais produtoras de	Segmentos nodais com gemas axilares utilizados na maioria das citações, vários protocolos de multiplicação de ramos (BAP), enraizamento <i>in vitro</i>	Arora <i>et al.</i> (2022_

	compostos ativos para suprir a produção de mudas para as indústrias farmacêuticas	(IBA) e <i>ex-vitro</i> , método ideal de enraizamento e aclimatação	
<i>Tuberaria lignosa</i>	Antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, compostos fenólicos, favonoides, ácidos fenólicos, suprir plantas clonadas de alta qualidade para a indústria farmacêutica	Segmentos de ramos apicais máxima proliferação em meio ½ MS + 1 mg/L BAP ou 1 mg/l meta topolina, 100% enraizamento em MS + 1 mg/L IAA; aclimatação fibra de coco:ships de coco:peat (60%:20%:20%) plantas com maior nível de enzimas antioxidantes em relação à planta mãe.	Rebelo <i>et al.</i> (2022)
<i>Handroanhus impetiginosus</i>	Micropropagação, testar linhagens endofíticas no enraizamento <i>in vitro</i> dos ramos, otimização do enraizamento <i>in vitro</i>	Ramos multiplicados <i>in vitro</i> inoculados por 3 dias em ½ Gamborg + 20 g/L sacarose + 6 g/L agar + 0 ou 30 µM IBA por 3 dias e em seguida transferidos para frasco com 15 mL de ½ MS sem auxinas para o desenvolvimento de raiz, cada ramo foi inoculado com 100 µL de meio de cultura com <i>Rhizobium</i> sp e <i>Paenibacillus</i> sp., o tratamento sem IBA e inoculado com endofíticos aumentou a porcentagem de enraizamento, o crescimento da parte aérea e das raízes, e modificaram perfil de proteínas e lignina das plantas.	Yarte <i>et al.</i> (2022)
<i>Santalum album</i>	Aromaterapia, antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante, anticâncer, óleos essenciais, santalol componente majoritário, vulnerável, produção de mudas	Segmentos nodais, multiplicação em MS + 1 mg/l BAP + 5 mg/L IAA; enraizamento em ½ MS + 1 mg/L IBA; aclimatação em soilrite:coco peat (1:1)	Shekhawat <i>et al.</i> (2021)
<i>Eupatorium glandulosum</i>	Antisséptica, analgésica, antipirética, adstringente, termogênica, coagulante sanguíneo, alcalóides, glicosídeos, flavonoides, taninos, fenólicos, saponinas com propriedade antioxidante, desenvolver propagação em massa	Segmentos nodais, multiplicação em meio MS + 0,5 m/L IAA + 3 mg/L BA; enraizamento em meio MS + 4 mg/L AIB; aclimatização em solo:areia:coco peat (1:1:1)	Nithya <i>et al.</i> (2021)

<i>Pulsatilla turczaninovii</i>	Medicinal, ornamental, melífera, produção de mudas e fenólicos	Segmentos nodais, multiplicação em MS + 2,5 mg/L 2iP + e1 mg/L IAA; enraizamento em MS + 1 mg/L de ACC precursor de etileno, que promove o enraizamento	Hanus-Fajerska <i>et al.</i> (2021)
<i>Chamerion angustifolium</i>	Ferimentos, doenças de pelo, desordens estomacais, inflamação próstata, doenças urinárias e dos rins, anticâncer flavonoides, oenoteína, ácido cafeico, desenvolver a multiplicação <i>in vitro</i> de genótipos regenerados <i>in vitro</i> para.	Multiplicação de ramos regenerados a partir de raízes de plântulas em meio MS + 0,1 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA; enraizamento em meio ½ MS + 0,5 mg/l IAA; aclimação em solo:perlite (2:1) esterilizado:	Dreger <i>et al.</i> (2021)
<i>Cannabis sativa</i>	Tratamento de epilepsia, fitocanabinóides, desenvolver micropropagação foto-autotrófica para superar as dificuldades da micropropagação convencional e otimizar a produção comercial em larga escala	Segmentos de pontas de ramos de plantas crescidas em casa de vegetação (5-7 cm) esterilizados e inoculadas em plugs esterilizados de fibras, colocados em recipiente esterilizado Microbox com 300 ml de fertilizante esterilizado, pH 5,6 e tampão MES, mantidos sob 23°C, fotoperíodo 18/6, 900-1100 µmol/mol de dióxido de carbono, LED e densidade de 150 µM de fótons/m ² /s promoveu o enraizamento e diminuiu o tempo do ciclo da micropropagação (enraizamento em 2 semanas e aclimação <i>ex vitro</i> em 4 dias)	Zarei <i>et al</i> (2021)

4.3.4. Micropropagação para conservação *in vitro*

A Tabela 4 mostra artigos científicos encontrados no período 2019-2022 sobre criopreservação *in vitro* de plantas medicinais e contém as informações sobre a espécie estudada, os objetivos de cada estudo, os métodos de conservação *in vitro* utilizados e as referências.

Os sistemas de micropropagação por gerarem grandes quantidades de ramos em curto espaço de tempo, são utilizados como fontes abundantes de explantes para os experimentos de conservação *in vitro* de propágulos vegetativos em condições assépticas. Em todos os casos mostrados na Tabela 8 os explantes utilizados para os experimentos de conservação *in vitro* foram removidos de culturas *in vitro* de plantas micropropagadas, exceto no caso de *Cannabis sativa* (LATA *et al.*, 2019), em que as pontas de ramos foram removidas de plantas crescidas *ex vitro* em ambiente controlado.

Os tipos de explantes que podem ser armazenados *in vitro*, com potencial de produção de mudas em larga escala e manutenção da estabilidade genética são: meristemas apicais, pontas de ramos, segmentos nodais, gemas axilares, gemas apicais, propágulos vegetativos que são utilizados na geração de mudas em larga escala. Para facilitar a manipulação, esses propágulos vegetativos podem ser encapsulados em alginato de cálcio e são produzidas então as sementes sintéticas. Quando necessário, os propágulos vegetativos são removidos da condição em que são armazenados *in vitro* e inoculados em meio de cultura, para a produção de mudas em larga escala, para suprir as demandas da produção comercial para o plantio e produção de biomassa para as indústrias farmacêuticas.

Entre os artigos mostrados na Tabela 4 é possível observar que em três estudos foi utilizado o método de conservação *in vitro* de sementes sintéticas por restrição do crescimento, induzido pela redução da temperatura do ambiente para 4°C (*Satureja khuzistanica*) (ASADI *et al.*, 2022), 4°C e 12°C (*Azadirachta indica*) (KADER *et al.*, 2022) e 4°C e 24°C (espécies de árvores medicinais, Arora *et al.* (2022)). Foram utilizadas nesses casos sementes sintéticas de segmentos nodais e de pontas de ramos e os períodos curtos de armazenamento variaram entre 2 e

16 semanas. Os métodos de conservação *in vitro* por restrição do crescimento são de curto prazo.

Na maioria dos artigos da Tabela 4 foi utilizado o método de conservação *in vitro* a longo prazo, através da criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C, que cessa totalmente o metabolismo celular. É possível observar que diferentes tipos de protocolos de criopreservação foram utilizados com sucesso, dependendo da espécie. Predominaram os protocolos de vitrificação e os propágulos vegetativos mais utilizados foram as pontas de ramos, em apenas um caso foram utilizadas as gemas axilares (*Cannabis sativa*)(LATA *et al.*, 2019). As pontas de ramos e as gemas axilares são os explantes mais adequados para a criopreservação, pois as células meristemáticas podem conter menor teor de água que as células já diferenciadas, por não terem vacúolos ou terem vacúolos pequenos.

A vitrificação é um tratamento em que os explantes são imersos em uma solução viscosa de crioprotetores, muito densa (30% glicerol + 15% etilenoglicol + 15% dimetilsufóxido), para reduzir o teor de água das células e evitar a formação de cristais de gelo. Alguns dos componentes dessa solução penetram nas células e alteram as propriedades coligativas da água dificultando a formação de gelo, como o DMSO e o glicerol e outros não penetram, como o etilenoglicol que permanece no meio extracelular aumentando a viscosidade e induzindo a saída da água e a desidratação da célula, para evitar a formação de gelo no citoplasma. Na presença dessa solução, a água do suco celular fica no estado vítreo, nem sólido e nem líquido e isso impede a formação dos cristais de gelo, que podem danificar as células. Em apenas uma espécie não foi utilizada a vitrificação, mas o método do encapsulamento-desidratação, em que as gemas axilares de *Clitoria ternatea* foram encapsuladas em alginato de cálcio e submetidas à desidratação antes da imersão em nitrogênio líquido (NAIR *et al.*, 2021).

Arora *et al.* (2022), na revisão publicada sobre recentes progressos na biotecnologia de plantas medicinais relatam que, entre os artigos sobre conservação *in vitro* publicados no período 2005-2021, entre as 13 espécies de árvores medicinais estudadas 4 foram conservadas *in vitro* por curto e médio prazo, por restrição do crescimento: *Azadirachta indica* (sementes sintéticas de segmentos nodais conservadas a 12°C por 4 semanas), *Melia azedarach* (pontas de ramos conservadas a 4°C por 12 meses), *Pistacia lentiscus* (pontas de ramos

conservadas a 4°C, no escuro, por 12 meses) e *Garcinia indica* (ramos inteiros originados *in vitro* foram conservados nas condições normais de cultivo em meio de cultura com baixas concentrações de citocininas).

Em cinco das 13 espécies citadas por Arora *et al.* (2022) foi utilizada a criopreservação em nitrogênio líquido, através da aplicação de diferentes protocolos de vitrificação utilizando explantes originados de sistemas de micropropagação de ramos: (em pontas de ramos axilares de *Crateva nurvala*), vitrificação em gotículas (pontas de ramos de *Hancornia speciosa*), V-crioplaca (pontas de ramos de *Hovenia dulcis*), encapsulamento-vitrificação (pontas de ramos de *Melia azedarach*) e encapsulamento-vitrificação combinado com pré-cultura em trealose, para otimizar a desidratação osmótica (pontas de ramos de *Parkia speciosa*). Esses autores relatam que os métodos de vitrificação, encapsulamento-vitrificação e encapsulamento-desidratação foram os métodos mais aplicados na conservação a longo prazo de árvores medicinais. Em 9 dos 16 protocolos relatados nos artigos científicos foram utilizados explantes obtidos a partir dos ramos produzidos *in vitro* por sistemas de micropropagação.

Tabela 4 – Artigos publicados no período (2019-2023) sobre conservação *in vitro* de germoplasma através da criopreservação, por médio e longo prazo ou pelo método de restrição do crescimento, por curto prazo.

Espécie	Objetivo	Método	Referências
<i>Satureja khuzistanica</i> (anti-inflamatória, antioxidante, anti-fúngica, taninos, óleos essenciais)	Conservação de germoplasma <i>in vitro</i> por curto período através da restrição do crescimento.	Sementes sintéticas a partir do encapsulamento em alginato de segmentos nodais e pontas de ramos produzidos <i>in vitro</i> conservadas em meio MS sem reguladores de crescimento, por duas semanas a 4°C.	Asadi <i>et al.</i> (2022)
Várias espécies de árvores medicinais	Conservação <i>in vitro</i> por períodos curtos e médios, por restrição de crescimento e por longos períodos, por criopreservação em nitrogênio líquido	Segmentos nodais e pontas de ramos contendo meristemas apicais encapsulados em alginato e conservados a 4°C ou 12°C; criopreservação de pontas de ramos contendo meristemas apicais pelos métodos de vitrificação em gotículas ou em crioplaquetas, desidratação, encapsulamento-desidratação.	Arora <i>et al.</i> (2022)
<i>Azadirachta indica</i> (terpenóides, biopesticidas, inseticidas)	Micropropagação de plantas crescidas <i>in vivo</i> e conservação <i>in vitro</i> por restrição do crescimento por períodos de até 120 dias	Sementes sintéticas produzidas a partir de pontas de ramos obtidas de plantas micropropagadas, através do encapsulamento em alginato foram conservadas em placas de Petri contendo água destilada e mantidas a 4°C e 24°C; taxas maiores de sobrevivência foram obtidas a 24°C em todos os períodos testados de 15-120 dias (82,22-97,22%).	Kader <i>et al.</i> (2022)
<i>Clitoria ternatea</i> (antidiabética, anti-inflamatória, anticâncer, neuroprotetora)	Criopreservação em NL	Gemas axilares de plantas micropropagadas criopreservadas pelo método de encapsulamento-desidratação (sobrevivência 60%).	Nair <i>et al.</i> (2021)

<i>Hovenia dulcis</i> (infecção intestinal, antioxidante, hepatoprotetora, antioxidante)	Criopreservação em NL	Pontas de ramos de plantas micropropagadas criopreservadas pelo método de vitrificação em gotículas e V-crioplaca (sobrevivência 100%).	Saavedra <i>et al.</i> (2021)
<i>Gentiana kurroo</i> (glicosídeos, alcalóides, medicinal)	Criopreservação em NL	Pontas de ramos de plantas micropropagadas criopreservadas pelo método de vitrificação e vitrificação em gotículas (sobrevivência 60%).	Sharma <i>et al.</i> b (2021)
<i>Passiflora suberosa</i> (ansiedade, hipolicêmica, diabetes, flavonoides)	Criopreservação em NL	Pontas de ramos de plantas micropropagadas criopreservadas pelo método de vitrificação e V-crioplaca (sobrevivência 45-60%).	Vianna <i>et al.</i> (2019)
<i>Cleome spinosa</i> (diurética, antinoceptiva, anti-inflamatória)	Criopreservação em NL	Pontas de ramos de plantas micropropagadas criopreservadas pelo método de vitrificação. e V-crioplaca (sobrevivência 83,3%).	Vilardo <i>et al.</i> (2019)
<i>Cannabis sativa</i> (fitocanabinóides, possíveis efeitos terapêuticos no controle de convulsões, redução inflamação)	Criopreservação em NL	Gemas axilares de plantas crescidas indoor criopreservadas pelo método de vitrificação em gotículas e V-crioplaca.	Lata <i>et al.</i> (2019)
<i>Tussilago farfara</i> (tosse, bronquite, anti-inflamatória, anti-espasmódica)	Criopreservação em NL	Pontas de ramos de plantas micropropagadas criopreservadas pelo método de vitrificação em gotículas.	Hambeck <i>et al.</i> (2019)

4.3.5. Aplicação da nanotecnologia para otimizar procedimentos utilizados na micropropagação

As nanopartículas possuem pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm e a nanotecnologia estuda a manipulação dessas partículas para testar suas propriedades em várias áreas da ciência. As nanopartículas compostas por metais e óxido de metais são as mais utilizadas na agricultura e em sistemas de culturas de tecidos de plantas, atuando na desinfecção de explantes, como agentes antifúngicos e antibacterianos, na otimização da micropropagação das plantas, promovendo a produção e o crescimento de ramos, raízes e a sobrevivência das plantas aclimatadas e como elictores do metabolismo secundário (MAHAJAN *et al.* 2022).

A relevância do emprego das nanopartículas para otimizar processos na área de biotecnologia de plantas medicinais tem sido destacada pelas diferentes revisões sobre o tema publicadas no período entre 2021 e 2023 (Tabela 5).

Em 2022 foi publicada uma revisão por Mahajan *et al.* (2022), sobre a utilização específica da aplicação *in vitro* de nanopartículas de prata (AgNPs) em diferentes espécies de plantas. Sobre *Stevia rebaudiana* foram publicadas duas revisões: Biswas *et al.* (2023), descreveram os impactos de vários tipos de nanopartículas na micropropagação, crescimento das plantas e produção de glicosídeos de esteviol, esteviosídeo, rebaudiosídeo A e outros metabólitos secundários, como compostos fenólicos e óleos essenciais. Ahmad *et al.* (2023), relataram os efeitos de diferentes nanopartículas sobre culturas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, ressaltando que nanopartículas de ferro (FeNPs) em baixas concentrações, aumentaram os fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante das culturas. Ainda em 2023 as seguintes revisões sobre o tema foram publicadas: Bernela *et al.* (2023), abordando a aplicação das nanopartículas em várias espécies de plantas medicinais, incluindo sistemas de cultura *in vitro* e Singh *et al.* (2023), descrevendo o cenário atual e futuro da aplicação das nanopartículas como elictores em culturas *in vitro* de tecidos vegetais de várias espécies de plantas.

Além dessas revisões a Tabela 5 mostra resumos de artigos específicos publicados no período 2020-2023 sobre os efeitos promotores de nanopartículas de AgNPs na micropropagação e teor de saponinas de *Panax vietnamensis* (CUONG *et*

al. 2021), na proliferação, crescimento *in vitro* de ramos e raízes de *Hybanthus enneaspermus*, aumentando a eficiência da aclimatação, no solo, das plantas micropropagadas (SATISHI *et al.*, 2022) e de nanopartículas de ouro (AuNps), no desenvolvimento, multiplicação *in vitro*, aumento da atividade de enzimas antioxidantes, fenólicos e taninos em plantas de *Lamprocapnos spectabilis* (Kulus *et al.*, 2022).

A revisão de Bernela *et al.* (2023) destaca o número crescente de publicações sobre a aplicação da nanotecnologia na agricultura, mostrando que em 2012 o número de publicações era menor que 100, atingindo entre 800 e 900 publicações, em 2022, sendo que a mesma tendência foi observada no número de publicações sobre plantas medicinais, que são o objetivo principal da revisão. Esses autores fazem uma compilação sobre o impacto positivo das nanopartículas no cultivo de várias espécies de plantas medicinais no campo e *in vitro*. Ressaltam que a utilização das nanopartículas em sistemas de cultura *in vitro* contribuíram para a otimização de processos de propagação de plantas, no estabelecimento de culturas assépticas, regeneração de plantas, embriogênese somática, produção de metabólitos secundários e transformação genética, por viabilizarem métodos mais fáceis, rápidos e eficientes de transferência de genes.

As nanopartículas de óxidos dos metais de prata, zinco, alumínio, ouro, ferro, titânio, níquel e silício mostraram efeitos antimicrobianos contra fungos e bactérias e foram utilizadas com sucesso, como alternativa aos métodos convencionais de desinfecção do material vegetal, durante o estabelecimento *in vitro*. As nanopartículas de prata (AgNPs) foram as mais utilizadas nos trabalhos realizados com as plantas medicinais estudadas por Bernela *et al.* (2023), tanto como agentes esterilizantes como para o controle da oxidação dos explantes *in vitro*, por controlarem a excreção de polifenóis para o meio de cultura. Os autores citam que na micropropagação de *Rosmarinus officinallis*, utilizando segmentos de caule contendo as gemas axilares, as AgNPs promoveram maiores taxas de desinfecção e menores taxas de oxidação.

Singh *et al.* (2023) mencionam na revisão publicada uma lista de 30 espécies de plantas em que as NPs foram utilizadas na desinfecção de explantes sendo que, em 24 delas foram utilizadas as AgNPs e nas demais espécies foram utilizadas nanopartículas de óxido de cobre, zinco, titânio e grafite. As concentrações das AgNPs variaram entre 1-15 mg/L, como em isolamento de protoplastos de *Nicotiana tabaco*,

predominando as concentrações de as 25-500 mg/L para a maioria das espécies como *Valeriana officinalis*, *Araucaria excelsa*, *Vitis vinifera*, *Rosa hybrida*, *Catharantus roseus*, *Ocimum* sp. Os autores ressaltam que quando as NPs foram utilizadas em combinação com outros agentes desinfectantes, como álcool 70% e hipoclorito de sódio, havendo efeito sinérgico, que aumentou a eficácia do protocolo.

Esses autores ressaltam que o efeito antimicrobiano das NPs é atribuído aos danos que podem causar na parede celular, na membrana dos microrganismos e no interior da célula, através da penetração e indução do estresse oxidativo. A interação das cargas negativas da membrana do microrganismo com as cargas positivas das NPs pode gerar a adesão eletrostática, alterando o potencial e a permeabilidade da membrana e danificando a cadeia de transporte de elétrons e a destruição da integridade celular, o que levaria à perda de íons, proteínas e de outras moléculas importantes do metabolismo microbiano.

Exemplos de espécies medicinais citadas por Bernela *et al.* (2023), em que as nanopartículas promoveram a produção de metabólitos secundários em culturas de ramos e de plantas *in vitro* foram: em *Isatis constricta* as AgNPs promoveram aumento de 1,15 vezes em índigo, um corante azul natural; *Matricaria recutita* aumentou em 4,4 vezes os fenólicos totais com TiO₂NPS e com nanopartículas de silício SiNPs aumentou 10,58 vezes, em relação ao controle. Em *Mentha piperita* as SiNPs aumentaram 11,9 vezes os fenólicos totais; em *Withania* Zn-AgNPs aumentaram 14 vezes os fenólicos totais; em *Stevia rebaudiana* as ZnONPs aumentaram 3,65 vezes o teor de rebaudiosídeo A e em 1,17 vezes o conteúdo de esteviosídeo. A grande maioria dos artigos citados pelos autores utiliza as nanopartículas em outros tipos de culturas *in vitro* como calos, suspensões celulares, cultura de raízes e ainda é baixo o número de artigos em que as nanopartículas foram utilizadas em culturas de ramos, o que indica que o potencial das nanopartículas deve ser mais explorado nos sistemas de micropropagação.

As nanopartículas atuam como elicitores, promovendo a biossíntese de metabólitos secundários importantes nas indústrias de cosméticos, farmacêuticas, nutracêuticas, além das várias estratégias que são rotineiramente usadas para aumentar a produção de metabólitos secundários *in vitro* como fornecimento de precursores, biotransformação e a otimização de meio de cultura. As nanopartículas

agem como elicitores e diferentes tipos de nanopartículas tem sido utilizadas, como as nanopartículas de níquel (NiAGNPs,) e de ouro-prata (AgAu NPs).

Bernela *et al.* (2023) relatam que as NPs podem atuar no aumento da expressão de genes envolvidos na biossíntese de vários metabólitos secundários, como por exemplo: as nanopartículas de titânio (TiO₂) e silício (SiO₂) aumentaram a expressão de genes da enzima geranyl difosfato sintase, envolvida na síntese de timoquinona em *Nigella sativa*; nanopartículas de silício aumentaram a expressão das enzimas PAL (fenilalanina amônia liase, enzima reguladora da síntese de muitos compostos fenólicos) e RAS (sintase de ácido rosmarínico) na produção de ácido rosmarínico em *Dracocephalum kotschyi*. Em *Stevia rebaudiana* as AgNPs aumentaram a expressão de todos os genes chaves que atuam na biossíntese de glicosídeos de esteviol e rebaudiosídeo e quando aplicadas às folhas de *Salvia officinallis* ativaram as enzimas PAL e RAS. Além de atuar na regulação das enzimas as nanopartículas podem interferir no metabolismo secundário das plantas, agindo nas cascatas de sinalização, influenciando a regulação das cinases e do metabolismo celular, através da interação com os receptores de cálcio da membrana celular.

Singh *et al.* (2023) detalham que a penetração das NPs nas células depende do afrouxamento das microfibrilas da parede celular, indução de canais transientes da membrana e ligação dessas moléculas às proteínas carregadoras presentes na membrana ou às proteínas imersas na membrana celular. Isso causa movimentos de entrada de íons cálcio nas células, seguido da produção de ROS em resposta ao esse estresse oxidativo causado, o que resulta na fosforilação que ativa a cascata de sinalização da proteína cinase MAPK e a ativação direta da transcrição de genes das vias de biossíntese de enzimas antioxidantes e de metabólitos secundários. A ativação de genes no nível transcricional para a produção de metabólitos secundários induzida pelo acúmulo de ROS pode também ocorrer indiretamente, através do estímulo da síntese de hormônios ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico, moléculas sinalizadoras do mecanismo de defesa das plantas. A ativação de genes a nível transcricional para a produção de metabólitos secundários pode também ser induzida indiretamente pelo etileno, resultante do acúmulo de ROS.

Apesar das nanopartículas desempenharem papel importante na cultura *in vitro*, em especial na desinfecção dos explantes, para o estabelecimento das culturas, multiplicação, crescimento em altura e enraizamento dos ramos e produção de metabólitos secundários, pouco se conhece sobre o seu mecanismo de ação, sendo necessárias pesquisas futuras para esclarecer os mecanismos de como atuam para modular o crescimento, desenvolvimento e os mecanismos de defesa das plantas (BERNELA *et al.*, 2023).

Tabela 5. Artigos recentes publicados no período 2020-2023 sobre efeitos das nanopartículas adicionadas ao meio de cultura para otimizar a micropropagação e produção de metabólitos secundários.

Espécie	Tipo de nanopartícula	Resultados	Referências
Várias espécies de plantas medicinais	Vários tipos de nanopartículas foram utilizados em culturas <i>in vitro</i> de várias espécies de plantas medicinais.	AgNPs um dos tipos mais utilizados, efetivas na desinfecção de explantes, promoveu regeneração de calos e embriogênese somática, aumentou a produção de metabólitos secundários	Bernela <i>et al.</i> (2023)
<i>Stevia rebaudiana</i>	Nanopartículas de prata AgNPs e de óxidos de zinco (ZnONPs) e cobre (CuONPs)	Promoveu maior produção de ramos e comprimento por explante (12,5 – 50 mg/L); aumentou o teor de clorofila (25 mg/L); mais alta porcentagem de enraizamento (2 mg/L ZnO e CuO NPs); aumentou glicosídeos de esteviol, esteviosídeo, rebaudiosídeo A, fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante.	Biswas <i>et al.</i> (2023)
<i>Stevia rebaudiana</i>	Nanopartículas de óxidos de zinco, cobre, titânio (ZnO, CuO, TiO ₂ NPs), de ouro-cobre (AuCu), prata (AgNP) e ferro (FeNP).	Elictores que aumentaram os teores de fenólicos totais, flavonóides, rebaudiosídeo A, esteviosídeo, óleos essenciais, capacidade antioxidante, poder redutor em ramos, raízes, calos cultivados <i>in vitro</i>	Ahmad <i>et al.</i> (2023)
Várias espécies de plantas	Vários tipos de nanopartículas utilizadas na desinfecção de explantes, indução de calos e organogênese e elicitação de compostos em culturas <i>in vitro</i> .	Eficácia na desinfecção de explantes (AgNPs mais utilizadas, com menor frequência CuO, ZnO, TiO ₂ , Grafite); promoveu indução de calos e organogênese (AgNPs em mais que 50% dos casos, seguidas por ZnO, CuO, TiO ₂ e FeO ₄ /O ₃); promoveu a elicitação de compostos (AgNPs, TiO ₂ e mesmos tipos citados acima seguidos de quitosana, Mn ₂ O ₃ , CdO, NiO, SiO e outros menos utilizados)	Singh <i>et al.</i> (2023)
Várias espécies de plantas	AgNPS, uma das nanopartículas mais aplicadas no crescimento de plantas <i>in vitro</i>	Promoveu a germinação <i>in vitro</i> e o crescimento da plântula, desinfecção de explantes, propagação <i>in vitro</i> , produção de metabólitos <i>in vitro</i> ,	Mahajan <i>et al.</i> (2022)

	<i>vitro</i> e produção de metabólitos, mecanismos de ação.		
<i>Hybanthus enneaspermus</i>	AgNPs a 3 mg/L + BAP a 1,5 mg/L (para proliferação de ramos) e AgNPs a 1 mg/L + IBA a 1 mg/L (enraizamento).	Estimulou a produção e crescimento de ramos (90,66% de indução e máximo de 77,23 ramos); induziu raízes em 87% dos explantes em maior número e com maior crescimento, aumentou a eficiência da aclimação das plantas em solo.	Sathish <i>et al.</i> (2022)
<i>Lamprocapnos spectabilis</i>	Nanopartículas de ouro (AuNPs) de 13 nm de diâmetro adicionadas nas concentrações de 0, 50, 75, 100 ppm (2 ml/frasco) aos frascos contendo os segmentos nodais de ramos inoculados em meio de cultura MS + 1 mg/L cinetina + 30g/L sacarose + 8 g/L agar; controle	AuNPs promoveram a melhor produção de ramos/explante (75 ppm), maiores taxas de propagação de 19,8-22,9 (50 e 75 ppm), taxa de enraizamento igual ao controle (75 ppm), a atividade de enzimas antioxidantes (100 ppm), a produção de fenólicos totais (50-100 ppm); maior comprimento das raízes (100 ppm).	Kulus <i>et al</i> (2022)
<i>Panax vietmanensis</i>	Nanopartículas de prata (AgNPs) < 20 nm em concentrações de 0,4 a 2 mg/L adicionadas ao meio de cultura MS + 1mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L NAA antes da autoclavagem. Em seguida foram inoculados 0,5 g de calos/frasco. Plantas micropropagadas foram cultivadas em meio SH com 1mL NAA e AgNPs.	A 1,6 mg/L as AgNPs estimularam a embriogênese somática, em relação ao controle sem AgNPs, aumentaram o número de embriões somáticos, (140/frasco) o número de embriões convertidos em plantas (14,66/frasco) e a massa seca das plantas (86 mg). A 1,2 mg/L as AgNPs promoveram o crescimento do rizoma, em relação ao controle sem AgNPs, em diâmetro, comprimento, massa fresca, por inibir o acúmulo de etileno, aumentou a sobrevivência das plantas aclimatadas (93,65%), dobrou o teor de saponinas nos rizomas em comparação com não tratadas depois de 4 anos de cultivo em casa de vegetação	Cuong <i>et al.</i> (2021)

4.3.6. Utilização de biorreatores de imersão temporária na micropropagação

Mirzabe *et al.* (2022), na revisão publicada sobre micropropagação de diferentes espécies de plantas em biorreatores de imersão temporária ressaltam que no período entre 1997 e 2022 essa tecnologia foi amplamente utilizada em 161 estudos de micropropagação, visando a produção comercial de mudas em larga escala e em 20 estudos de produção de biomassa para a produção de metabólitos secundários. As espécies de valor comercial citadas são a batata, banana, morango, abacaxi, maçã, mirtilo, cana-de-açúcar, cará, azeitona, pimenta agave, cacau, café, chá, antúrio, gerbera, bambú, avelã, tâmara, tabaco e espécies florestais.

Entre os 20 estudos citados na revisão de Mirzabe *et al.* (2022) em que biorreatores foram utilizados na produção de biomassa, 15 foram para a produção de biomassa de ramos micropropagados de plantas medicinais e de metabólitos secundários e são citados estudos sobre culturas de ramos de lavanda (*Lavandula officinalis*), erva-de-São João (*Hypericum perforatum*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), *Equinacea purpurea*, *Centella asiatica* e *Stevia rebaudiana*.

Esses autores afirmam que os biorreatores de imersão temporária (TI) são os mais adequados para o cultivo de plantas inteiras, por serem uma combinação da característica de aeração existente no meio semissólido e por permitir a maior uniformidade de contato da planta com o meio líquido, o que facilita a absorção de nutrientes, promovendo o crescimento, aumentando a taxa de micropropagação, reduzindo os custos de produção e possibilitando a automação. Além disso, o controle da frequência e da duração das imersões temporárias das plantas em meio líquido evita o efeito negativo do contato contínuo da planta com o meio líquido, em que o excesso de umidade pode provocar anomalias nas plantas propagadas *in vitro* e a baixa difusão do oxigênio pode inibir o crescimento e a produção de metabólitos secundários. I

Nas culturas de ramos/plantas em meio líquido, mantidas em suspensão em agitadores horizontais ou em biorreatores com mecanismos de agitação, o estresse é causado pela falta de aeração adequada, excesso de umidade e danos devidos aos choques mecânicos, fatores que são eliminados no cultivo em biorreatores de imersão

temporária. O cultivo em biorreatores de imersão temporária apresenta benefícios em relação ao sistema de cultivo em suspensões e sistemas de cultivo de ramos em meio líquido, além de reduzir o efeito do excesso de umidade, elimina o estresse mecânico provocado pela agitação e diminui os custos de produção pela não utilização de agentes geleificantes (AGUILAR *et al.* 2022).

O ambiente mais natural propiciado pelos biorreatores de imersão temporária, para o crescimento das culturas de ramos, faz com que essa tecnologia seja reconhecida para a micropropagação, produção de metabólitos secundários, seleção de plantas transgênicas, avaliação das respostas das plantas aos estresses abióticos como seca, salinidade, alagamento, alta temperatura e para a propagação em massa de plantas utilizadas na fitoremediação (AGUILLAR *et al.*, 2022). Vários tipos de biorreatores de imersão temporária são comercializados e utilizados por várias empresas ao redor do mundo, como a Florida Crystals Corporation (<https://www.floridacrystals.com>), que utilizam o tipo SETIS para micropropagação em massa de cana-de-açúcar; e a empresa PT Tamora Stekindo, companhia de micropropagação de Medan, na Indonésia (<https://www.tamorastekindo.com>), que utilizam o tipo SETIS de biorreator de imersão temporária para multiplicação em massa de plantas de chá, bromélias, banana, *Alocasia* etc.

A Tabela 6 mostra a lista dos 6 artigos científicos publicados no período 2020-2023, sobre a micropropagação *in vitro* de espécies medicinais em biorreatores, citando as espécies estudadas, o tipo de biorreator utilizado, os tempos e frequência das imersões, os objetivos e resultados do trabalho e as referências.

Diferentes tipos de sistemas e biorreatores de imersão temporária são comercializados. Os tipos de biorreatores de imersão temporária utilizados na micropropagação nos estudos mostrados na Tabela 6 foram de dois tipos: container-único, com volumes de meio de cultura que podem variar entre 20 mL e 3 L, com volumes totais de capacidade variando entre 50 mL e 10 L, como no caso dos biorreatores patenteados RITA® (Recipiente for Automated Temporary Immersion, capacidade total entre 200 mL e 5 L e volumes de meio de cultura entre 50 mL a 1L, respectivamente) e PLANTFORM® (capacidade total entre 200 mL e 9,5 L e volumes de meio de cultura de 10 mL a 4,05 L) e o biorreator de frasco-duplo, como biorreator patenteadado BIT® (capacidade total entre 250 mL e 10L, volume de meio de cultura entre 25 mL e 2 L).

Observa-se na Tabela 6 que, nos casos das espécies medicinais *Bacopa monnieri* (KUNAKHONNURUK et al., 2023), *Pontechium maculatum* (MAKOWSKI et al., 2023), *Stevia rebaudiana*, (SRIVASTAVA & CHATUVERDI et al., 2022), *Salvia viridis* (GRZEGORCZYK-KAROLAK et al., 2022) e *Linnaea borealis* (ameaçada de extinção)(KIKOWSKA et al., 2022), o cultivo em biorreatores de imersão temporária, não apenas aumentou a produção de plantas em larga escala, como também promoveu a produção de biomassa de ramos aumentou a produtividade de saponinas esteroidais (bacosídeos), de chiconina e ácidos fenólicos, esteviosídeo, fenólicos totais, ácidos fenólicos e fenilpropanoides, respectivamente. Em *Salvia viridis*, o cultivo em biorreator aumentou, em um período de quatro semanas, em 33 vezes a produção de biomassa e, em três semanas produziu dez vezes mais ácidos fenólicos e fenilpropanoides do que plantas de quatro meses crescidas no solo, no ambiente natural.

Na revisão sobre *Stevia rebaudiana* (SRIVASTAVA & CHATUVERDI, 2022) os autores ressaltam a importância da utilização de biorreatores de imersão temporária para promover o crescimento *in vitro* dos ramos e aumentar a sobrevivência das plantas, durante o processo de aclimação no solo, em relação às plantas produzidas em meio semisólido ou imersos em meio de cultura líquido. Além disso relatam que no primeiro trabalho de cultivo de *Stevia* em biorreator a produção foi de 64,6 Kg de ramos, utilizando apenas 460 g do inóculo inicial e citam vários artigos científicos em que a proliferação de ramos em larga escala em biorreatores resultou no aumento da biossíntese de glicosídeos. Em *Stevia* os biorreatores RITA® (biorreator de frasco único) e BIT® (biorreator de frascos duplos, um contendo meio de cultura e outro contendo os ramos) foram os mais eficientes.

Tabela 6. Artigos científicos publicados entre 2020-2023 sobre a utilização de biorreatores de imersão temporária na micropropagação em larga escala de plantas medicinais.

Espécie	Tipo de biorreator, tempo e frequência da imersão em meio líquido	Objetivos/resultados	Referências
<i>Bacopa monnieri</i>	TIS (sistema de imersão temporária em container único) 10 min imersão/dia	Estabelecer sistema de produção de biomassa <i>in vitro</i> e de produção de bacosídeos em escala industrial utilizando o TIS. TIS promoveu o crescimento das plantas, para propagação em larga escala de plantas de qualidade, produção e acúmulo de biomassa e de bacosídeos (saponinas esteroidais) quando comparado com imersão contínua e meio de cultura semi-sólido	Kunakhonnuruk <i>et al.</i> (2023)
<i>Pontechium maculatum</i>	Plantform™ 20 min de imersão, 30 min para escoamento do meio pela gravidade e 10 min de aeração.	Testar se a produção de biomassa <i>in vitro</i> é melhor que <i>ex vitro</i> , testar se TIB é melhor que cultura em meio líquido com agitação. TIB promoveu a produção de maior biomassa de ramos e de plantas com alta produtividade de todos os ácidos fenólicos, ácido rosmarínico, chiconina e forte atividade antioxidante.	Makowski <i>et al.</i> (2023)
Várias espécies de plantas	Vários tipos de TIS (single container, frasco-duplo e outros designs de biorreatores de imersão temporária)	Vários tipos de biorreatores de imersão temporária utilizados na produção e larga escala de mudas micropropagadas e na produção de biomassa para a produção de metabólitos secundários.	Mirzabe <i>et al.</i> (2022)
<i>Stevia rebaudiana</i>	RITA®, BIT® 30 min imersão a cada 6 h por 21 dias.	Propagação <i>in vitro</i> para obter plantas clonadas de qualidade superior e alta produção do glicosídeo esteviol. Promoveu a proliferação de ramos em larga	Srivastava & Chatuverdi (2022)

		escala, a produção de biomassa de ramos e o nível de esteviosídeo.	
<i>Salvia viridis</i>	Plantform® Imersão em intervalos de 80 min	Otimizar o cultivo em larga escala de ramos para aumentar a produção de polifenóis. Promoveu a máxima massa fresca, massa seca e alta taxa de proliferação de ramos (18,6 ramos/explante), aumentou em 33 vezes a biomassa em 4 semanas. Promoveu em 3 semanas a máxima produção de fenólicos totais, ácidos fenólicos e fenilpropanoides, 10x mais que plantas de 4 meses crescidas no solo no ambiente.	Grzegorzcyk-Karolak <i>et al.</i> (2022)
<i>Linnaea borealis</i>	RITA® x meio líquido em agitador horizontal rotatório 1-2 min de imersão em intervalos de 1 hora.	Multiplicação de biomassa de plantas para a produção de metabólitos secundários, produção de mudas em larga escala e de sementes artificiais. Meio líquido e RITA suplementados com reguladores de crescimento produziram os maiores números de ramos/explante.	Kikowska <i>et al.</i> (2022)

4.3.7. Vantagens e desafios da micropropagação

Vários artigos científicos recentes, mencionados a presente revisão, enfatizam as vantagens do uso de biorreatores de imersão temporária na micropropagação e produção de metabólitos secundários de plantas medicinais. Essas vantagens são decorrentes do sistema de automação, que permite o controle de diferentes parâmetros, principalmente os fluxos do meio de cultura líquido e do oxigênio, garantindo a reposição periódica de ar no meio de cultura, reduzindo o acúmulo de dióxido de carbono e etileno, além de que vários tipos de explantes podem ser cultivados ao mesmo tempo e não há necessidade de adicionar agentes geleificantes (MIRZABE *et al.*, 2022).

Outros benefícios apontados por esses autores são a prevenção da contaminação, diluição no meio de cultura líquido dos compostos tóxicos liberados pelos tecidos das plantas como fenólicos, reduzindo a oxidação. Portanto, o impacto maior da adoção de biorreatores de imersão temporária automatizados na micropropagação é na diminuição no custo de produção e no aumento da qualidade das plantas produzidas e, na área de produção de metabólitos secundários é na alta produção de biomassa e no baixo custo de produção de quantidades maiores desses metabólitos sob condições padronizadas.

Vários dos desafios relatados em décadas passadas, por George *et al.* (2008), como o alto custo de produção, estão sendo superados atualmente, com o desenvolvimento e a otimização constante de novos tipos de biorreatores de imersão temporária, mais eficientes, que estão disponíveis no mercado e são utilizados por várias empresas ao redor do mundo (AGUILLAR *et al.*, 2022).

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Através da análise dos artigos científicos foi possível identificar abordagens pouco exploradas nos sistemas de micropropagação de plantas medicinais, mas com grande potencial para otimizar ainda mais a produção de plantas, de óleos essenciais e de outros metabólitos secundários, como a utilização de microrganismos endofíticos e os sistemas foto-autotróficos. Outras abordagens utilizadas nos artigos estão sendo

otimizadas rapidamente, como a utilização das nanopartículas e os biorreatores de imersão temporária.

Alguns tópicos importantes levantados nos artigos, que devem ser explorados para otimizar os protocolos de micropropagação de plantas medicinais são:

1- Intensificar os estudos sobre a utilização de microrganismos endofíticos, que possam ser utilizados não apenas para otimizar etapas da multiplicação e enraizamento das plantas, como também aumentar a produção de metabólitos secundários por sistemas de micropropagação de ramos e plantas.

2- Aperfeiçoar os sistemas fotoautotróficos de micropropagação e ampliar a aplicação a número maior de espécies de plantas, pela economia que representa por não utilizar agentes geleificantes, sacarose e outras moléculas orgânicas; por otimizar as fases de enraizamento e aclimatação das plantas *ex vitro* e aumentar a qualidade das plantas micropropagadas. Alguns autores sugerem que uma combinação dos sistemas fotoautotróficos com a hidroponia e biorreatores de imersão temporária pode representar uma abordagem mais eficiente na micropropagação de plantas medicinais.

3- Intensificar os estudos sobre os mecanismos de ação das nanopartículas no controle da contaminação, da oxidação, promoção do crescimento e proliferação de ramos e raízes e na produção de diferentes tipos de metabólitos secundários. A elucidação dos mecanismos de ação das nanopartículas na multiplicação de ramos, no enraizamento, na interação com as cascatas de sinalização, que controlam o crescimento, o desenvolvimento, os mecanismos de defesa das plantas e as diferentes vias metabólicas permitirá otimizar, ainda mais, as diferentes fases da micropropagação e da produção de metabólitos secundários.

4- Intensificar os esforços no desenvolvimento de novos designs de biorreatores de imersão temporária, para superar as desvantagens que ainda existem relacionadas com vários aspectos do cultivo, visando aperfeiçoar os sistemas de cultivo em larga escala, diminuir ainda mais o custo de produção e aumentar a qualidade das plantas produzidas e, na área de produção de metabólitos secundários, garantir a alta produção de biomassa e o baixo custo de produção de quantidades cada vez maiores desses metabólitos, sob condições padronizadas.

REFERÊNCIAS

- AGUILLAR, M.H., WANG, X., ESCALONA, M. *et al.* Somatic embryogenesis of Arabica coffee in temporary immersion culture: Advances, limitations, and perspectives for mass propagation of selected genotypes. *Frontiers In Plant Science*, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.994578>
- ACHARJEE S., KUMAR, R., KUMAR N. Role of plant biotechnology in enhancement of alkaloid production from cell culture system of *Catharanthus roseous*: A medicinal plant with potent anti-tumor properties. *Industrial Crops & Products*, v. 176, 114298 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114298>
- AHAMAD, M.A., CHAUDHARY, S., DENG, X. *et al.* Nano-stevia interaction: past, present and future. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 201, 107807, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107807>
- ALVARD, D. *et al.* Commercial tissue culture: the case of micropropagation. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 6, p. 987-995, 2019.
- ARORA, K., RAI, M.K., SHARMA, A.K. Tissue culture mediated biotechnological interventions in medicinal trees: recent progress. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 150, p. 267-287, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02298-1>
- ASADI R., ABDOLLAHI, M.R., MOOSAVI, S.S. *et al.* Alginate encapsulation of micro-cuttings in endangered *Satureja khuzistanica* species: a promising method for obtaining genetically stable plants with high rosmarinic acid content. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 151, p. 307-320, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02353-x>
- ASADOLLABEI M. V., YOUSEFIFARD M., TABATABAEIAN J. *et al.* Effect of elicitors on secondary metabolites biosynthesis in *Zataria multiflora* Boiss. *Industrial Crops & Products*, v. 181, p. 114789, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114789>
- ASADOLLABEI M. V., TABATABAEIAN J., YOUSEFIFARD M. *et al.* Impact of elicitors on essential oil compositions and phytochemical constituents in *Lavandula stoechas* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 194, p. 722-730, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.019>
- AYOLLA-ORESANYA I.O., SONIBARE M.A., GUEYE B. *et al.* Elicitation of antioxidant metabolites in *Musa* species *in vitro* shoot culture using sucrose, temperature and jasmonic acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 146, p. 225-236, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02062-x>
- BERNELA, M., SETH, M., KAUR, N. *et al.* Harnessing the potential of nanobiotechnology in medicinal plants. *Industrial Crops & Products*, v. 194, 116266, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116266>
- BHARATI, R., FERNANDEZ-CUSIMAMANI, E., GUPTA, A. *et al.* Oryzalin induces polyploids with superior morphology and increased levels of essential oil production in

Menta spicata L. Industrial Crops & Products, v. 198, 116683, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116683>

BHASKAR, R., XAVIER, L.S.E., UDAYAKUMARAN, G. *et al.* Biotic elicitors: a boon for the in-vitro production of plant secondary metabolites. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 149, p. 7-24, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02131-1>

BILAL, R. M.; SHAHZAD, R.; HUANG, D. Phenolic Oxidation in Plant Tissue Culture: A Culprit for Callus Browning and Its Management. Turkish Journal of Agriculture, v. 2, n. 3, p. 51-60, 2017.

BISWAS, P., KUMARI, A., MODI, A. *et al.* Improvement and Regulation of Steviol Glycoside Biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Gene 147809, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147809>

CASTRO, R. D. D.; MOREIRA, L. A.; LIMA, M. F.; FIGUEIREDO, M. F. Variabilidade genética em populações de pitangueira oriundas de autopolinização e polinização livre, acessada por AFLP. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 32, p. 240-250, 2017.

CUONG, D.M., DU, P.C., THUNG, H.T. *et al.* Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis* – a valuable medicinal plant. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 146, p. 577-588, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s11240-021-02095-2>

DA SILVA, M.G.P; DA SILVA, M.M.P. Avaliação do uso de fitoterápicos em distúrbios psiquiátricos. Revista de Atenção à Saúde, v. 16, n. 56, p. 77-82, 2018.

DAMIAN, F. *et al.* Micropropagation techniques in different plant species: A review. International Journal of Horticultural Science and Technology, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2020.

DAS, S.L., SULTANA, K.W., CHANDRA, I. *In vitro* propagation, phytochemistry and pharmacology of *Basilicum polystachyon* (L.) Moench (Lamiaceae): A short review. South African Journal of Botany, v. 155, 178-186, 2023.

DE ARAÚJO CARVALHO, Sabrina Brabo *et al.* Estudo em bases de patentes sobre a andiroba e suas propriedades anti-inflamatórias. Research Medical Journal, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2019.

DE SOUZA, T.M.; PESSOA, C.V. Utilização de plantas medicinais por pacientes hipertensos atendidos em uma unidade básica de saúde.. Mostra Científica da Farmácia, v. 5, 2019.

DREGER, M., GRYSZCZYNSKA, A., SZALATA, M. *et al.* Micropropagation and HPLCPDAD, UPLC MS/MS analysis of oenothain b and phenolic acids in shoot cultures and in regenerated plants of fireweek (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub). Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 143, p. 653-663, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s11240-020-01949-5>

DUBOIS, T. *et al.* Micropropagation and conservation of orchids. Floriculture and Ornamental Biotechnology, v. 4, n. special issue 2, p. 1-16, 2010.

FIGUEIREDO, L.B.; PAIVA, P.M.H. Levantamento sobre a utilização de plantas medicinais por universitários e colaboradores do centro Universitário do Sul de Minas–Varginha MG. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 12, p. 101718-101735, 2017.

GEORGE, E. F., HALL, M. A., & DE KLERK, G. J. (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd Edition, Vol. 1). Springer, Países Baixos, 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (Eds.). *Plant propagation by tissue culture: Volume 1. The background*. Springer, 2018.

GRZEGORCZYK-KAROLAK, I., STANIEWSKA, P., LEBELT, L. *et al.* Optimization of cultivation conditions of *Salvia viridis* L. shoots in the Plantform bioreactor to increase polyphenol production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 149, p. 269-280, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02168-2>

HANUS-FAJERSKA, E., KOCOT, D., WISZNIEWSKA, A. *et al.* Micropropagation and experimental field cultivation of *Pulsatilla turczaninowii* Kryl. et Serg. (Ranunculaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 147, p. 477-489, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02140-0>

HAMBECK, M.; SENULA, A.; KODYM, A. Occurrence of latent bacteria during cryopreservation of long-term *in vitro* cultures of coltsfoot, *Tussilago farfara*. *CryoLetters*, v. 40, n. 6, p. 333-340, 2019

JADID, N., WIDODO, A.F., ERMAVITALINI, D. *et al.* The medicinal Umbelliferae plant fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): cultivation, traditional uses, phytopharmacological properties, and application in animal husbandry. *Arabian Journal of Chemistry*, 16, 104541, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.10454>

JAFERNIK, K., SZOPA, A., BARNAS, M. *et al.* *Schisandra henryi* C. B. Clarke *in vitro* cultures: a promising tool for the production of lignans and phenolic compounds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 143, p. 45-60, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01895-2>

JAIN, S. M. *In vitro* plant breeding. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016.

JUDD, R., BAGLEY, M.C., LI, MINGZHUO *et al.* Artemisin biosynthesis in non-glandular trichome cells of *Artemisia annua*. *Molecular Plant* v. 12, p. 704-714, 2022.

JUSTINE, A.K., KAUR, N., PATI, P.K. *et al.* Biotechnological interventions in banana: current knowledge and future prospects. *Helyon* 8, e11636, 2022. DOI: [10.1016/j.heliyon.2022.e11636](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11636)

KADER, A., SINHA, S.N., GHOSH, P. A strategy for development of genetically stable synseeds of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) suitable for *in vitro* storage. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 151, p. 47-58, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02329-x>

KAWKA, B., KWIECIEN, I., EKIERT H. Endogenous production of specific flavonoids and verbascoside in agar and agitated microshoot cultures of *Scutellaria lateriflora* L. and biotransformation potential. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 142, p. 471-482, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01837-y>

KUMARI, K., KUMAR, S., JHA, A.K. *et al.* Biotechnological intervention in genetic improvement and regulation of secondary metabolites production in *Ocimum sanctum* L. *Industrial Crops & Products* 187, 115329, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115329>

KEYMER, A. *et al.* Tissue culture-driven meristem and organ regeneration of plants. *Biotechnology Advances*, v. 49, p. 107758, 2021.

KIKOWSKA, M., THIEM, B., SZOPA, A. *et al.* Accumulation of valuable secondary metabolites: phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* systems of shoot cultures of the endangered plant species- *Erygium alpinum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 141, p. 381-391, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01795-5>

KIKOWSKA, M., DANEK, K., GORNOWICZ-POROWSKA, J. *et al.* Application of temporary immersion system RITA for efficient biomass multiplication and production of artificial seeds for ex situ conservation of *Linnaea borealis* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 151, p. 673-680, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02381-7>

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M., PROKOPIUK, B., DZIURKA, K. *et al.* The influence of different wavelengths of LED light on the productions of glucosinolatos and phenolic compounds and the antioxidant potential in *in vitro* cultures of *Nasturtium officinale* (watercress). *Plant Cell Tissue and organ Culture*, v. 149, p. 113-122, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02148-6>

KULUS, D., TYMOSZUK, A, JEDRZEJCZYK, I. *et al.* Gold nanoparticles and electromagnetic irradiation in tissue culture systems of bleeding heart: biochemical, physiological and cytogenetic effects. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 149, p. 715-734, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02236-1>

KUNAKHONNURUK, B., INTHEMA, P., KONGBANGKERD, A. Improving bacoside yield of *Bacopoa monnieri* (L.) Wettst. in temporary immersion system by increasing immersion time and lowering intervals. *Industrial Crops & Products*, v. 191, 115859, 2023. <https://doi.org/10.7717/peerj.7966>

LATA H., CHANDRA, S., TECHEN N. *et al.* *In vitro* mass propagation of *Cannabis sativa* L: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 3, p. 18-26, 2016.

LATA, H. *et al.* Propagation Through Tissue Culture. In: LATA, H.; CHANDRA, S.; KHAN, I.; ELSOHLY, M.A. *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology, p. 333-365. Springer, 2019.

LATA, H.; UCHENDU, E.; CHANDRA, S. A. Cryopreservation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. by V-cryoplate droplet-vitrification: the critical role of sucrose preculture. *CryoLetters*, v. 40, n. 5, p. 291 -298, 2019.

LATTUADA, Daiane Silva *et al.* Tipos de explantes para estabelecimento *in vitro* de orégano e hortelã. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 25, n. 3, p. 91-103, 2019.

LEROY, X. *et al.* Emergence of *in vitro* techniques for conservation of orchid germplasm. *Orchid Propagation*, p. 1-20, 2014.

LÓPEZ-PUC, Guadalupe *et al.* Direct somatic embryogenesis: A highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience, v. 41, n. 7, p. 1645-1650, 2018.

MAHAJAN, S., KADAM, J., DHAWAL, P. *et al.* Application of silver nanoparticles in *in vitro* plant growth and metabolite production: revisiting its scope and feasibility. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 150, p. 15-39, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02249-w>

MAKOWSKI, W., KDROLICKA, A., TOKARZ, B. *et al.* Temporary immersion bioreactors as a useful tool for obtaining high productivity of phenolic compounds with strong antioxidant properties from *Pontechium maculatum*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 152, p. 525-537, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02487-6>

MARTÍNEZ, M. *et al.* Micropropagation of banana: a review. In: Advances in Plant Transgenics: Methods and Applications (pp. 395-414). Springer, Singapura, 2019.

MIRZABE, A. H. *et al.* Temporary immersion systems (TISs): A comprehensive review. Journal of Biotechnonology, v. 357, p. 56-83, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.003>

MISHRA, P. *et al.* Tissue culture techniques for rapid multiplication of plantlets: a review. Green Farming, v. 10, n. 5, p. 881-885, 2019.

MISHRA, R.; JOSHI, R. K.; ZHAO, K. Base Editing in Crops: Current Advances, Limitations and Future Implications. Plant Biotechnology Journal, v. 18, n. 1, p. 20–31, 2020. <https://doi.org/10.1111/pbi.13225>

MOOD, K., JOGAM, P., SIRIKONDA, A. *et al.* Micropropagation, morpho-anatomical characterization, and genetic stability studies in *Lippia javanica* (Burm.f.) Spreng: a multipurpose medicinal plant. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 150, p. 427-437. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02294-5>

NAIR, D.S.; REGHUNATAH, B.R., SONI, K.B. *et al.* Cryopreservation of encapsulated axillary buds of *Clitoria ternatea* (L.). CryoLetters, v 40, n.1, p. 28 – 35, 2019.

NAM, N.B., TRIEU, L.N., VU, N.R. *et al.* Micropropagation of *Jasminanthes tuyetanhia*: an endemic and valuable herb in Vietnam. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 148, p. 35-44, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02158-4>

NITHYA, V., KAMALAM, M. Standardization of a protocol for micropropagation of *Eupatorium glandulosum* L. an important medicinal plant. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 146, p. 339-344, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02073-8>

PANDEY, A., VERMA, O., CHAND, S. *In vitro* propagation of *Alangium salviifolium* (L.f.) Wangerin: an important tropical medicinal tree. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 148, p. 15-22, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02155-7>

PÉREZ-TORNERO, O. *et al.* Tissue culture applications in plant genetic improvement. Current Issues in Molecular Biology, v. 28, p. 103-126, 2018.

RAHNGANATHA, M., RAO, N.N., GIRIDHAR, PL., SHARMA, A. Micropropagation and *in vitro* flowering in *Basella alba*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 154, p. 111-119, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02515-5>

REBELO, D., MARIZ-PONTE, N., LOUREIRO J. *et al.* A protocol for micropropagation of the medicinal species *Tuberaria lignosa* provides ploidy true-to-type plants with high antioxidant capacity. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 150, p. 599-609, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02313-5>

ROCHA, T.T., ARAÚJO, D.X., SILVA, A.M. *et al.* Morphoanatomy and changes in antioxidant defense associated with the natural ventilation system of micropropagated *Lippia dulcis* plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 151, p. 467-481. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02364-8>

ROSTAMI, F., RADJABIAN, T., ABRISHAMCHI, P. Enhancement of phenolic acids accumulation in *Salvia abrotanoides* (kar.) Sytsma shoot cultures under elicitation with nitric oxide. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 149, p. 441-453, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02252-1>

SATISH, S., VASUDEVAN, V., KARTHIK, S. *et al.* Impact of silver nanoparticles on the micropropagation of *Hybanthus enneaspermus* and assessment of genetic fidelity using RAPD and SCoT markers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 151, p. 443-449. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02350-0>

SAAVEDRA, A.M., CASTRO, T.C., CORDEIRO, L.S. *In vitro* propagation and cryopreservation of the medicinal species *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 144, p. 577–591, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01980-6>

SHAMITA, BEHERA, S., MISHRA, P. *et al.* Recent advances in tissue culture and secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 154, p. 13-28, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02525-3>

SHARMA, S.; PARASHER, K.; MUKHERJEE P. *et al.* a. Cryopreservation of a threatened medicinal plant, *Valeriana jatamansi* Jones, using vitrification and assessment of biosynthetic stability of regenerants. *CryoLetters*, v. 42, n.5, p. 300-308, 2021.

SHARMA, N., GOWTHAMI, R., DEVI, S.V. *et al.* b. Cryopreservation of shoot tips of *Gentiana kurroo* Royle – a critically endangered medicinal plant of India. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 144, p. 67-72, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01879-2>

SHEKHAWAT, M., MEHTA, S.R., MANOKAR, M. *et al.*, Morpho-anatomical and physiological changes of Indian sandalwood (*Santalum album* L.) plantlets in ex vitro conditions to support successful acclimatization for plant mass production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 147, p. 423-435, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02136-w>

SINGH, Y., KUMAR, U., PANIGRAHI, S. *et al.* Nanoparticles as novel elicitors in plant tissue culture applications: Current status and future outlook. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 203, 108004, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108004>

SRIVASTAVA, V., CHARUVERDI, R. An interdisciplinary approach towards sustainable and higher steviol glycoside production from *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Biotechnology*, v. 358, p. 76-91, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.018>

SOUZA, G. *et al.* Tissue culture protocols for straw berry improvement at Embrapa Clima Temperado. Strawberry Research, v. 3, p. 69-81, 2020.

SZOPA, A., KUBICA, P., KOMSTA, L. *et al.* The effect of feeding culture media with biogenetic precursors on high production of depsides in agitated shoot cultures of black and red aronias. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 142, p. 379-399, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01869-4>

SONI, R., SHANKAR, G., MUKHOPADHYAY, P. *et al.* A concise review on *Artemisia annua* L.: a major source of diverse medicinal compounds. Industrial Crops & Products 184, 115072, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115072>

SPINOZZI, E., FERRATI, M., CAPELLACCI, L. *et al.* *Carlina acaulis* L. (Asteraceae): biology, phytochemistry and application as a promising source of effective green insecticides and acaricides. Industrial Crops & Products v. 192, 116076, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116076>

VIANNA, M.G., GARCIA, R.O., MANSUR, E. *et al.* Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique: determination of the critical stages of the protocol. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v.129, p. 369-379, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01690-8>

VILLARDO, A.F.R.M.; MENDONÇA, T.F.; ENGELMANN, F. *et al.* Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of the medicinal species *Cleome spinosa* (Cleomaceae) applying vitrification-based techniques. CryoLetters, v. 40, n.4, p. 237 - 246, 2019.

YARTE, M.E., LLORENTE, B.E., LARRABURU, E.E. Native putatively endophytic bacteria from *Handroanthus impetiginosus* improve its *in vitro* rooting. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 151, p. 265-274, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02349-7>

Yu, L., DUAN, Y., HAN, H. An improved micropropagation of a medicinal plant *Stephania dentifolia*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 153, p. 219-224, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02443-w>

ZAREI, AL., BEHDARVANDI, B., DINANI, E.T. *et al.* *Cannabis sativa* L. photoautotrophic micropropagation: a powerful tool for industrial scale *in vitro* propagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v.57, p. 932-941, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10167-3>

ZHOU, J., GUO, F., QUI, C. *et al.* Efficient ex-vitro rooting and acclimatization for tissue culture plantlets of ginger. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 150, p. 451-458, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02296-3>