



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

ANA LUISA LÓPEZ VÁZQUEZ

**Aprimoramento da obtenção de calos e suspensões celulares
de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) e avaliação dos elicitores
NaCl, KCl, AlCl₃, SNP(NO), ABA e luz UV na produção de metabólitos
secundários**

MANAUS
2019

ANA LUISA LÓPEZ VÁZQUEZ

**Aprimoramento da obtenção de calos e suspensões celulares
de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) e avaliação dos elicitores
NaCl, KCl, AlCl₃, SNP(NO), ABA e luz UV na produção de metabólitos
secundários**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

MANAUS
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas

L864a López-Vázquez, Ana Luisa

Aprimoramento da obtenção de calos e suspensões celulares de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) e avaliação dos elicitores NaCl, KCl, AlCl₃, SNP(NO), ABA e luz UV na produção de metabólitos secundários / Ana Luisa López-Vázquez. Manaus : [s.n], 2019.

158 f.: color.; 28 cm.

Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019. Inclui bibliografia

Orientador: Nunez, Cecilia Veronica

1. Cultura de tecidos vegetais. 2. Iridoides. 3. Elicitação. I. Nunez, Cecilia Veronica (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Aprimoramento da obtenção de calos e suspensões celulares de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) e avaliação dos elicitores NaCl, KCl, AlCl₃, SNP(NO), ABA e luz UV na produção de metabólitos secundários

ANA LUISA LÓPEZ VÁZQUEZ

Aprimoramento da obtenção de calos e suspensões celulares de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) e avaliação dos elicitores NaCl, KCl, AlCl₃, SNP(NO), ABA e luz UV na produção de metabólitos secundários

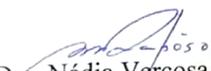
Data de aprovação: 30/04/2019

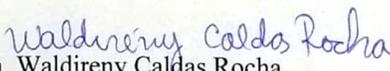
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

Banca examinadora:


Dra. Cecilia Veronica Nunez
CPF: 219.674.728-90


Dra. Nádia Verçosa de Medeiros Rapôso
CPF: 504.807.587-00


Dra. Waldireny Caldas Rocha
CPF: 508.437.962-00

MANAUS
2019

Dedicat3ria

A mi mam3 Adriana, a mi pap3 Rub3n y a mi hermana Giga, mi familia adorada.

“El que cree, crea, el que crea hace; el que hace se transforma a sí mismo y a la sociedad en la que vive”- Proverbio Maya

“Aquele que acredita, cria, aquele que cria faz; aquele que faz se transforma a ele mesmo e à sociedade em que ele vive ”- Provérbio Maia.

AGRADECIMENTOS

A Dios por ser tan bueno conmigo durante toda mi vida.

A mi mamá Adriana, por todo su amor, fuerza, apoyo, ejemplo, en fin, TODO, gracias por ser mi mayor inspiración.

A mi papá Rubén, por siempre impulsarme a soñar en grande, por darme el ejemplo de siempre sentir emoción por las cosas y a nunca rendirme.

A mi hermana Adriana (Giga) por ser mi mejor amiga y cómplice, gracias por tus incontables ánimos.

A mi familia y amigos que están en México gracias por sus ánimos. Siempre los llevo en mi corazón.

À minha orientadora a Dra. Cecilia Veronica Nunez pelos ensinamentos e a confiança. A senhora é uma inspiração para mim, obrigada por tudo.

As minhas amigas Lyanna e Stefhania pelos momentos compartilhados, sua ajuda e serem minha família no Brasil.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, em especial a David, Stefhania, Andrei, Aline, Leo, Fabi, Sabrina, Vanessa, Jennifer, Weison e Maitê, muito obrigada pelo seu acolhimento, amizade e apoio nesses dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA pela valiosa oportunidade.

À Dra. Maria Gracimar Pacheco de Araújo pela ajuda e conhecimentos compartilhados na descrição anatômica dos calos.

Aos técnicos da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais do INPA, em especial ao Magno pela disponibilidade em processar as muitas amostras.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e pelo auxílio financeiro.

À Organização dos Estados Americanos pela oportunidade.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal da UFAM pela infraestrutura.

Ao Laboratório Temático de Microscopia óptica e eletrônica do INPA pela infraestrutura.

RESUMO

A espécie *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) é produtora de metabólitos secundários importantes destacando-se os alcaloides indólicos com atividade antitumoral e antituberculose. Este trabalho teve como objetivo estabelecer culturas de plântulas, calos e suspensões *in vitro* da espécie, assim como avaliar o efeito de diversos elicitores no perfil químico dos calos de *D. macrophylla*. Foram usados como explantes as sementes dos frutos de *D. macrophylla* para a germinação e crescimento das plântulas *in vitro*. As sementes foram submetidas a diferentes tratamentos e foram testadas nas concentrações de 0, 2, 5 e 10 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) para a indução da germinação em meio Murashige e Skoog (MS). Após, foram usadas como explantes as folhas das plântulas germinadas, nas quais foram testadas distintas concentrações de reguladores de crescimento de plantas (PGRs), sendo eles: as auxinas ácido α -naftaleno acético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e as citocininas *N*-Benzil-9-(2-tetrahidropiranyl)-adenina (BAP) e a cinetina (KIN) para a indução de calos. Todos os tratamentos foram expostos a duas condições de luz: 24 h no escuro e fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) e ambas com temperatura constante de 26 °C. A melhor resposta (70%) para a indução de calos semi-friável (CS) foi na presença dos reguladores de crescimento BAP e ANA na concentração de 2 mg.L⁻¹ para ambos. A condição de 24 h no escuro foi significativa para a formação de calo branco e semifriável para todas as combinações de PGRs e a partir desses calos foram estabelecidas suspensões celulares. Foram definidas as curvas de crescimento e realizadas as análises fitoquímicas de ambas as culturas por CCDC e RMN de ¹H apresentando diferenças no crescimento e no perfil químico de ambas. Do fracionamento do extrato metanólico dos calos foi isolado um iridoide glicosilado que ainda se encontra em processo de elucidação. Este é o primeiro relato da presença de iridoídes na espécie. Foi avaliado o efeito de distintas concentrações dos elicitores NaCl, KCl, AlCl₃, SNP (NO), ABA e diferentes tempos de exposição a raios UV, no perfil químico e na produção do iridoide nos calos. Os resultados foram avaliados por meio de análises quimiométricas: análise de componentes principais (PCA)/ *Fuzzy* e análise hierárquica de *clusters* (HCA). Os elicitores SNP e AlCl₃ mostraram ter maior efeito no perfil químico e na produção do iridoide nos calos, enquanto NaCl, KCl e ABA inibiram a produção do mesmo. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram o grande potencial do uso da elicitação nos calos da espécie *D. macrophylla* e estimulam a continuação do estudo visando a indução da produção dos metabólitos ativos da planta.

ABSTRACT

Duroia macrophylla Huber (Rubiaceae) is a species that produces important secondary metabolites, highlighting the indole alkaloids with antitumoral and antituberculosis activities. The objective of this work was to establish seedling cultures, calluses and cell suspensions *in vitro* of the species, as well as to evaluate the effect of various elicitors on the chemical profile of calluses of *D. macrophylla*. Seeds from *D. macrophylla* fruits were used as explants for *in vitro* germination and seedling growth. The seeds were submitted to different treatments and were tested at concentrations of 0, 2, 5 and 10 mg.L⁻¹ of gibberellic acid (GA₃) for the induction of germination in Murashige and Skoog (MS) medium. The germinated seedlings were then used as explants in which different concentrations of plant growth regulators (PGRs) were tested, such as α -naphthalene acetic acid (ANA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and the cytokinins N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)-adenine (BAP) and kinetin (KIN) for callus induction. All treatments were exposed to two light conditions: 24 h in the dark and photoperiod of 16/8 h (light / dark), both with a constant temperature of 26 °C. The best response (70%) for the induction of semi-friable callus (SC) was in the presence of growth regulators BAP and ANA at the concentration of 2 mg.L⁻¹ for both. The 24 h condition in the dark was significant for the formation of white and semi-friable callus for all combinations of PGRs and from these callus cell suspensions were established. Growth curves were defined and the phytochemical analyzes of both cultures were performed by TLC and ¹H NMR showing differences in growth and chemical profile of both. From the fractionation of the methanolic extract of the callus was isolated an iridoide-glycoside that is still in the process of elucidation. This is the first report of the presence of iridoids in the species. The effect of different concentrations of the NaCl, KCl, AlCl₃, SNP (NO), ABA and different UV exposure times on the chemical profile and iridoid production in the callus was evaluated. The results were evaluated by chemometrics analysis: Principal Component Analysis (PCA)/ Fuzzy and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and fuzzy. The elicitors SNP and AlCl₃ were shown to have a greater effect on the chemical profile and the production of the iridoid in the calluses, whereas NaCl, KCl and ABA inhibited its production. The results obtained in this work demonstrate the significant potential of the use of elicitation in calluses of the species *D. macrophylla* and encourage the continuation of the study aiming the induction of the production of the active metabolites of the plant.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais efeitos dos reguladores de crescimento das plantas (PGRs) e exemplos de utilização.	30
Tabela 2. Substâncias isoladas das espécies do gênero <i>Duroia</i>	43
Tabela 3. Tratamentos de desinfestação das sementes de <i>D. macrophylla</i>	59
Tabela 4. Tratamentos para a indução de calo friável a partir das folhas das plântulas.	61
Tabela 5. Tratamentos de elicitação com os sais.	64
Tabela 6. Tratamentos de elicitação com moléculas sinalizadoras.	64
Tabela 7. Composição de meios de cultura usados em cultura de tecidos <i>in vitro</i>	66
Tabela 8. Tratamentos com ANA e BAP para a otimização da formação de calo friável.	67
Tabela 9. Extratos provenientes das plântulas germinadas de <i>D. macrophylla</i> (teste de germinação).	69
Tabela 10. Extratos dos calos de <i>D. macrophylla</i> tratados com elicitores.	70
Tabela 11. Porcentagem de sementes vivas e assépticas e contaminadas após os tratamentos de desinfestação.	76
Tabela 12. Porcentagem (%) de germinação após 3 - 6 meses.	79
Tabela 13. Porcentagem de brotação de folhas após 3 - 6 meses.	80
Tabela 14. Porcentagens dos tipos de calos de <i>D. macrophylla</i> formados nos distintos tratamentos	82
Tabela 15. Constantes do modelo de Gompertz dos calos de <i>D. macrophylla</i>	87
Tabela 16. Curvas de crescimento dos calos de <i>D. macrophylla</i> ajustadas ao modelo de Gompertz.	88
Tabela 17. Constantes do modelo de Gompertz das suspensões de <i>D. macrophylla</i>	91
Tabela 18. Parâmetros cinéticos dos calos e das células em suspensão de <i>D. macrophylla</i>	93
Tabela 19. Parâmetros cinéticos de suspensões celulares de Rubiáceas	94
Tabela 20. Porcentagem de tipos de calo formados nos tratamentos com ANA e BAP.	96
Tabela 21. Porcentagem de tipos de calo formados nos diferentes meios de cultura acrescidos com 2 ANA + 2 BAP (mg.L ⁻¹).	97
Tabela 22. Análise em CCDC das frações obtidas da coluna 1 (Sephadex LH-20).	108
Tabela 23. Análise das frações da coluna 2 de SiO ₂ por CCDC.....	109
Tabela 24. Rendimentos do fracionamento dos calos de <i>D. macrophylla</i>	110
Tabela 25. Deslocamentos dos sinais do hidrogênio da substância I.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas gerais principais de classes de flavonoides.....	24
Figura 2. Estrutura de isopreno	26
Figura 3. Esqueletos do iridiano, iridoide e secoiridoide	26
Figura 4. Esquema dos diferentes explantes e culturas que se podem estabelecer com a técnica de cultura de tecidos (GROUT, 2017).....	29
Figura 5. Estruturas químicas de algumas auxinas usadas na cultura de tecidos.	31
Figura 6. Estruturas químicas de algumas citocininas usadas na cultura de tecidos	31
Figura 7. Estrutura química do Ácido Giberélico (Giberelina)	31
Figura 8. Tipos de calos que podem ser formados na Calogênese (IKEUCHI <i>et al.</i> , 2013).	33
Figura 9. Curva de crescimento típica de células vegetais, na qual se relaciona a concentração de células nas diferentes fases com o tempo de incubação.	35
Figura 10. Distribuição das espécies da família Rubiaceae no mundo em número de indivíduos coletados (TROPICOS, 2019).....	41
Figura 11. <i>Duroia macrophylla</i> Huber A) Indivíduo adulto B) Fruto C) Flor Fotos: A e B) López-Vázquez, A. C) Ribeiro <i>et al.</i> , 1999.	49
Figura 12. Calo de <i>D. macrophylla</i> cultivado no meio MS acrescido com 4 2,4-D +2 KIN mg. L ⁻¹ . A) Calo compacto e clorofilado B) Calo friável C) Calo oxidado (ZANCA, 2015).....	51
Figura 13. Proteínas envolvidas na síntese do metabolismo secundário de calos, folhas e galhos de <i>D. macrophylla</i> (COELHO, 2019).....	52
Figura 14. Exemplo de um dendrograma gerado do agrupamento de 8 itens (DOWNS e BARNARD, 2002).....	55
Figura 15. Frutos de <i>D. macrophylla</i> A: Frutos, B: Sementes, C: Tegumentos	58
Figura 16. Esquema dos estágios das plântulas germinadas <i>in vitro</i>	60
Figura 17. Plântulas de <i>D. macrophylla</i> germinadas no viveiro do LABB-INPA.....	60
Figura 18. Exposição dos calos a radiação UV ₃₆₅ . (Vista lateral e superior).....	65
Figura 19. Processo de germinação <i>in vitro</i> das sementes de <i>D. macrophylla</i> 1. Emergência do hipocótilo, 2. Alongamento do hipocótilo e emergência da radícula, 3. Alongamento do hipocótilo e crescimento das raízes secundárias, 4. Primórdio foliar e exposição dos cotilédones, 5. Desenvolvimento foliar, 6. Plântula totalmente formada.	77
Figura 20. Porcentagens de germinação das sementes tratadas com AG ₃	77
Figura 21. Tipos de calos formados a partir de explante folhar de <i>D. macrophylla</i> : a) calo branco com raiz, b) calo clorofilado com raiz, c) calo clorofilado compacto, d) calo branco compacto, e) calo semifriável.	81
Figura 22. Formação de calos em explantes folhares de <i>D. macrophylla</i> durante 6 semanas.....	81
Figura 23. Gráfico de perfil dos tratamentos em porcentagem de formação de calos semifriáveis.	83
Figura 24. Calos de <i>D. macrophylla</i> observados no microscópio de luz 40X. A. Células dos calos B e D. Células alongadas da periferia C. Células esféricas.	85

Figura 25. Calos de <i>D. macrophylla</i> corados com Azul de Astra e Safranina observados no microscópio de luz.....	86
Figura 26. Calos semifriáveis do tratamento H (2 ANA + 2 BAP mg.L ⁻¹) de <i>D. macrophylla</i> em diferentes dias da curva de crescimento.	87
Figura 27. Suspensão celular de <i>D. macrophylla</i> A. Calo friável inoculado , B. Agregados celulares formados.....	89
Figura 28.Suspensões celulares de <i>D. macrophylla</i> em diferentes dias da curva de crescimento.	91
Figura 29.Curvas de crescimento das células em suspensão de <i>D. macrophylla</i> ajustadas ao modelo de Gompertz.	92
Figura 30.Gráfico de perfil em porcentagem de formação de calo friável em distintas concentrações de ANA e BAP.	96
Figura 31. Calos de <i>D. macrophylla</i> corados com FeCl ₃ observados no microscópio de luz. 1. Controle, 2. C. 50 mM KCl, 3. 0,15 mM AlCl ₃ , 4. 50 mM NaCl.	98
Figura 32.Calos de <i>D. macrophylla</i> corados com o reagente de Wagner observados no microscópio de luz. 1. Controle, 2. 50 mM KCl, 3. 0,15 mM AlCl ₃ , 4. 50 mM NaCl.	99
Figura 33. Calos de <i>D. macrophylla</i> corados com H ₂ SO ₄ observados no microscópio de luz. 1. Controle, 2. 50 mM KCl, 3. 0,15 mM AlCl ₃ , 4. 50 mM NaCl.	99
Figura 34. CCDC dos microextratos dos testes de germinação. Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2. A) UV ₃₆₅ , B) UV ₂₅₄ , C) Anisaldeído sulfúrico. Extratos MeOH: 1. Tegumento, 2. Semente, 3. Caule, 4. Folhas viveiro, 5. Raízes viveiro 6. Planta completa viveiro, 7. Plântulas <i>in vitro</i> estágio 1, 8. Estágio 2, 9. Estágio 3.	101
Figura 35. CCDC dos extratos de culturas <i>in vitro</i> de <i>D. macrophylla</i> . Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2.	103
Figura 36. Placas CCDC observadas em lux UV ₃₆₅ e reveladas com anisaldeído sulfúrico das triplicatas de distintos tempos de cultura dos calos de <i>D. macrophylla</i>	104
Figura 37. Placas CCDC observadas em lux UV ₃₆₅ e reveladas com anisaldeído sulfúrico das triplicatas de distintos tempos de cultura das suspensões celulares de <i>D. macrophylla</i>	105
Figura 38. Placas de CCDC observadas na luz UV ₂₅₄ dos extratos dos calos de <i>D. macrophylla</i> tratados com diferentes elicitores (AcOEt/ MeOH 8:2).	106
Figura 39. Placas de CCDC reveladas com anisaldeído sulfúrico dos extratos dos calos de <i>D. macrophylla</i> tratados com diferentes elicitores (AcOEt/ MeOH 8:2).	107
Figura 40. Placas de CCDC observadas na luz UV ₃₆₅ dos extratos dos calos de <i>D. macrophylla</i> tratados com diferentes elicitores (AcOEt/ MeOH 8:2).	107
Figura 41. Placas de CCDC das frações da coluna 1 (Sephadex LH-20).	108
Figura 42. Placa de CCDC das frações 3-5 da coluna 2 de SiO ₂ observadas na luz UV ₃₆₅	109
Figura 43. Cromatograma de purificação por CLAE da fração 3 obtida da CCDC (H ₂ O/MeOH 80:20).	110

Figura 44. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato metanólico dos calos de <i>D. macrophylla</i>	111
Figura 45. Proposta do esqueleto da Substância I com alguns dos deslocamentos químicos identificados.....	112
Figura 46. Espectros de RMN de ^1H de diferentes extratos metanólicos de <i>D. macrophylla</i>	113
Figura 47. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H na região entre δ_{H} 5-8 de diferentes extratos de <i>D. macrophylla</i>	114
Figura 48. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H entre δ_{H} 8 - 10,5 de diferentes extratos de <i>D. macrophylla</i>	115
Figura 49. Esqueleto básico de feniletanoides glicosilados produzidos por culturas <i>in vitro</i> de tecidos vegetais (PIAŁCZAK <i>et al.</i> , 2018).	116
Figura 50. Espectros de RMN de ^1H dos calos e suspensões celulares de <i>D. macrophylla</i>	117
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H da curva de crescimento dos calos de <i>D. macrophylla</i>	119
Figura 52. Ampliações dos espectros de RMN de ^1H da curva de crescimento dos calos de <i>D. macrophylla</i>	120
Figura 53. Gráfico da produção do iridoide e a substância envolvida na síntese ao longo do tempo nos calos de <i>D. macrophylla</i>	120
Figura 54. Gráfico da produção de massa e do iridoide ao longo do tempo nos calos de <i>D. macrophylla</i>	121
Figura 55. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da região entre δ_{H} 5,5 e 8,0 da curva de crescimento das suspensões de <i>D. macrophylla</i>	122
Figura 56. Gráfico de ordenação de <i>clusters</i> PCA/Fuzzy dos scores dos espectros inteiros de extratos de <i>D. macrophylla</i> . 1. Caule viveiro, 2. Plântula <i>in vitro</i> Est 2, 3. Plântula <i>in vitro</i> Est 3, 4. Folha viveiro, 5. Raiz viveiro, 6. Semente, 7. Tegumento.....	123
Figura 57. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos) dos espectros de RMN de ^1H sobre os <i>loadings</i> das amostras de plântulas, sementes e tegumentos. Cada número representa uma região do espectro (ANEXO 2), os pontos em vermelho representam os deslocamentos dos sinais que afetam a localização das amostras no mapa.....	124
Figura 58. Gráfico de ordenação hierárquica de <i>clusters</i> (HCA) dos espectros inteiros de extratos de <i>D. macrophylla</i> . 1. Caule viveiro, 2. Plântula <i>in vitro</i> Est 2, 3. Plântula <i>in vitro</i> Est 3, 4. Folha viveiro, 5. Raiz viveiro, 6. Semente, 7. Tegumento, 8. Plântula viveiro.....	125
Figura 59. Sinais selecionados para fazer a análise quimiométrica dos microextratos do material vegetal do teste de germinação.....	126
Figura 60. A) Gráfico de ordenação de <i>clusters</i> PCA/Fuzzy dos scores dos sinais δ_{H} 5,98 (iridoide) e 8,95 (hidrogênio aromático), 9,4 e 10,5 ppm (hidrogênios ligados a nitrogênios) presentes nos extratos de <i>D. macrophylla</i> . 1. Caule viveiro, 2. Plântula <i>in vitro</i> Est 2, 3. Plântula <i>in vitro</i> Est 3, 4. Folha viveiro, 5. Raiz viveiro, 6. Semente, 7. Tegumento, 8. Plântulas viveiro.....	127
Figura 61. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos do iridoide e hidrogênios ligados a nitrogênios) dos espectros de RMN de ^1H sobre os <i>loadings</i> das amostras de plântulas, sementes e tegumentos. Cada número	

representa uma região do espectro, os pontos em vermelho representam os deslocamentos dos sinais que afetam a localização das amostras no mapa.	127
Figura 62. Gráfico de ordenação hierárquica de <i>clusters</i> (HCA) com os sinais δ_H 5,98 ppm (iridoide) e 8,95 ppm, 9,4 ppm e 10,5 ppm (hidrogênios ligados a nitrogênios) dos extratos de <i>D. macrophylla</i> : 1. Caule viveiro, 2. Plântula <i>in vitro</i> Est 2, 3. Plântula <i>in vitro</i> Est 3, 4. Folha viveiro, 5. Raiz viveiro, 6. Semente, 7. Tegumento, 8. Plântulas viveiro.....	128
Figura 63. Gráfico de ordenação de <i>clusters</i> PCA/Fuzzy dos espectros inteiros dos calos elicitados de <i>D. macrophylla</i> : 1. Dm-100 K, 2. Dm-100 Na, 3. Dm-10 Al, 4. Dm-15 Al, 5. Dm-200 K, 6. Dm-200K, 7. Dm-25 Al, 8. Dm-50 K, 9. Dm-50 Na, 10. Dm-10 S, 11. Dm-20 S, 12. Dm-30 S, 13. Dm-3 A, 14. Dm-5 S, 15. Dm-6 A, 16. Dm-9 A, 17. Dm-10 UV, 18. Dm-25 UV, 19. Dm-45 UV, 20. Dm-Controle.....	129
Figura 64. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos) dos espectros de RMN de 1H sobre os <i>loadings</i> das amostras dos calos elicitados. Cada número representa uma região do espectro (ANEXO 4), os pontos em vermelho representam os deslocamentos dos sinais que afetam a localização das amostras no mapa.	130
Figura 65. Gráfico de ordenação hierárquico de <i>clusters</i> HCA d dos espectros inteiros dos calos elicitados de <i>D. macrophylla</i> : 1. Dm-100 K, 2. Dm-100 Na, 3. Dm-10 Al, 4. Dm-15 Al, 5. Dm-200 K, 6. Dm-200K, 7. Dm-25 Al, 8. Dm-50 K, 9. Dm-50 Na, 10. Dm-10 S, 11. Dm-20 S, 12. Dm-30 S, 13. Dm-3 A, 14. Dm-5 S, 15. Dm-6 A, 16. Dm-9 A, 17. Dm-10 UV, 18. Dm-25 UV, 19. Dm-45 UV, 20. Dm-Controle.	131
Figura 66. Gráfico de ordenação de <i>clusters</i> PCA/Fuzzy das regiões do espectro dos sinais do iridoide nos calos elicitados de <i>D. macrophylla</i> : 1. Dm-100 K, 2. Dm-100 Na, 3. Dm-10 Al, 4. Dm-15 Al, 5. Dm-200 K, 6. Dm-200K, 7. Dm-25 Al, 8. Dm-50 K, 9. Dm-50 Na, 10. Dm-10 S, 11. Dm-20 S, 12. Dm-30 S, 13. Dm-3 A, 14. Dm-5 S, 15. Dm-6 A, 16. Dm-9 A, 17. Dm-10 UV, 18. Dm-25 UV, 19. Dm-45 UV, 20. Dm-Controle.	132
Figura 67. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos) dos sinais dos hidrogênios do iridoide sobre os <i>loadings</i> das amostras dos calos elicitados. Os pontos em vermelho representam os deslocamentos dos sinais que afetam a localização das amostras no mapa.	133
Figura 68. Proporção da produção do iridoide em relação ao sinal do hidrogênio em δ_H 5,98 ppm nos tratamentos de elicitação.....	134

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ_{\max} - Velocidade máxima de crescimento específico(d^{-1})
(NH_4)₂SO₄- Sulfato de amônio
°C- Graus Celsius
¹H- Hidrogênio
2,4,D - Ácido Diclorofenoxiacético
a- Concentração máxima de células (g/L)
ABA- Ácido abscísico
ACN- Acetonitrila
AcOEt- Acetato de etila
AG₃- Ácido giberélico
AIA- Ácido indol-acético
AlCl₃ - Cloreto de alumínio
ANA- Ácido naftaleno acético
b- Constante do modelo de Gompertz
BAP- 6-Benzilamiopurina
c- Constante do modelo de Gompertz
Ca(NO₃)₂- Nitrato de Cálcio
CaCl₂ - Cloreto de Cálcio
CC- Cromatografia em coluna aberta
CCDC- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP- Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
Ce(SO₄)₂- Sulfato Cérico
CHCl₃- Clorofórmio
CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm- Centímetros
CO₂- Dióxido de Carbono
CoCl₂- Cloreto de Cobalto
CuSO₄- Sulfato de Cobre
DCM- Diclorometano
DMSO-*d*₆- Dimetilsulfóxido
e- exp(1)
Fe- Ferro
FeCl₃- Cloreto Férrico
FeNa EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, Ferro- Sódio
FeSO₄- Sulfato de Ferro
g- Gramas
G- Tempo de geração
GTP - Proteínas G

h- horas
H₂O- Água
H₂SO₄- Ácido Sulfúrico
H₃BO₃- Ácido Bórico
HCA- Análise hierárquica de cluster
HCl- Ácido Clorídrico
HSV -*Herpes simplex vírus*
I.C. - Índices de crescimento
INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
JA- Ácido jasmônico
K₂SO₄- Sulfato de Potássio
KCl- Cloreto de Potássio
KH₂PO₄- Fosfato Monopotássico
KI- Iodeto de Potássio
KIN- Cinetina
Km- Quilômetros
KNO₃-Nitrato de Potássio
KOH- Hidróxido de Potássio
L- Litros
LABB- Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia
lag- Fase de atraso
LC-MS- Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
log- Fase exponencial ou logarítmica
MAPK- Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MeOH- Metanol
mg- Miligramas
MgSO₄- Sulfato de Manganês
MHz- Megahertz
mL- Mililitros
mM- Milimolar
MnSO₄- Sulfato de Manganês
MS- Murashige e Skoog
Na₂EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, Sódio
Na₂MoO₄- Sódio Molibdato
NaCl- Cloreto de sódio
NaClO- Hipoclorito de sódio
NH₄NO₃- Nitrato de amônio
nm- Nanômetros
NO- Óxido nítrico
NP/PEG- 2-aminoetil difenilborinato/polietilenoglicol
PCA- Análise de Componentes Principais

PEG- Polietilenoglicol
PGRs- Reguladores de crescimento
pH- Potencial de hidrogênio
PVP- Polivinilpirrolidona
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
rpm- Revoluções por minuto
s- Segundos
SiO₂- Sílica
SNP- Nitroprussiato de sódio
t- tempo de cultura (d)
TDZ- Tidiazurona
tR- Tempo de retenção
UV- Ultravioleta
WPM- Woody Plant Basic Medium
X- Massa das células (g)
X₀- Massa inicial de células (g)
X_{max}- Massa máxima de células (g)
ZnSO₄- Sulfato de Zinco
δ_H- Deslocamento químico de hidrogênio
λ - Tempo de fase *lag* (d)
μg- Microgramas
μM- Micromolar
μmol- Micromoles

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	22
2.1.1 SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS	23
2.1.2 ALCALOIDES	24
2.1.3 TERPENOS	25
2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	27
2.2.1 CALOGÊNESE	32
2.2.2 SUSPENSÕES CELULARES	34
2.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS VEGETAIS	34
2.4 ELICITAÇÃO	37
2.4.1 SALINIDADE E ESTRESSE OSMÓTICO	38
2.4.2 MOLÉCULAS SINALIZADORAS	39
2.4.3 EXPOSIÇÃO A RAIOS UV	40
2.5 FAMÍLIA RUBIACEAE	41
2.5.1 GÊNERO DUROIA	42
2.5.2 DUROIA MACROPHYLLA HUBER	49
2.6 QUIMIOMETRIA	52
2.6.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	53
2.6.2 FUNÇÕES DE ASSOCIAÇÃO FUZZY (FUZZY C-MEANS)	53
2.6.3 ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTER (HCA)	54
3 OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO GERAL	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	57
4.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	57
4.2.1 ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS IN VITRO	57
4.2.2 INDUÇÃO DE CALO A PARTIR DE FOLHAS DAS PLÂNTULAS GERMINADAS	61
4.2.3 CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS	61
4.2.4. ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES CELULARES E A CURVA DE CRESCIMENTO	62
4.3 ELICITAÇÃO DOS CALOS	63
4.3.1 ESTRESSE SALINO	63
4.3.2 ADIÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS ÓXIDO NÍTRICO (NO) E ÁCIDO ABCSÍCIO (ABA)	64
4.3.3 ESTRESSE POR UV	65
4.4 CONDIÇÕES TESTADAS PARA MELHORAR (OU INDUZIR) A FORMAÇÃO DE CALO FRIÁVEL	65
4.4.1 MEIOS DE CULTURA	65
4.4.2 CONCENTRAÇÃO DE HORMÔNIOS NOS MEIOS DE CULTURA	67
4.5 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DOS CALOS	67
4.6 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	69
4.6.1 EXTRATOS PROVENIENTES DO TESTE DE GERMINAÇÃO	69
4.6.2 CALOS E SUSPENSÕES	69

4.7 ANÁLISE DOS EXTRATOS	70
4.7.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC)	70
4.7.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DOS CALOS DE <i>D. MACROPHYLLA</i>	71
4.7.3 IDENTIFICAÇÃO/ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA	73
4.8 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS EXTRATOS	73
4.8.1 MICROEXTRATOS DOS TESTES DE GERMINAÇÃO	74
4.8.2 CALOS E SUSPENSÕES	74
4.8.3 CALOS ELICITADOS	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 CULTURA DE TECIDOS <i>IN VITRO</i>	75
5.1.1 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES	75
5.1.2 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES	76
5.1.3 INDUÇÃO DE CALOS	80
5.2 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DOS CALOS DE <i>D. MACROPHYLLA</i>	84
5.3 CURVAS DE CRESCIMENTO	86
5.3.1 CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS	86
5.3.2 ESTABELECIMENTO E CURVA DE CRESCIMENTO DAS SUSPENSÕES CELULARES	89
5.3.3 PARÂMETROS CINÉTICOS	93
5.4 MELHORAMENTO DA FORMAÇÃO DE CALO FRIÁVEL	95
5.5 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DOS CALOS	97
5.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS	100
5.6.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC)	100
5.6.2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO DOS CALOS	108
5.6.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	111
5.7 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA	122
5.7.1 MICROEXTRATOS DOS TESTES DE GERMINAÇÃO	122
5.7.2 CALOS ELICITADOS	128
5 CONCLUSÕES	138
6 ANEXOS	139
ANEXO 1	139
ANEXO 2	140
ANEXO 3	142
ANEXO 4	143
ANEXO 5	144
ANEXO 6	146
7. REFERÊNCIAS	147

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm a capacidade de sintetizar uma extensa variedade de metabólitos secundários, que servem como defesa química e proteção contra herbívoros ou patógenos microbiológicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). A produção de metabólitos secundários por meio de cultivo de plantas em campo tem muitas desvantagens como os baixos rendimentos e flutuação nas concentrações devido às variações ambientais (MURTHY; LEE; PAEK, 2014). A fim de evitar essa variação, surgiu o interesse pela utilização de tecnologias de cultura de tecidos de plantas (FUMAGALI *et al.*, 2008).

A cultura de tecidos vegetais utiliza a cultura de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas *in vitro* que proporcionam à cultura um ambiente propício para seu crescimento e multiplicação (HUSSAIN *et al.*, 2012; THORPE, 2012). Dentre os principais tipos de culturas de tecidos vegetais *in vitro* para a produção de metabólitos secundários encontram-se os calos que são uma massa de células vegetais e as suspensões celulares (BOURGARD, 2001) nas quais é possível maximizar a produção da biomassa e metabólitos de interesse (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2016).

O crescimento de células vegetais pode ser avaliado para construir um perfil de crescimento celular que pode então ser subdividido nas fases *lag*, exponencial, linear, estacionária e de morte. Esse perfil pode ser modelado em modelos matemáticos, como por exemplo a equação de Gompertz que permite a determinação de importantes valores de parâmetros cinéticos o qual facilitará a otimização dos bioprocessos (OMAR *et al.*, 2006).

A produção de metabólitos secundários de plantas pela técnica de cultura de tecidos vegetais ainda enfrenta muitas limitações biotecnológicas, como o baixo rendimento dos metabólitos secundários das plantas nas culturas vegetais. Por isso, algumas estratégias vem sendo desenvolvidas para melhorar o rendimento desses metabólitos (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005). Essas estratégias incluem o tratamento com vários elicitores, que são substâncias

químicas ou fatores físicos, que podem desencadear uma resposta de estresse nas culturas, resultando no acúmulo de metabólitos secundários (VASCONSUELO e BOLAND, 2007).

A espécie *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) tem sido estudada por possuir atividades biológicas interessantes. A espécie é produtora de triterpenos e alcaloides com atividade frente a *Mycobacterium tuberculosis* (MARTINS *et al.*, 2013) e alcaloides indólicos com atividade antitumoral (NUNEZ e VASCONCELLOS, 2012). Em calos multiformes da espécie só foi encontrada a presença de terpenos (ZANCA, 2015; TANANTA, 2017), porém, eles produzem proteínas envolvidas na síntese de alcaloides, o qual confirma que os mesmos possuem a capacidade de sintetizar os alcaloides de interesse farmacêutico (COELHO, 2019).

Várias técnicas analíticas para a caracterização de metabólitos de plantas vêm sendo usadas, por exemplo a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), as quais são usadas junto com técnicas multivariadas ou de reconhecimento de padrões que permitem analisar conjuntos de dados complexos (WANG, 2007). A análise multivariada usada no tratamento de dados químicos, é chamada de *Quimiometria* (SENA e POPPI, 2000). Uma das análises multivariadas mais usadas na quimiometria é a Análise de Componentes Principais (ACP) a qual identifica amostras parecidas e acaba agrupando-as. Também pode ser usado um método que envolve o uso de funções de associação *fuzzy* (difusas) que agrupa os dados em subconjuntos (*clusters*) (BRERETON, 2007).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabólitos Secundários

As plantas são historicamente fontes naturais importantes de substâncias biologicamente ativas e com uma enorme variabilidade química estrutural, utilizadas por séculos pelos seres humanos na sua vida cotidiana como medicamentos, sendo até hoje empregados em clínicas (BRAGA; RATES; SIMÕES, 2017; CETIN, 2014; FRANÇA, 2017). O uso de produtos naturais na sociedade representa uma alternativa entre as fontes de insumos necessários para a vida cotidiana, por ter a vantagem de serem renováveis (BERNARDES *et al.*, 2017). Até o ano de 2015 tinham sido identificados aproximadamente 325.000 produtos naturais (BANERJEE *et al.*, 2015) dos quais, segundo PÉREZ-ALONSO; JIMÉNEZ (2011), 100.000 são de origem vegetal e aproximadamente 1.600 novas estruturas químicas de plantas superiores são descritas a cada ano, das quais um grande número possui atividade biológica.

As plantas têm a capacidade de sintetizar uma extensa variedade de moléculas orgânicas chamadas metabólitos secundários, que servem como defesa química e proteção contra ataques de herbívoros ou patógenos microbiológicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000), além de proteção contra a seca, salinidade e a radiação UV (CETIN, 2014). Alguns deles agem como atrativos (odor, cor ou sabor) para animais polinizadores e dispersadores de sementes, atuando também como agentes na competição planta-planta e nas simbioses plantas-microrganismos (TAIZ e ZEIGER, 2010).

Esses metabólitos secundários são produzidos em partes específicas de plantas em estágios de desenvolvimento definidos. As quantidades são frequentemente baixas (menos de 1% do peso seco) e altamente variáveis (DAVEY, 2017). Os metabólitos secundários vegetais produzidos pelas plantas, podem ser divididos em três principais classes químicas: as substâncias fenólicas, os terpenos e os alcaloides (substâncias nitrogenadas) (TAIZ e ZEIGER, 2010).

2.1.1 Substâncias fenólicas

As plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários que contêm um anel aromático com um grupo hidroxila funcional, chamado fenol. As substâncias que contêm esse grupo fenol, são chamadas substâncias fenólicas e são formadas a partir de duas rotas básicas: a rota do ácido chiquímico e a do ácido malônico (DEWICK, 2002). Constituem um grupo de metabólitos muito diverso, com aproximadamente 100.000 moléculas conhecidas (TAIZ e ZEIGER, 2010). Este grupo inclui metabólitos derivados da condensação de unidades de acetato (terpenoides), aqueles produzidos pela modificação de aminoácidos aromáticos (fenilpropanoides: ácidos cinâmicos, precursores de lignina, ácidos hidroxibenzóicos, catecóis e cumarinas), flavonoides, isoflavonoides, taninos e dihidroxifenóis (BENNETT e WALLSGROVE, 1994).

As substâncias fenólicas são de considerável importância fisiológica e morfológica nas plantas, já que estas substâncias desempenham um papel importante no crescimento e na reprodução, proporcionando proteção contra patógenos e predadores. A atividade antioxidante das substâncias fenólicas é bastante conhecida devida à sua capacidade de eliminar os radicais livres neutralizando-os ao mesmo tempo que se tornam espécies estáveis na forma de radicais (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os flavonoides constituem o maior grupo de substâncias fenólicas produzidas pelas plantas e são constituídos por um esqueleto básico de 15 carbonos organizados em dois anéis (DEWICK, 2002). Podem ser classificados em flavonas, flavonóis, flavononas, flavanóis e antocianidinas (Figura 1). Os flavonoides, além de serem estudados como moléculas antioxidantes, também vem sendo estudados com proteção contra doenças cardiovasculares e certas formas de câncer (CHAHAR *et al.*, 2011; PIETTA, 2000; PETERSON *et al.*, 2012).

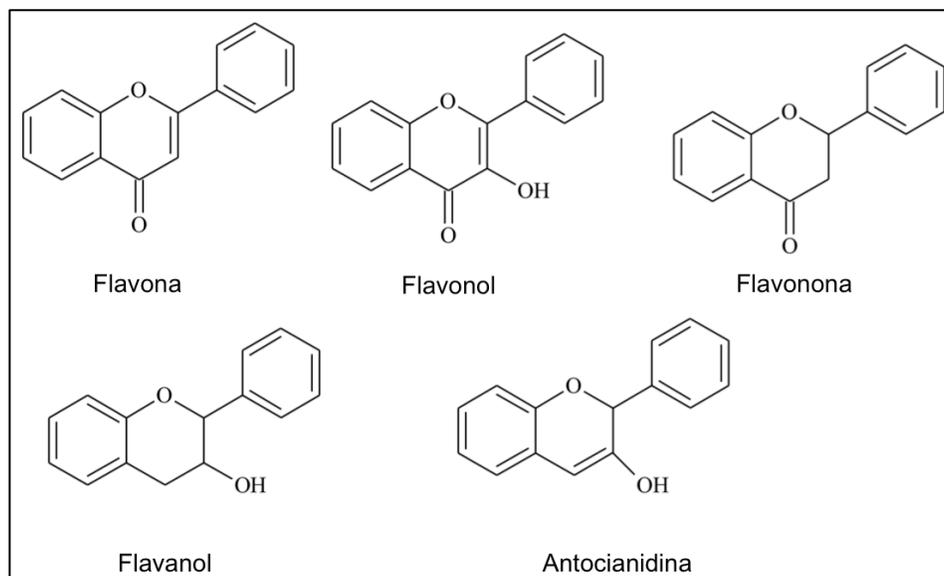


Figura 1. Estruturas gerais principais de classes de flavonoides

2.1.2 Alcaloides

Os alcaloides constituem um grande grupo de metabólitos secundários, com mais de 15.000 moléculas conhecidas e que são encontrados em aproximadamente 20% das plantas superiores (TAIZ e ZEIGER, 2010). São conhecidos por seu mecanismo de proteção contra herbívoros e alguns parasitas (GRYCOVA, 2007). O termo alcaloide vem da palavra álcali pois geralmente apresentam características básicas, porém também existem em forma neutra e até ácida. São caracterizados por serem substâncias orgânicas cíclicas que contém nitrogênio nas suas estruturas ligadas em anéis (KLEIN-JÚNIOR e HENRIQUES, 2017).

A maioria dos alcaloides são sintetizados a partir de aminoácidos comuns e alguns apresentam algum componente na sua estrutura da rota dos terpenos (TAIZ e ZEIGER, 2010). Podem ser classificados de acordo com a sua origem biossintética. Assim são reconhecidos 4 grupos (WINK e ROBERTS, 1998): 1) Os alcaloides derivados dos aminoácidos ornitina, lisina, histidina, fenilalanina, triptofano, ácido antranílico e ácido nicotínico, 2) alcaloides da purina, 3) terpenos aminados 4) policetídeos alcaloidais .

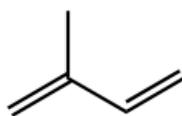
Os alcaloides tem diversas estruturas, distribuição na natureza e importantes

atividades biológicas com fortes efeitos fisiológicos que apresentam oportunidades para a utilização deles na medicina humana (GRYCOVA, 2007). Os alcaloides que apresentam potencial para o tratamento de doenças têm servido também para o desenvolvimento de novas drogas sintéticas a partir do produto natural, com diferentes ou mais potentes efeitos. Alguns exemplos do uso de alcaloides extraídos de plantas no tratamento de doenças são como analgésicos, anticancerígenos, antitussígenos, antimaláricos, para o tratamento de desinteria, antineoplásticos, antiparkinsonianos, dentre outros (BARREIRO, 1990; BERNARDES *et al.*, 2017).

Dentre o grupo de alcaloides derivados do aminoácido triptofano encontram-se os alcaloides indólicos (LOYOLA-VARGAS *et al.*, 2004). Os alcaloides indólicos são um dos grupos mais extensos, com aproximadamente 4.000 descritos e são atualmente essenciais no tratamento de diversas doenças. Entre os fármacos derivados de alcaloides indólicos encontrados nas plantas e empregados na atualidade, encontram-se a ergotamina usada para tratar a enxaqueca e a vimblastina como anticancerígeno, devido a isso possuem grande importância econômica, pois geram vendas bilionárias a cada ano (SCHRIPSEMA e DAGNINO, 2017). Esse grupo de alcaloides é amplamente distribuído em tecidos de plantas das famílias Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae e Nyssaceae (HAMID; RAMLI; YUSOFF, 2017).

2.1.3 Terpenos

Os terpenos, também chamados terpenoides, constituem a maior classe de metabólitos secundários e são sintetizados a partir da acetil-CoA (rota do ácido mevalônico) ou de seus intermediários glicolíticos (metileritritol fosfato (MEP)) (TAIZ e ZEIGER, 2010). Os terpenos formam uma família grande e estruturalmente diversificada de produtos naturais derivados de unidades de isopreno C_5 (Figura 2). E são classificadas como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Também existem os monoterpenos irregulares e os iridoides (DEWICK, 2002).



Isopreno (C₅)

Figura 2. Estrutura de isopreno

2.1.3.1 Iridoides

O interesse químico nos iridoides se deve ao papel chave desempenhado pelo iridoide secologanina na biossíntese de alcaloides indol-mono-terpenoides e certos alcaloides isoquinolínicos (GHISALBERTI, 1998). Apesar de sua arquitetura molecular relativamente simples, eles exibem uma notável variedade estrutural, sendo caracterizados pelo alto grau de oxidação (RIOS-GÓMEZ, 2016). O esqueleto do iridano encontrado nos iridoides (Figura 3) é de origem monoterpenoide e contém um anel ciclopentano que geralmente é fundido a um heterociclo de oxigênio de seis membros (BENNETT e WALLSGROVE, 1994).

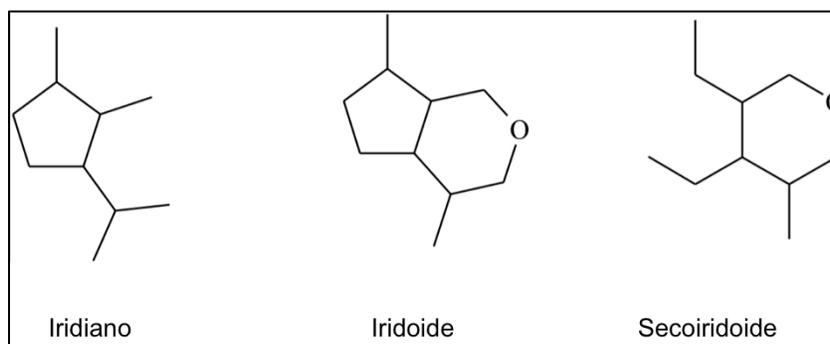


Figura 3. Esqueletos do iridiano, iridoide e secoiridoide

Dentro da grande classe dos iridoides, quatro grupos principais podem ser distinguidos; os iridoides não glicosilados, iridoides glicosilados, iridoides ésteres acetais e os secoiridoides glicosilados.

Um grande número de iridoides são encontrados como glicosídeos, por exemplo a loganina, que é um intermediário chave na biossíntese de muitas outras estruturas de iridoides, e também apresenta o caminho para uma gama de

alcaloides indólicos terpenoides complexos (BENNETT e WALLSGROVE, 1994). Estão presentes em remédios populares usados como tônicos, sedativos, febrífugos, remédios para tosse, remédios para feridas e desordens da pele e como hipotensivos (GHISALBERTI, 1998). Entre suas atividades biológicas mais destacadas estão a neuroprotetora, antioxidante, anticancerígena (antitumoral) e anti-inflamatória, incluindo substâncias que estão sendo estudadas como agentes terapêuticos promissores (TUNDIS *et al.*, 2008; VILJOEN; MNCWANGI; VERMAAK, 2012).

2.2 Cultura de Tecidos Vegetais

Uma variedade de métodos diferentes tem sido desenvolvidos para a obtenção de metabólitos secundários. Uma estratégia comum, é a extração da planta de origem, mas a maioria dessas plantas são selvagens e suas populações podem ser limitadas. Além disso, a lenta taxa de crescimento reduz o potencial de produção da substância requerida, resultando em medicamentos caros (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2016).

A produção de metabólitos secundários por meio de cultivo de plantas em campo tem muitas desvantagens como os baixos rendimentos, flutuação nas concentrações devido às variações geográficas e sazonais, além do próprio meio ambiente (MURTHY; LEE; PAEK, 2014). Outro ponto importante a destacar, é que a síntese química dessas moléculas muitas vezes não é economicamente viável devido às suas estruturas complexas (DAVEY, 2017). Para tentar suprir a demanda atual por metabólitos secundários com atividades medicinais há o interesse pela utilização de tecnologias de cultura de tecidos de plantas (FUMAGALI *et al.*, 2008) com o objetivo de obter produção contínua, sob condições monitoradas, e maiores quantidades de metabólitos (FRANÇA, 2017).

As células vegetais têm a característica de serem totipotentes, pois cada célula vegetal na cultura mantém informação genética completa e, portanto, é capaz de produzir uma gama de produtos químicos encontrados na planta mãe. A tecnologia da cultura de tecidos de plantas vem sendo estudada como uma técnica alternativa segura para a produção e acumulação de metabólitos

secundários, proporcionando vários benefícios além do fornecimento contínuo e confiável dessas moléculas independentemente das variações sazonais, em condições controladas, tendo assim produtos de qualidade uniforme e maior rendimento (ANJUSHA e GANGAPRASAD, 2017; RAMACHANDRA RAO e RAVISHANKAR, 2002; SIMÕES *et al.*, 2009).

A cultura de tecidos vegetais utiliza a cultura de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas *in vitro* que proporcionam à cultura um ambiente propício para seu crescimento e multiplicação. Essas condições incluem o fornecimento adequado de nutrientes, pH do meio, temperatura adequada e bom ambiente gasoso-líquido (HUSSAIN *et al.*, 2012; THORPE, 2012). Vários tipos de culturas de tecidos vegetais *in vitro* vêm sendo usadas para a produção de metabólitos secundários, como cultura de células em suspensão, calos, cultura de órgãos como raízes e brotos e em maior escala usando biorreatores (Figura 4) (BOURGAUD, 2001).

O estabelecimento de culturas de tecidos *in vitro* consiste em uma série de etapas gerais a seguir, que podem variar dependendo do objetivo da cultura:

1. Seleção do explante

Qualquer parte separada de uma planta destinada ao uso *in vitro* denomina-se explante (BARRUETO CID e TEIXEIRA, 2014) e sua seleção depende de fatores como: a idade do tecido (dentre eles o mais novo terá melhor resposta ao estabelecimento *in vitro*), a época do ano, o tamanho do explante, qualidade da planta (isto quer dizer que se devem usar explantes de plantas saudáveis livres de doenças), estresse nutricional ou de água. O explante pode ser obtido de qualquer parte da planta, porém, pode variar dependendo do tipo de resposta esperada, por exemplo, para a indução de calos, geralmente são usados pedaços do cotilédono, hipocótilo, caule, folha ou embrião. Excelentes explantes para a indução de calos são os tecidos de plântulas a partir de sementes germinadas assepticamente (SMITH, 2013).

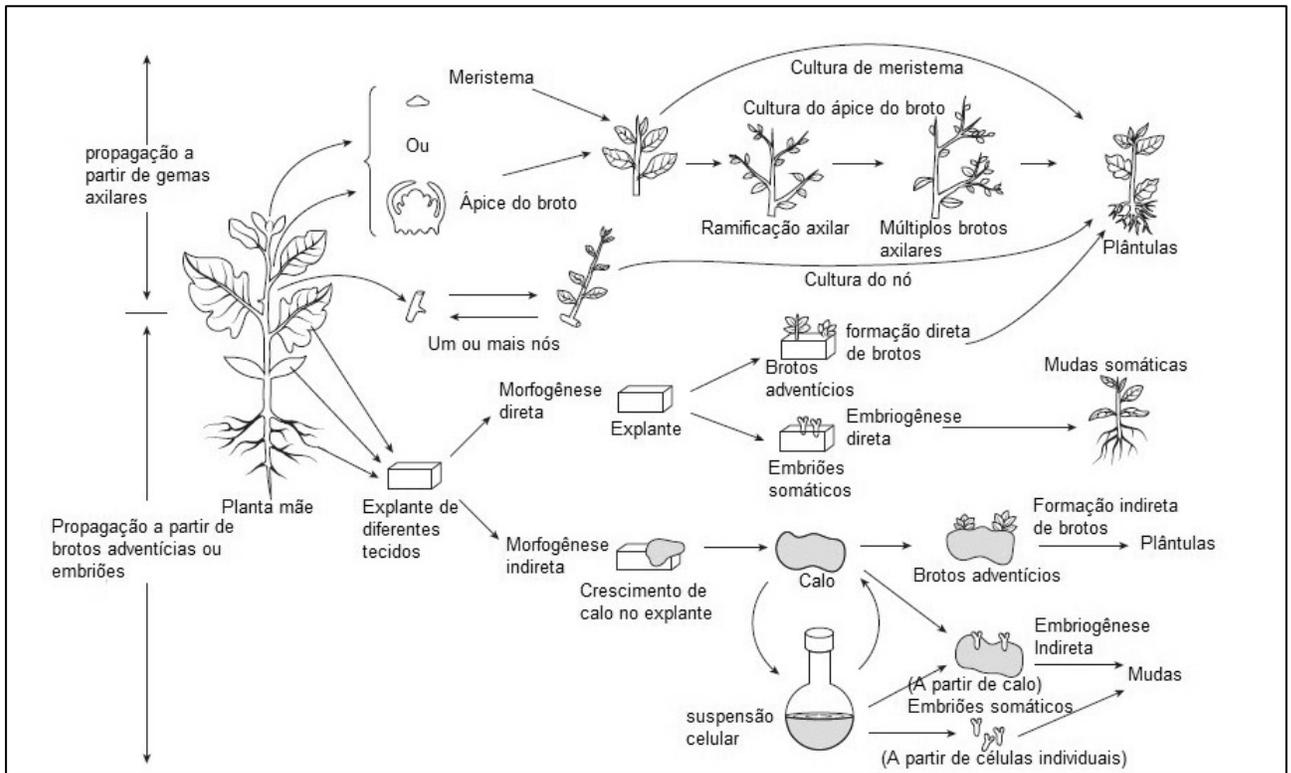


Figura 4. Esquema dos diferentes explantes e culturas que se podem estabelecer com a técnica de cultura de tecidos (GROUT, 2017)

2. Desinfestação do explante

O explante é muitas vezes a principal fonte de contaminantes pois existem microrganismos na superfície, em pequenas fendas e entre as camadas externas delas. Para remover os contaminantes da superfície e aumentar o contato do desinfetante se faz uma pre-desinfestação com sabão e água (SMITH, 2013). Na desinfestação, os desinfetantes mais usados são o hipoclorito de sódio, o hipoclorito de cálcio e o etanol (70%), dentre outros (HUSSAIN *et al.*, 2012). Os tempos de exposição e concentrações dos desinfetantes tem que ser testados em cada experimento, porém sempre será desejável a solução menos concentrada para obter explantes limpos no menor intervalo de tempo, isto trará menor quantidade de danificação ao explante (SMITH, 2013). A concentração e os tempos de exposição dependem do tipo de explante, alguns podem requerer períodos mais prolongados e concentrações mais altas que outros (BARRUETO CID, 2005).

3. Multiplicação e crescimento

O objetivo desta fase é aumentar o número de propágulos, órgãos ou tecidos (biomassa) que podem dar origem a novas plantas, multiplicando-os por meio de subculturas repetidas até o número desejado de plantas a ser atingido. Os Reguladores de Crescimento de Plantas (PGRs) ou hormônios desempenham um papel essencial na determinação da via das células e tecidos das plantas no meio de cultura. O tipo e concentração de hormônios utilizados depende das espécies das plantas, do tecido ou órgão cultivado e do objetivo do experimento (HUSSAIN *et al.*, 2012). Na tabela 1 se apresentam os principais efeitos que tem os PGRs sobre as plantas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992).

Tabela 1. Principais efeitos dos reguladores de crescimento das plantas (PGRs) e exemplos de utilização.

PGR	Efeito	Exemplos
Auxinas	Dominância apical, indução de raízes adventícias em estacas, indução de nódulos a partir de calos. Em altas concentrações os calos formam raízes	Ácido indol-acético (AIA), Ácido diclorofenoxiacético (2,4,D), Ácido naftaleno acético (ANA)
Citocininas	Divisão celular, promoção da formação de caule, crescimento de gemas laterais, na presença de auxinas (em concentrações aproximadamente iguais) os calos continuam a produzir células meristemáticas. Em altas concentrações formam gemas	6-Benzilamiopurina (BAP), Zeatina, Cinetina (KIN), Tidiazurona (TDZ),
Giberelinas	Alongamento do caule, promove a indução da germinação em sementes	Ácido giberélico (AG ₃)

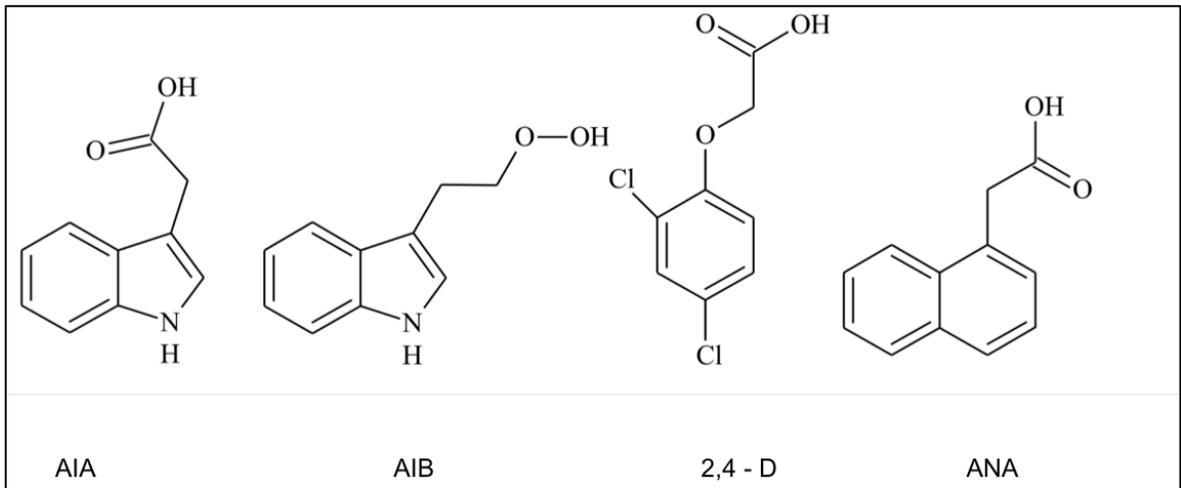


Figura 5. Estruturas químicas de algumas auxinas usadas na cultura de tecidos.

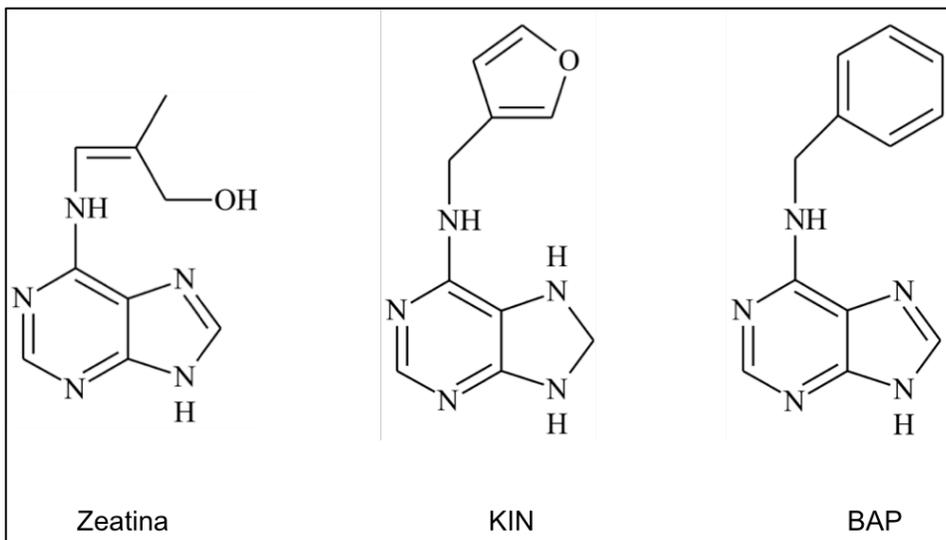


Figura 6. Estruturas químicas de algumas citocininas usadas na cultura de tecidos

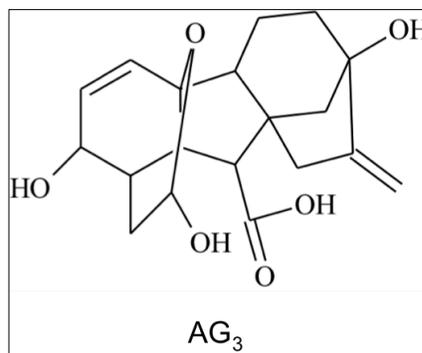


Figura 7. Estrutura química do Ácido Giberélico (Giberelina)

4. Enraizamento

O estágio de enraizamento pode ocorrer simultaneamente no mesmo meio de cultura utilizado para a multiplicação dos explantes. No entanto, as vezes, é necessário mudar o meio, incluindo a modificação nutricional e a composição do regulador de crescimento para induzi-lo (HUSSAIN *et al.*, 2012).

5. Aclimatação

Neste estágio, as plantas *in vitro* são transferidas do ágar gradualmente para areia ou terra enriquecida em viveiro, mudando as condições de alta a baixa umidade (regulando o ar) e de baixa para alta intensidade de luz (HUSSAIN *et al.*, 2012; SMITH, 2013).

2.2.1 Calogênese

Quando um explante é cortado para se colocar na cultura *in vitro*, é produzida uma ferida nele. Isto pode desenvolver uma resposta ao estresse da ferida na parte do tecido lesionado onde começa a formar um pequeno agrupamento de células recém divididas na superfície do explante. Este pode continuar a se dividir conjuntamente com a aplicação diferencial de reguladores de crescimento e condições controladas no meio de cultura para produzir uma massa de células chamada calo. Essas células podem ter diferentes graus de indiferenciação (AHMAD *et al.*, 2013; GROUT, 2017) e contém misturas de células que não são de pigmentação, metabolismo ou tamanho uniforme. Essas células geralmente são friáveis, grandes, vacuoladas e são altamente desorganizadas (SMITH, 2013).

Os calos de diferentes espécies de plantas são diferentes em estrutura e hábitos de crescimento: podem ser brancos ou coloridos (verde, amarelo, avermelhado), moles (aquoso), friáveis ou compactos (CHAWLA, 2009). Outros calos que apresentam alguns graus de regeneração de órgãos, podem ser embrionários, com raízes ou com brotos (Figura 8) (IKEUCHI; SUGIMOTO;

IWASE, 2013). O balanço entre os reguladores de crescimento auxinas e citocininas, é o que determina o estado de diferenciação e desdiferenciação dos calos (SKOOG e MILLER, 1957).

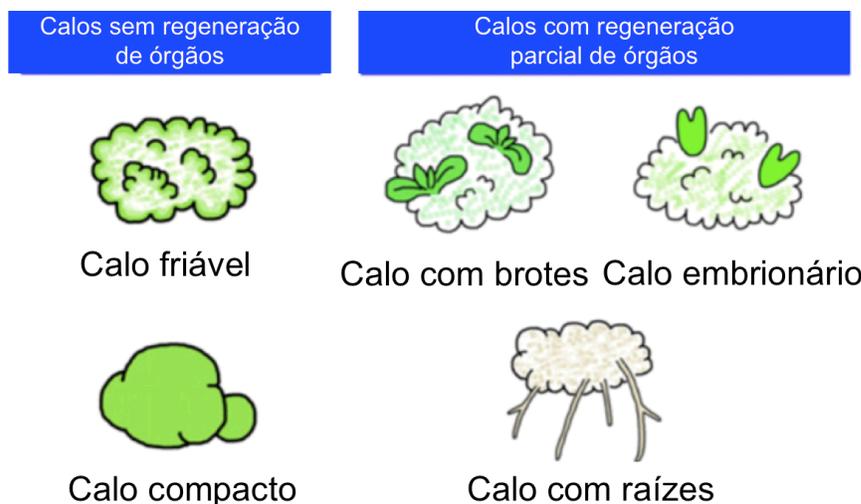


Figura 8. Tipos de calos que podem ser formados na Calogênese (IKEUCHI *et al.*, 2013).

Existem regiões de células no calo que podem reverter sua condição diferenciada para uma condição indiferenciada com a formação de meristemas ou gemas para depois voltar a se diferenciar (re-diferenciação) e assim regenerar órgãos (organogênese) como embriões somáticos, raízes e brotos por meio de organização celular, sendo considerado organogênese indireta porque possui um estágio intermediário de calo. A organogênese direta é a formação de regiões meristemáticas diretamente de uma célula do explante sem passar pelo estágio de calo, assim brotos, embriões somáticos, raízes, anteras e flores podem surgir diretamente do explante (LITZ e JARRET, 1991; SMITH, 2013). As culturas de calos podem ser utilizadas para diferentes estudos, como o isolamento de protoplastos, seleção celular, embriogênese somática, organogênese e produção de metabólitos secundários (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992).

2.2.2 Suspensões Celulares

O calo friável é o melhor inóculo para iniciar uma suspensão, já que tem um alto ritmo de divisão celular e é fácil de separar, permitindo culturas mais homogêneas (CHAWLA, 2009). Este é transferido para meio líquido e colocado em agitação (80-150 rpm) numa temperatura média de 25 °C, resultando em uma suspensão de células individuais e pequenos agregados (SZABADOS; MROGINSKI; ROCA, 1991). As culturas resultantes normalmente têm uma capacidade de expansão significativa para o seu crescimento em biorreatores, nos quais é possível maximizar a produção da biomassa e metabólitos de interesse (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2016). As suspensões de células de plantas podem fornecer sistemas competitivos de produção de metabólitos em comparação com a extração de plantas inteiras (DICOSMO e MISAWA, 1995). Além do uso na produção de metabólitos em larga escala, as suspensões celulares oferecem vantagens como: maior rendimento das substâncias bioativas, diminuição de custos, produção e aumento da escala mais fácil, incremento na absorção de nutrientes, processos mais curtos e contínuos, melhor manipulação da cultura na inoculação ou coleta, regulações constantes nos diferentes estágios de operação, dentre outras (AHMAD *et al.*, 2013).

2.3 Cinética de crescimento de células vegetais

Apesar das suas vantagens, a produção de metabólitos secundários via cultura de células vegetais ainda é limitada devido a suas células tenderem a crescer construindo agregados desorganizados, o que prolonga o tempo de fermentação e custos de produção. Uma alternativa para reduzir esses problemas, é obter condições ótimas das culturas, usando modelos matemáticos para simular e prever o comportamento da cultura sob diferentes condições de operação, sem necessidade de fazer muitos experimentos (VILLEGAS, 2017).

O crescimento das células vegetais compreende várias fases, as quais exibem um crescimento em padrão sigmoide (forma de S) (Figura 9) (CHAWLA,

2009):

1. Fase de atraso (*lag*): é observada quando suspensões que estão na fase estacionária são subcultivadas num meio fresco. As culturas crescem lentamente durante 1 a 3 dias. Porém, se as suspensões subcultivadas estão na fase de crescimento, a fase de atraso não se apresenta.
2. Fase exponencial ou logarítmica (*log*): nesta fase a taxa específica de crescimento (biomassa por unidade de concentração da mesma) é constante. O uso de baixas densidades celulares na iniciação da cultura podem prolongar esta fase.
3. Fase linear: nesta fase a taxa específica de crescimento declina uniformemente no tempo.
4. Fase de desaceleração progressiva: ocorre pela declinação da taxa específica de crescimento da fase anterior.
5. Fase estacionária: esta é a última etapa na qual não há aumento na síntese de biomassa ou no número de células.

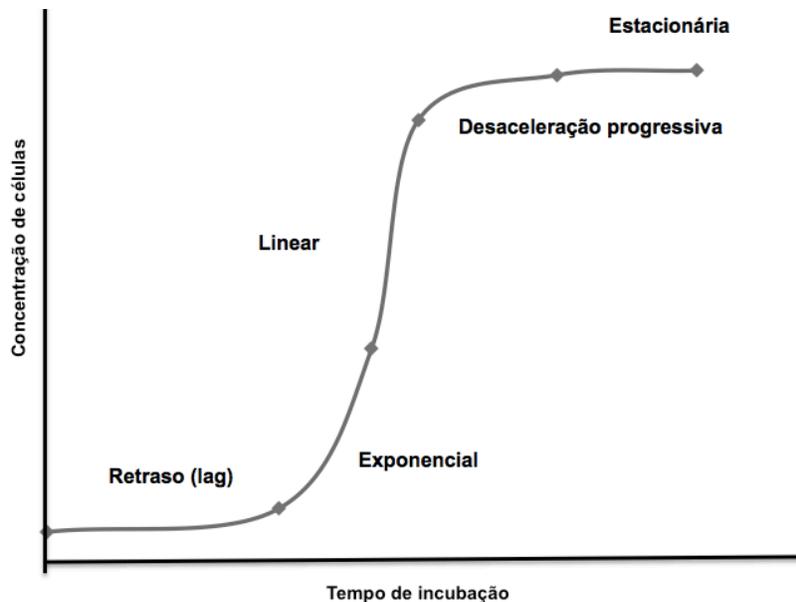


Figura 9. Curva de crescimento típica de células vegetais, na qual se relaciona a concentração de células nas diferentes fases com o tempo de incubação.

O crescimento celular em um sistema de batelada é limitado à disponibilidade de nutrientes essenciais e/ou ao acúmulo de produtos tóxicos.

Essa interação pode ser avaliada para construir um perfil de crescimento celular que pode então ser subdividido nas fases *lag*, exponencial, linear, estacionária e de morte. Uma melhor compreensão dessas dinâmicas, bem como a determinação de importantes valores de parâmetros cinéticos, facilitará a otimização dos bioprocessos. Esses parâmetros cinéticos derivados dos dados experimentais podem então ser ajustados a modelos matemáticos, como as equações de Gompertz, Logística e de Monod (OMAR *et al*, 2006):

Equação de Gompertz:

$$\text{Log} \left(\frac{X}{X_0} \right) = X_{max} \exp \left[1 - \exp \left(\frac{\mu_{max}}{X_{max}(\lambda - t)} \right) \right]$$

a qual também pode se simplificar como:

$$Y = a * \exp[1 - \exp(b - c * t)]$$

onde:

X= massa das células (g)

X₀=massa inicial de células (g)

X_{max}= massa máxima de células (g)

$\mu_{max} = a * c =$ velocidade máxima de crescimento específico(d⁻¹)

$\lambda = (b - 1)/c =$ tempo de fase *lag* (d)

t = tempo de cultura (d)

a= concentração máxima de células (g/L)

$b=(\mu_{max}e\lambda/a) + 1$

$c=\mu_{max}e/a$

e= exp(1)

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} = \text{Tempo de geração}$$

2.4 Elicitação

A produção de metabólitos secundários de plantas pela técnica de cultura de tecidos vegetais ainda enfrenta muitas limitações biotecnológicas, como o baixo rendimento dos metabólitos secundários das plantas nas culturas vegetais.

Os principais papéis dos metabólitos secundários das plantas são de protegê-las do ataque de insetos, herbívoros e patógenos ou outros estresses e por isso algumas estratégias vem sendo desenvolvidas para melhorar o rendimento desses metabólitos em culturas de tecidos (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005), o que incluem o tratamento com vários elicitores. O termo elicitor refere-se a substâncias químicas de várias fontes, bióticas ou abióticas, bem como a fatores físicos, que podem desencadear uma resposta em organismos vivos, resultando no acúmulo de metabólitos secundários (VASCONSUELO e BOLAND, 2007). Estes podem ser de fontes bióticas e abióticas adicionados diretamente aos meios de cultura ou expondo as culturas a estresses físicos para tentar induzir a expressão de genes específicos em células vegetais para aumentar ou provocar a produção de metabólitos secundários (WANG *et al.*, 2017). Extratos fúngicos, o jasmonato de metila, a quitosana, o acetato de sódio, o beta glucano, os íons metálicos (ferro e cobre, por exemplo), alcalinidade ou salinidade e outros aditivos físicos como alta e baixa temperatura, seca e estresse UV, têm estimulado e aumentado a produtividade de metabólitos em sistemas de cultura de células vegetais (LILA, 2005; RAMAKRISHNA e RAVISHANKAR, 2011). A resposta aos estresses dos elicitores é induzida quando a planta reconhece esse estresse no nível celular (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Os elicitores são reconhecidos pelos receptores de plantas que estão localizados na superfície da membrana plasmática ou endomembrana. Primeiro, os receptores são ativados e, em seguida, ativam seus efetores, como os canais de íons, proteínas de ligação GTP (proteínas G), proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e a explosão oxidativa (WANG

et al., 2017). Uma vez que esses efetores são ativados, promovem a síntese de moléculas de sinalização (por exemplo o ácido salicílico, ácido jasmônico, óxido nítrico, dentre outros) e é iniciada uma rede de transdução de sinal que leva à ativação de fatores de transcrição, que regulam a expressão de genes, onde as enzimas resultantes catalisam a biossíntese dos metabólitos secundários (WANG *et al.*, 2017; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

A eficiência da elicitação depende de vários fatores como o tipo de elicitor, a sua concentração, o estágio do crescimento da cultura e o tempo de exposição (NAMDEO, 2007). Em alguns casos, a combinação de dois ou mais elicitores atuam sinergicamente para a induzir e melhorar a produção dos metabólitos de interesse (ZHAO e VERPOORTE, 2005).

A seguir serão abordados alguns tratamentos de elicitação que foram usados no presente trabalho.

2.4.1 Salinidade e estresse osmótico

A exposição de tecidos de plantas a sais pode afetar muitos processos fisiológicos e metabólicos. Levando à desidratação celular, o que provoca o estresse osmótico e a remoção de água do citoplasma, resultando em redução dos volumes citosólicos e vacuolares. O estresse salino geralmente cria estresse iônico e osmótico nas plantas, resultando em acumulação ou diminuição de metabólitos secundários específicos nas plantas (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Esses estresses são estimulantes na produção de metabólitos secundários, como o alcaloide indólico braquicerina nas folhas da espécie *Psychotria brachyceras* quando tratadas com cloreto de sódio (NaCl), sorbitol e polietilenoglicol (PEG) (NASCIMENTO *et al.*, 2013). Em outra pesquisa a produção dos alcaloides catarantina e ajmalicina nas culturas de células em suspensão de *Catharanthus roseus* foi aumentada em cerca de 4 vezes adicionando alginato de sódio, manitol ou polivinilpirrolidona (PVP), e adicionando os sais NaCl e cloreto de potássio (KCl) (ZHAO *et al.*, 2000). Nas culturas de raízes das plantas *Datura metel* (AJUNGLA *et al.*, 2009) e *Brugmansia candida*

(SPOLLANSKY; PITTA-ALVAREZ; GIULIETTI, 2000). Quando tratadas com cloreto de alumínio (AlCl_3) a produção de hiosciamina e escopolamina foram aumentadas. Os calos da espécie *Rauvolfia serpentina* também acumularam o alcaloide indólico reserpina quando foram tratados com várias concentrações de AlCl_3 , além de promover o aumento da biomassa (ZAFAR *et al.*, 2017).

2.4.2 Moléculas sinalizadoras

Moléculas de sinalização produzidas pelas plantas também têm sido usadas para a obtenção de metabólitos secundários. Essas moléculas são produzidas nas plantas como sinais para disparar processos fisiológicos em todas as etapas do ciclo de vida das plantas (DOMINGOS *et al.*, 2015). Um exemplo dessas moléculas é o óxido nítrico (NO), um gás diatômico indutor de radicais livres e é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) (SCHELER; DURNER; ASTIER, 2013) que serve como molécula de sinalização para o crescimento, desenvolvimento e defesa de plantas, promovendo a resistência frente a doenças (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005). Evidência fornecida de dados da literatura tem mostrado que a resposta de plantas frente a fatores causadores de estresses como a seca, alta ou baixa temperatura, salinidade, exposição a raios UV, metais pesados e estresse oxidativo, é regulada pelo óxido nítrico (ARASIMOWICZ e FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Estudos tem provado que tratar plantas expostas a metais pesados com nitroprussiato de sódio (SNP) como doador do NO promove e aumenta a produção dos alcaloides indólicos vincristina, vimblastina e ajmalicina, além de aliviar a toxicidade dos metais na espécie *C. roseus* (LIU *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2010). Em suspensões celulares da mesma espécie tratadas com SNP, foi observado o aumento de até 3 vezes a produção de ajmalicina, catarantina e alcaloides totais (XU e DONG, 2005).

O ácido abscísico (ABA) um fitohormônio do estresse, também é uma molécula de sinalização que controla o processo adaptativo das plantas a estresses impostos pelos sais, o frio, a seca, ferimentos e ataques de patógenos

(FINKELSTEIN e ROCK, 2002; TUTEJA e SOPORY, 2008). Tem sido reportado também que o ABA desencadeia a sinalização de NO para a produção de alcaloides (CHEN *et al.*, 2013), assim essas moléculas trabalham pelo fenômeno de conversa cruzada (do inglês *cross-talking*), na resposta a estresses em plantas. O mesmo ocorre com o ácido jasmônico (JA) onde o ABA também regula em *cross-talking*, a biossíntese de alcaloides em *Nicotiana tabacum* (LACKMAN *et al.*, 2011). Um estudo com a espécie *Psychotria brachyceras* (Rubiaceae) também provou que o ABA estimula a produção do alcaloide indólico braquicerina nas suas folhas (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

2.4.3 Exposição a raios UV

A exposição das plantas a raios UV causa dano significativo às plantas, provocando um estresse oxidativo, que leva a produção de metabólitos secundários como flavonoides e alcaloides por meio de um processo complexo que inclui mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (GREGIANINI *et al.*, 2007). Estudos de elicitação de metabólitos secundários mediante a exposição de culturas de tecidos de plantas a luz UV-B tem demonstrado efeitos positivos na produção de moléculas como os flavonoides orientina, iso-orientina, vixetina e isovitexina, em calos da espécie *Passiflora quadrangularis* (ANTOIGNONI *et al.*, 2007), os alcaloides nicotina em calos de *Nicotiana tabacum* na exposição a raios UV-A (KARTUSCH; MITTENDORFER, 1990) e braquicerina na espécie *Psychotria brachyceras* quando foram expostos a as radiação UV-B e UV-C (GREGIANINI *et al.*, 2007). Pesquisas desenvolvidas com tecidos (raízes cabeleiras, calos e células em suspensão) da espécie *Catharantus roseus*, fonte de importantes alcaloides com efeitos farmacológicos, também demonstram o aumento da produção de catarantina, ajmalicina, vindolina, vimblastina, vincristina, lochnericina e serpentina quando expostos à radiação UV-B e UV-C (BINDER *et al.*, 2009; MOON *et al.*, 2017; RAMANI e CHELLIAH, 2007).

2.5 Família Rubiaceae

A família Rubiaceae inclui cerca de 13.670 espécies distribuídas em 609 gêneros sendo uma das maiores famílias das dicotiledôneas (THE PLANT LIST, 2019). Ocorrem em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais (RIBEIRO *et al.*, 1999).

As espécies pertencentes à família Rubiaceae são conhecidas por produzir substâncias como terpenos, flavonoides e alcaloides com atividades farmacológicas, antioxidantes, antidiabéticas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antihipertensão, e anticâncer (MARTINS e NUNEZ, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Algumas espécies desta família têm importância econômica como o café (*Coffea arabica*) e o jenipapo (*Genipa americana*), e outras de importância medicinal como a espécie *Cinchona officinale* da qual é extraído o alcaloide quinina que apresenta atividades antipiréticas, antipalúdicas e analgésicas (RIBEIRO *et al.*, 1999).

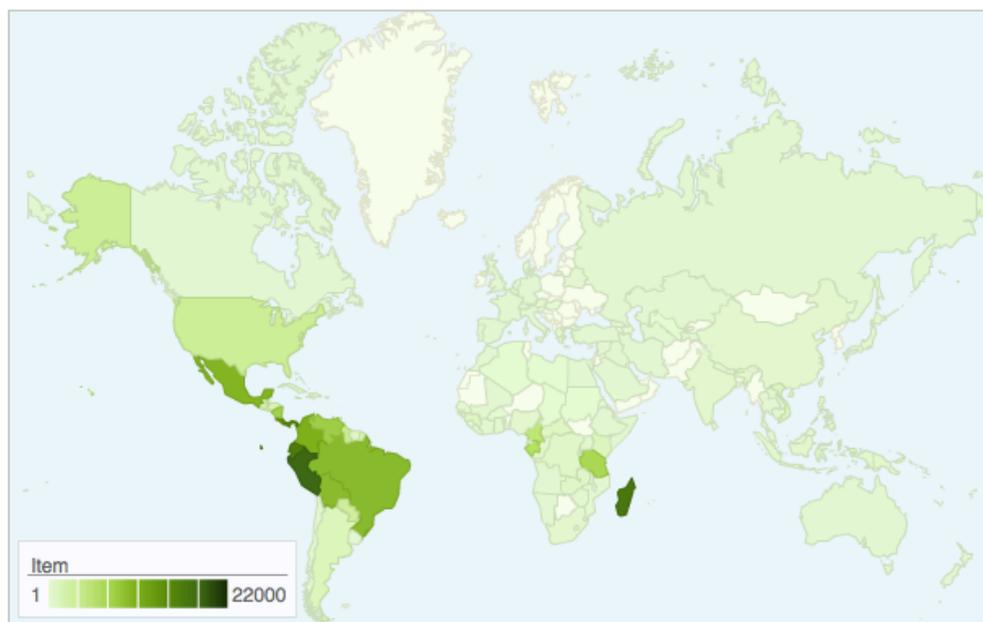


Figura 10. Distribuição das espécies da família Rubiaceae no mundo em número de indivíduos coletados (TROPICOS, 2019).

Na família Rubiaceae existem diversos estudos que utilizam as culturas de tecidos vegetais *in vitro* como células em suspensão, calos, plântulas e raízes para a produção de metabólitos secundários. Em uma revisão bibliográfica que está sendo realizada em conjunto com a MSc Sabrina Schumaker Zanca foi

encontrado que as principais classes químicas de metabólitos estudadas em culturas *in vitro* até agora na família são as antraquinonas (54,6%) e os alcaloides (37,8%), menores estudos com triterpenos (3,4%), flavonoides (2,5%) e iridoides (1,7%). O uso de substâncias elicitoras, a exposição a estresses físicos e a transformação genética (SANADHYA, 2014; YA-UT; CHAREONSAP; SUKRONG, 2011) são utilizadas como técnicas complementares à cultura de tecidos para a otimização da produção das substâncias de interesse. Existem também estudos com o uso de biorreatores (BUSTO *et al.*, 2013) o qual demonstra o potencial de escalamento das culturas de células vegetais para a obtenção de biomassa produtora de metabólitos secundários.

2.5.1 Gênero *Duroia*

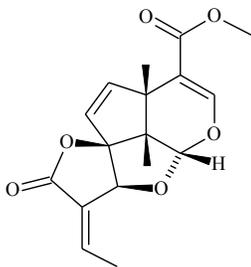
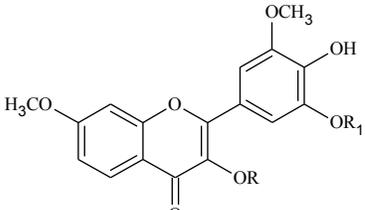
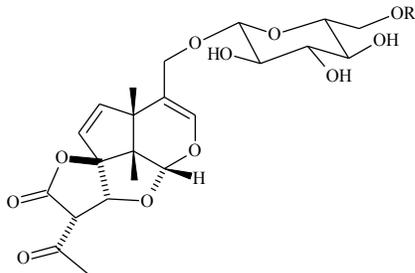
Duroia é um gênero neotropical pertencente à família Rubiaceae com cerca de 34 espécies descritas, distribuídas desde o México até as Guianas e costa Atlântica do Brasil (MENDOZA; RAMÍREZ P; JIMÉNEZ, 2004). No Brasil, as 23 espécies existentes do gênero *Duroia* encontram-se distribuídas nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Bahia, Mato Grosso, Espírito Santo, ocorrendo nas zonas de Campo de Várzea, Floresta Ciliar, Floresta de Igapó, Floresta de Terra Firme, Floresta de Várzea e Floresta Pluvial (ZAPPI, 2015).

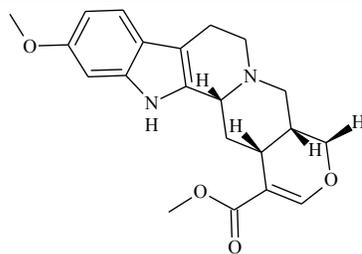
Estudos químicos e biológicos de algumas espécies desse gênero encontraram nos extratos das plantas atividades biológicas interessantes. Por exemplo, a espécie *D. hirusta*, que foi a primeira do gênero a ser estudada, apresentou atividade antibacteriana e atividade antiviral frente a HSV (*Herpes simplex virus*) (10,5 µg/mL) em estudos *in vitro* (LOPEZ; HUDSON; TOWERS, 2001).

Outra espécie que vem sendo pesquisada pelo grupo de pesquisa ao qual este trabalho está inserido é a *D. saccifera*. Os extratos dessa espécie demonstraram ter atividade antimicrobiana (2 mg/mL) frente aos microrganismos *Salmonella enterica*, *Propionibacterium acnes*, *Enterobacter cloacae* (CONTRERAS-MEJÍA, 2017) e *Candida glabrata* (0,25 mg/mL) (REIS *et al.*, 2016).

Algumas substâncias que já foram isoladas até o momento do gênero *Duroia* se encontram nas classes químicas dos alcaloides, flavonoides, iridoide, triterpenos e esteroides (Tabela 2).

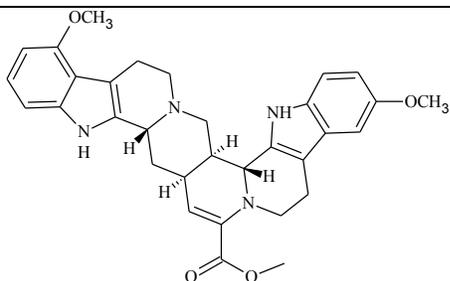
Tabela 2. Substâncias isoladas das espécies do gênero *Duroia*

Espécie	Substância	Classe química								
	Page; Madrinan; Towers (1994)	Iridoide								
										
	(5)Plumericina									
	Aquino <i>et al.</i> (1999)	Flavonoide								
<i>Duroia hirsuta</i>										
	<table border="0"> <tr> <td>R</td> <td>R₁</td> </tr> <tr> <td>1 CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>2 CH₃</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>3 H</td> <td>CH₃</td> </tr> </table>	R	R₁	1 CH ₃	CH ₃	2 CH ₃	H	3 H	CH ₃	
R	R₁									
1 CH ₃	CH ₃									
2 CH ₃	H									
3 H	CH ₃									
	(1) 3,7,3',5'-tetramethoxy-4'-hydroxyflavone									
	(2) 3,7,3'-trimethoxy-4',5'-dihydroxyflavone									
	(3) 7,3',5'- trimethoxy-3,4'-dihydroxyflavone									
		Iridoide								
	(4) Duroina									
	Nunez <i>et al.</i> (2009)	Alcaloide								
<i>Duroia macrophylla</i>		indólico								



(6) Raunitidina

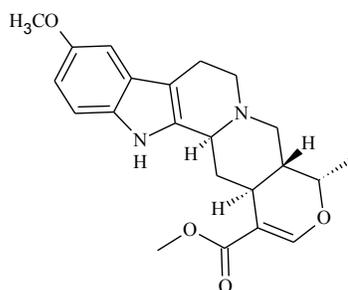
Nunez e Vasconcellos (2012)



(7) Alcaloide indólico (sem nome)

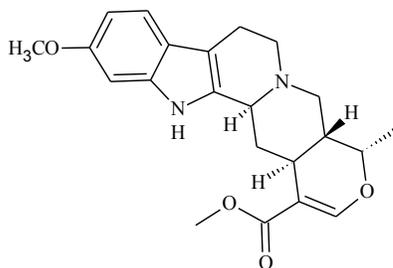
Alcaloide
indólico

Martins (2014)

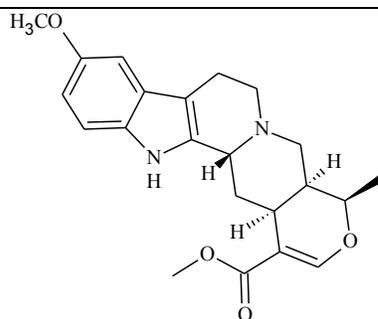


(8) 10-metoxi-ajmalicina

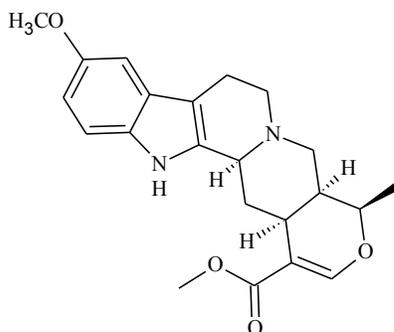
Alcaloides
indólicos



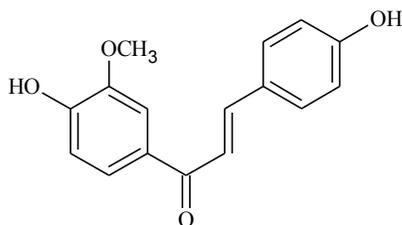
(9) 11-metoxi-ajmalicina



(14) 10-metoxi-3-isoraunicina

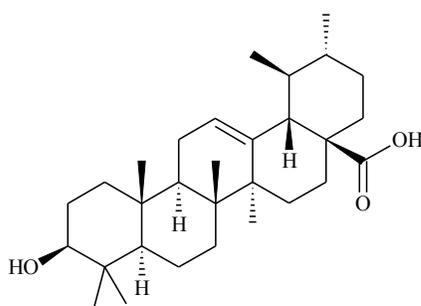


(15) 10-metoxi-raunicina



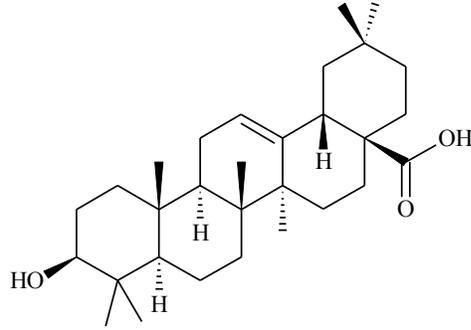
(16) 4,4'-dihidroxi-3'-metoxi-chalcona

Chalcona

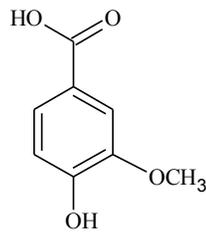


(17) Ácido ursólico

Triterpenos



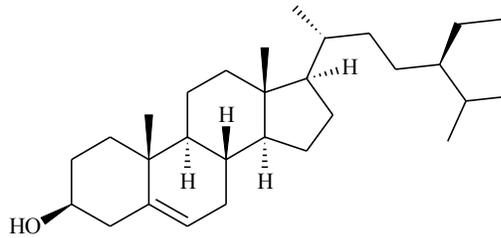
(18) *Ácido oleanólico*



Fenilpropanoide

(19) *Ácido m-metoxi-p-hidroxi-benzoico*

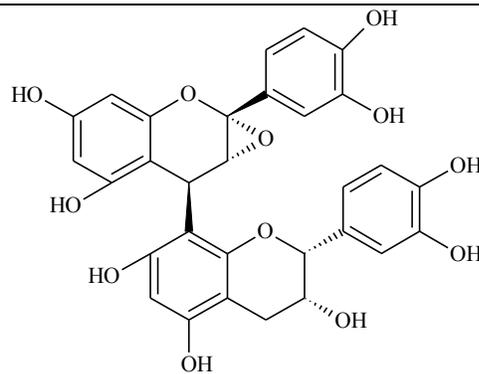
Tanata,2017



Esteroide

(20) *Sitosterol*

Cruz; Araujo; Nunez (2019)



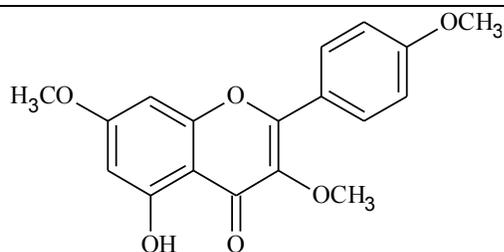
Duroia longiflora

Flavonoide

(21) *2α,3α-epoxy-5,7,3',4'- tetrahydroxyflavan-(4β-8)-epicatequina*

Duroia saccifera

Contreras-Mejía (2017)



Flavonoide

(22) 5-hidroxi-3,4',7- trimetoxiflavona

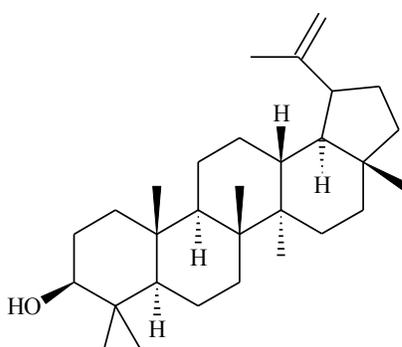
Andrade e Nunez (2018)

(22) 5-hidroxi-3,4',7- trimetoxiflavona

Flavonoide

(20) Sitosterol

Esteróide



Triterpeno

(23) Lupeol

Existem poucos trabalhos desenvolvidos com o gênero na área de cultura de tecidos vegetais. Com *D. saccifera*, Souza (2016) estabeleceu plântulas *in vitro* da espécie a partir da germinação de sementes e estabeleceu um protocolo de indução de calos friáveis a partir das folhas de plântulas germinadas. Os extratos desses calos tiveram indícios da presença de terpenos e esteróides além de apresentarem atividade antiofídica (proporção 1:10 veneno/ extrato) significativa na inibição da fosfolipase A2 do veneno de *Bothrops atrox*.

Brilhante (2018) realizou o estudo fitoquímico dos calos de *D. saccifera* e identificou a presença de terpenóides, esteróides, substâncias aromáticas e ácidos graxos. O extrato AcOEt desses calos apresentou alta atividade antimicrobiana ($\leq 25 \mu\text{g/mL}$) frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Nesse mesmo trabalho foi estabelecido um sistema de cultura de células em suspensão que demonstrou um elevado potencial para o fornecimento de biomassa vegetal da

espécie.

Até o momento não foi isolada nenhuma substância proveniente da cultura de tecidos de espécies do gênero *Duroia*, contudo às atividades biológicas encontradas nos seus extratos demonstram o interesse no estabelecimento de culturas de tecidos *in vitro* desse gênero.

2.5.2 *Duroia macrophylla* Huber

Duroia macrophylla Huber é uma espécie arbórea amazônica da família Rubiaceae e é conhecida comumente pelo nome de puruí-grande (Figura 11). Ocorre nas Guianas e no Brasil, onde é distribuída nos estados do Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Mato Grosso, em Florestas de Igapó e Floresta de Várzea (ZAPPI, 2015). As características principais da espécie incluem, árvores de 15 a 20 m altura, folhas ternadas, longamente pecioladas; lâmina ovada a lanceolada com ápice acuminado e base obtusa. Inflorescências estaminadas umbeladas, multifloras. Sementes orbiculares, comprimidas, pubescentes. Floresce em novembro e dezembro e frutifica de janeiro a junho (TAYLOR; CAMPOS; ZAPPI, 2007).



Figura 11. *Duroia macrophylla* Huber A) Individuo adulto B) Fruto C) Flor Fotos: A e B) López-Vázquez, A. C) Ribeiro *et al.*, 1999.

A espécie *D. macrophylla* vem sendo pesquisada como fonte de importantes substâncias bioativas em diferentes extratos: fenóis nos extratos metanólicos das folhas e galhos com atividade antioxidante (10 µg/mL) e terpenos nos extratos metanólicos e diclorometânicos (DCM) com atividade inseticida (10 mg/mL) (MARTINS *et al.*, 2014). Extratos com atividade bacteriostática (250 µg/mL), sobre as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium corumnare*, *Salmonella enteridis* e *Pseudomonas aeruginosa* (MARTINS, 2014).

Dois triterpenos do extrato DCM das folhas (ácido oleanólico e ácido ursólico) (MARTINS *et al.*, 2013) e cinco alcaloides indólicos monoterpênicos (25 – 100 µg/mL) (O-metoxi-ajmalicina, a mistura de 9-metoxi-3-isoajmalicina com 9-metoxi-19-*epi*-3-isoajmalicina, 10-metoxi-3-isorauniticina e 10-metoxi-19-*epi*-3-isoajmalicina) apresentaram atividade frente a *Mycobacterium tuberculosis* (MARTINS, 2014).

A atividade mais interessante encontrada até agora nos extratos de *D. macrophylla* é dos alcaloides indólicos que apresentaram maior potencial citotóxico (2,28 – 7,28 µg/mL) sobre linhagens de células tumorais (destacando-se a atividade frente a linhagem de células de leucemia humana (2,29 µg/mL)) e menor sobre células normais (NUNEZ; VASCONCELLOS, 2012; NUNEZ *et al.*, 2014). Esses alcaloides são encontrados na planta durante todo o ano, porém há uma variação sazonal na composição química nas folhas da planta, onde o teor de alcaloides indólicos é maior na época mais chuvosa (meses de fevereiro e março) (ZANCA, 2015).

Na área de cultura de tecidos, foi desenvolvido um protocolo de desinfestação das folhas de *D. macrophylla* para o estabelecimento *in vitro* da espécie (ZANCA, 2015). A partir dessas folhas, foi induzida a formação de calo testando unicamente a concentração de 4 mg. L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg. L⁻¹ de KIN no meio de cultura e foram obtidos calos multiformes majormente compactos e clorofilados (Figura 12). Foi realizado também um estudo fitoquímico desses calos nos quais nos extratos hexânicos e metanólicos foi observada a presença de triterpenos, porém não foram encontrados alcaloides (TANANTA, 2017).

Embora no estudo fitoquímico dos calos não tenha sido encontrada a presença de alcaloides, Coelho (2019) realizou uma análise proteômica das folhas, dos galhos e dos calos obtidos por Zanca (2015) de *D. macrophylla*, onde foram identificadas 364 proteínas de defesa e resposta ao estresse e 51 do metabolismo secundário nos três tecidos estudados (Figura 13). No caso dos calos foram identificadas 7 proteínas pertencentes à rota biossintética dos alcaloides, 9 à rota dos flavonoides e 6 à rota dos terpenos.

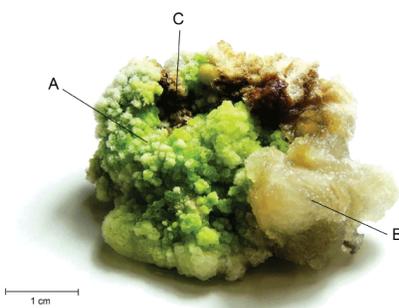


Figura 12. Calo de *D. macrophylla* cultivado no meio MS acrescido com 4 2,4-D + 2 KIN mg. L⁻¹. A) Calo compacto e clorofilado B) Calo friável C) Calo oxidado (ZANCA, 2015).

Dentre as proteínas envolvidas na produção de alcaloides, foi identificada em calos a deacetoxivindolina hidroxilase, uma enzima catalizadora para a produção de vindolina e vincristina, pertencente à via biossintética dos alcaloides indólicos. Desta forma confirmando que os calos de *D. macrophylla* possuem a capacidade de sintetizar os alcaloides de interesse farmacêutico.

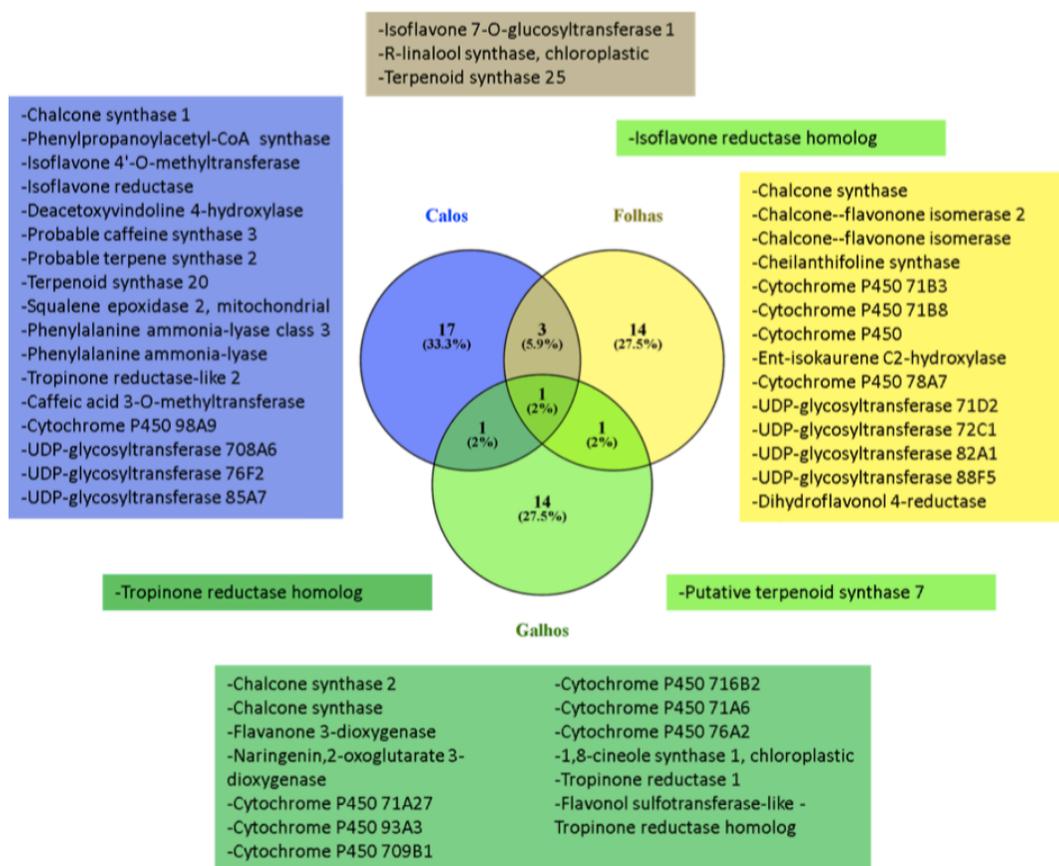


Figura 13. Proteínas envolvidas na síntese do metabolismo secundário de calos, folhas e galhos de *D. macrophylla* (COELHO, 2019).

2.6 Quimiometria

Várias técnicas analíticas para a caracterização de metabólitos de plantas vêm sendo utilizadas nas últimas décadas, a seleção da técnica mais adequada pode depender da sua velocidade, seletividade e sensibilidade. A Ressonância Magnética Nuclear é considerada uma das mais utilizadas por ser rápida e seletiva (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Algumas vantagens que a RMN apresenta é que a escala dos deslocamentos químicos é constante e os espectros são fáceis e rápidos de adquirir, fazendo o método relativamente reproduzível (BRERETON, 2007). É uma técnica de análise química de amplo espectro e estável no tempo (CHOI *et al.*, 2004). Para espectros de substâncias de interesse é possível realizar

mais experimentos como o sequenciamento de pulsos para provar a estrutura da substância em uma mistura. Algumas regiões do espectro de RMN também podem conter ressonâncias de classes de metabólitos específicos, as quais podem prover informações gerais como o tipo de componentes em uma amostra (BRERETON, 2007).

Em conjunto com a RMN, técnicas multivariadas ou de reconhecimento de padrões são utilizadas para analisar conjuntos de dados complexos (WANG; HARRINGTON; BAUGH, 2017). A análise multivariada usada no tratamento de dados químicos, é chamada de *Quimiometria* (SENA *et al.*, 2000). A seguir são apresentados algumas das análises multivariadas mais utilizadas na quimiometria:

2.6.1 *Análise de componentes principais (PCA)*

O PCA (do inglês *Principal Component Anaysis*) é um dos métodos multivariáveis que permite explorar os padrões dos dados e é provavelmente o mais usado em análises quimiométricas, já que é capaz de separar em grupos as amostras que são semelhantes (BRERETON, 2007). A PCA é um método exploratório pois ajuda na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados (SENA *et al.*, 2000).

Na PCA o espectro de RMN pode ser representado como uma matriz onde o delineamento dos dados pode ser descrito como uma soma de respostas para cada sinal, os quais são caracterizados por 1) um deslocamento químico e 2) a intensidade do sinal. Em termos de matriz isto pode ser escrito como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{C} * \mathbf{S} + \mathbf{E}$$

Onde \mathbf{X} é a matriz original da RMN, \mathbf{C} é o deslocamento químico do sinal, \mathbf{S} é a intensidade do sinal e \mathbf{E} é a matriz do erro (BRERETON, 2007).

2.6.2 *Funções de associação fuzzy (fuzzy c-means)*

Muitas vezes, quando amostras são analisadas por PCA, algumas delas apresentam um grande afastamento das demais, esses dados são chamados de *outliers* (dados atípicos). Às vezes a existência de um *outlier* não implica um erro,

mas apenas uma amostra que não deve fazer parte de um conjunto. Existem várias maneiras de superar esse problema, sendo o mais simples remover o *outlier*. Também pode ser usado um método bem conhecido que envolve o uso de funções de associação *fuzzy* (difusas) que agrupa os dados em subconjuntos (*clusters*) (BRERETON, 2007). Identificar padrões naturais em dados é um dos objetivos mais importantes da quimiometria. Especificamente, as técnicas de agrupamento são quase indispensáveis como uma ferramenta para a análise de dados (ALAMEIDA *et al.*, 2007).

Em geral, uma análise de *cluster* refere-se a um amplo espectro de métodos que tentam subdividir um conjunto de dados X em c *clusters*. A chave dessas análises é representar a similaridade que um ponto compartilha com cada *cluster* com uma função (denominada função de associação) cujos valores (chamados de associações) são 0 e 1. Cada amostra terá uma associação em cada *cluster*, associações próximas a 1 significam um alto grau de similaridade entre a amostra e um *cluster*, enquanto associações próximas a 0 implicam pouca similaridade entre a amostra e esse *cluster*. O efeito final de tal função para o agrupamento em *clusters* é produzir partições *c-fuzzy* de um determinado conjunto de dados. Além disso, a soma dos membros de cada ponto de amostragem deve ser unitária (BEZDEK, EHRLICH e FULL, 1984).

2.6.3 Análise hierárquica de cluster (HCA)

Outro método muito usado no agrupamento de dados é a análise hierárquica de *cluster* HCA (do inglês *Hierarchical cluster analysis*) é um método que agrupa amostras em um conjunto de dados por sua similaridade, calculando a distância entre elas (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Esse método analisa o conjunto de dados de uma maneira iterativa o qual gera divisão de *clusters* em vários níveis, criando uma relação hierárquica mãe-filho que pode ser observada em um dendrograma (Figura 14) (DOWNS e BARNARD, 2002)

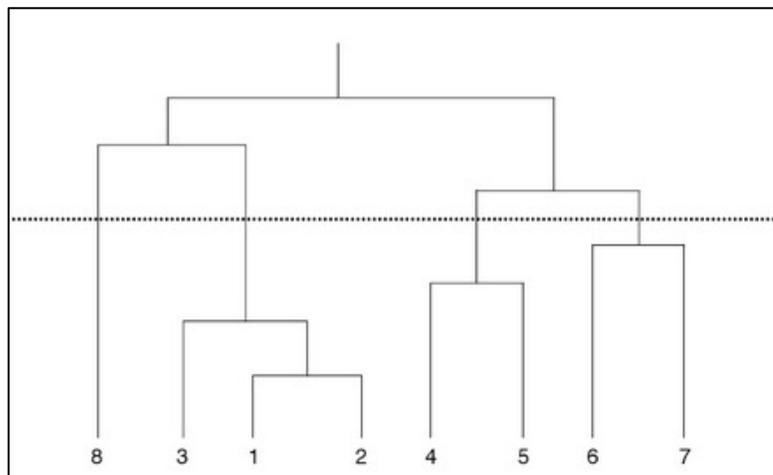


Figura 14. Exemplo de um dendrograma gerado do agrupamento de 8 itens (DOWNS e BARNARD, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de elicitores físicos e químicos no perfil químico dos calos da planta *Duroia macrophylla* Huber.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes tratamentos de desinfestação nas sementes de *D. macrophylla*;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico na germinação de sementes de *D. macrophylla*;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de auxinas e citocininas na indução de calo friável a partir de folhas de plântulas de *D. macrophylla*
- Descrever a anatomia dos calos de *D. macrophylla*;
- Descrever a cinética de crescimento de calos e células em suspensão de *D. macrophylla*;
- Fracionar o extrato metanólico dos calos de *D. macrophylla*;
- Comparar o perfil químico dos extratos de plântulas germinadas *in vitro* e *ex vitro* de *D. macrophylla*;
- Comparar o efeito de diferentes elicitores no perfil químico e na produção de iridoides nos calos de *D. macrophylla*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

Para a obtenção do material vegetal foi realizada uma coleta de frutos da planta *D. macrophylla* na Reserva Florestal Adolpho Ducke localizada a 25 Km do centro da cidade de Manaus na rodovia AM-010, no mês de junho de 2017. As exsiccatas dos materiais coletados (frutos e folhas) foram depositadas no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) com número de depósito 278388.

4.2 Cultura de tecidos vegetais

4.2.1 Estabelecimento de plântulas in vitro

A seções 4.2.1.1-4.2.1.4 do trabalho foram realizadas em conjunto com a MSc. Sabrina Schumaker Zanca fazendo parte do trabalho de doutorado da mesma e do trabalho de dissertação de mestrado da autora deste trabalho.

Para o estabelecimento de plântulas *in vitro*, foram usadas como explantes sementes do fruto da planta, as quais foram submetidas a tratamento de pré-desinfestação e desinfestação como descrito a seguir:

4.2.1.1 Pré-desinfestação das sementes

Os frutos foram imersos em solução fungicida Maneb (etilenbisditiocarbamato de manganês) (2 g.L^{-1}) por 2 horas. Na câmara de fluxo laminar foram abertos e retiradas as sementes. Cada fruto continha aproximadamente 250 sementes. O tegumento das sementes foi retirado para 6 tratamentos de desinfestação (480 sementes) e não retirado para 1 tratamento (20 sementes) (Figura 15).

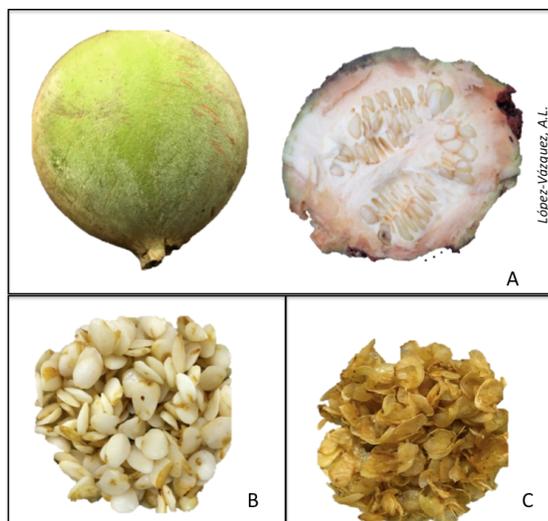


Figura 15. Frutos de *D. macrophylla* A: Frutos, B: Sementes, C: Tegumentos

Todas as sementes foram imersas em ácido ascórbico (10 mg.L^{-1}) por 1 minuto, para evitar sua oxidação. Dependendo do tratamento de desinfestação, a metade das sementes foram imersas por 1 hora em uma solução biocida composta pelo fungicida Maneb (2 g.L^{-1}) e o antibiótico estreptomicina (100 mg.L^{-1}).

4.2.1.2. Desinfestação das sementes

No total foram testados 7 tratamentos de desinfestação nas sementes (Tabela 3) com diferentes combinações de tempos de imersão nos agentes desinfetantes. Primeiro, em todos os tratamentos as sementes foram imersas em etanol a 70% por 1 minuto e depois lavadas três vezes com água destilada estéril. Após, as sementes foram imersas por diferentes tempos (3, 5 ou 10 min) em hipoclorito de sódio (NaClO) 2% e lavadas novamente três vezes com água destilada estéril. Cada tratamento teve um n amostral de 80 sementes com exceção do tratamento onde não foi retirado o tegumento com um n amostral de 20.

Após o tratamento com os desinfetantes, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio Murashigue e Skoog (MS), com o pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$, sacarose (3%) e com ágar (0,8%) como agente solidificante. Foram

mantidas a 26 ± 1 °C com um fotoperíodo de 16 h usando lâmpadas com intensidade de $50 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. Após 3 semanas foram avaliadas as porcentagens (%) de sementes vivas e assépticas, contaminadas por bactérias e contaminadas por fungos.

Tabela 3. Tratamentos de desinfestação das sementes de *D. macrophylla*

Tratamento de desinfestação (n=80)	Imersão em Etanol 70% (min)	Imersão em NaClO 2% (min)
T1*	1	3
T2*	1	5
T3*	1	10
T4**	1	5
T5	1	3
T6	1	5
T7	1	10

*-Tratamentos com pré-desinfestação usando solução biocida

**- Tratamento feito sem retirar o tegumento das sementes (n=20)

4.2.1.3 Germinação das sementes

Após a avaliação do teste de desinfestação, as sementes que se conservaram vivas e assépticas foram submetidas a tratamentos com 3 concentrações (2, 5, e 10 mg.L^{-1}) do hormônio ácido giberélico (AG_3) e o controle (0 mg.L^{-1}) para a germinação das sementes. O meio basal usado foi o MS com o pH ajustado a $5.7 \pm 0,1$, sacarose (3%) e com ágar (0,8%) como agente solidificante. As sementes foram mantidas a 26 ± 1 °C com um fotoperíodo de 16 h usando lâmpadas com intensidade de $50 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. Após 3 e 6 meses foi avaliada a porcentagem de germinação e de brotação de folhas.

4.2.1.4 Seleção de estágios das plântulas para extração

Foram selecionados 3 estágios de desenvolvimento da plântula para fazer a comparação química dos extratos (Figura 16). De cada estágio foram selecionadas 10 plântulas com as características descritas a seguir:

Estágio 1: Plântula com cápsula da semente ainda aderida, sem desenvolvimento de folhas e com raiz primária. A cápsula da semente aderida foi retirada para fazer a extração.

Estágio 2: Plântula sem cápsula da semente aderida, com presença de 4 folhas em um só nó e raiz desenvolvida.

Estágio 3: Plântula totalmente desenvolvida, com mais de 3 nódulos e folhas e raiz desenvolvida.



Figura 16. Esquema dos estágios das plântulas germinadas *in vitro*

Além do estabelecimento de plântulas *in vitro* foram semeadas sementes no viveiro do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB) para sua germinação *ex vitro*, nesse caso não foram controladas as condições de crescimento (Figura 17). Foram feitos os extratos de 10 plântulas germinadas inteiras, de raízes, de folhas e de caules por separado. A extração do material vegetal foi realizada conforme apresentado na seção de Preparação dos extratos (4.6).



Figura 17. Plântulas de *D. macrophylla* germinadas no viveiro do LABB-INPA

4.2.2 Indução de calo a partir de folhas das plântulas germinadas

Foram retiradas folhas das plântulas desenvolvidas a partir do experimento de germinação e usadas como explantes para a indução de calo. As folhas foram cortadas em segmentos de 1 cm² aproximadamente e inoculadas em tubos de ensaio com meio basal MS, com o pH ajustado a 5.7±0,1, sacarose a 3%, ágar 0,8% como agente solidificante e distintas combinações de reguladores de crescimento. Foram testadas combinações de auxinas (ANA e 2,4-D) e citocininas (KIN e BAP) como apresentadas na tabela 4. Todos os tratamentos foram realizados sem exposição à luz (escuro) e com fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro). Cada tratamento teve um *n* amostral de 20.

Após 6 semanas foram avaliadas as porcentagens de formação de calo friável, formação de calo compacto, formação de calo com raiz e morte de explantes em cada um dos tratamentos.

Tabela 4. Tratamentos para a indução de calo friável a partir das folhas das plântulas.

Tratamento* (n=20)	Auxina (mg.L ⁻¹)	Citocinina (mg.L ⁻¹)
TC-A	4 ANA	2 KIN
TC-B	2 ANA	2 KIN
TC-C	2 ANA	4 KIN
TC-D	4 2,4-D	2 KIN
TC-E	2 2,4-D	2 KIN
TC-F	2 2,4-D	4 KIN
TC-G	4 ANA	2 BAP
TC-H	2 ANA	2 BAP
TC-I	2 ANA	4 BAP
TC-J	4 2,4-D	2 BAP
TC-K	2 2,4-D	2 BAP
TC-L	2 2,4-D	4 BAP

* Tratamentos desenvolvidos no claro e no escuro

4.2.3 Curva de crescimento dos calos

Após selecionar o melhor tratamento para a indução de calos friáveis do item anterior, foi realizada uma curva de crescimento após o repique 2, onde os

calos estavam completamente formados. Para obter a curva de crescimento foi inoculado um calo com peso de 0,7 g em 42 frascos contendo 25 mL do meio de cultura que se mostrou mais eficiente para induzir a formação do calo friável. As culturas foram incubadas na sala de crescimento a 26 °C e sem luz. A cada 4 dias foram retirados três frascos com calo (n=3) durante 42 dias, para cada calo foram retirados restos do meio de cultura que posteriormente foram pesados para determinar a curva de crescimento de massa fresca. E para a obtenção da curva de crescimento de massa seca, os calos foram liofilizados e em seguida pesados.

Uma vez obtidas todas as massas, foram calculadas as médias e foram preparados gráficos com os dados massas dos calos vs o tempo para identificar as fases de crescimento. Os dados foram modelados usando a equação de Gompertz no software Statistica 7.0, a partir dela, foram determinados os parâmetros cinéticos: velocidade máxima de crescimento específico (μ_{\max}), tempo de geração (G) e tempo de fase lag (λ).

4.2.4. Estabelecimento de suspensões celulares e a curva de crescimento

As primeiras suspensões celulares foram estabelecidas depositando 1 g de calos friáveis em 30 mL do mesmo meio de cultura usado para induzir o calo friável (sem ágar) e incubadas na plataforma *shaker* em agitação de 110 rpm a \geq 25 °C sem luz. Após um período de 30 dias foi aumentada a temperatura a 30 °C para tentar propiciar um ambiente favorável para o crescimento das células. Quando houve o crescimento das células em suspensão foram repicados 3 g de células, primeiro em erlenmeyers com 50 mL de meio e nos seguintes repiques, 3 g de células em 100 mL de meio.

Para obter a curva de crescimento, 24 suspensões celulares foram estabelecidas inoculando 2 g de células em frascos erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio de cultura. As suspensões foram incubadas na plataforma *shaker* em agitação de 110 rpm a 30 °C sem luz. A cada 7 dias foram retiradas três suspensões (n=3), durante 49 dias, cada uma foi filtrada ao vácuo para recuperar a massa fresca de células e pesadas para determinar a curva de crescimento de

massa fresca. Para a obtenção da curva de crescimento de massa seca, as células filtradas foram liofilizadas e em seguida pesadas.

Uma vez obtidas todas as massas, foram calculadas as médias e plotados os dados de massas dos calos vs o tempo para identificar as fases de crescimento. Os dados foram modelados usando a equação de Gompertz usando o software Statistica 7.0 e a partir dela, foram determinados os parâmetros cinéticos: velocidade máxima de crescimento específico (μ_{max}), tempo de geração (G) e tempo de fase *lag* (λ).

4.3 Elicitação dos calos

Uma vez identificado o término da fase linear na curva de crescimento dos calos, estes foram submetidos a tratamentos de elicitação. Vários trabalhos de cultivo *in vitro* com espécies como *Gossypium hirsutum* (CELEDÓN; KOBAYASHI; VIEIRA, 2000), *Catharanthus roseus* (MORARD e HENRY, 1998) *Delphinium* sp. e *Hemerocallis* sp. (LEIFERT; MURPHY; LUMDSEN, 1995), relatam que a composição dos nutrientes nos meios de cultura nessas fases de crescimento diminuem até 25%, a sacarose até 20% e o pH aumenta até 6,2. Por isso, os meios de cultura que continham os elicitores foram preparados com redução de 75% dos nutrientes do meio MS, 70% da sacarose e o pH ajustado a 6,2 para evitar modificar a fase de crescimento na qual que se encontrava o calo no momento da elicitação.

Após cada tratamento, os calos elicitados foram coletados de acordo com o tempo estabelecido para cada elicitor e em seguida congelados e liofilizados para posteriormente serem extraídos como indicado na seção de preparação dos extratos.

4.3.1 Estresse salino

Nos tratamentos com estresse salino foram utilizadas 3 concentrações dos sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de alumínio (AlCl₃)

(Tabela 5). Os calos foram transferidos aos meios de cultura reduzidos e já acrescidos com os sais e posteriormente coletados após um período de 90 horas (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Tabela 5. Tratamentos de elicitação com os sais.

Tratamento (n=3)	mM (mmol·L ⁻¹)
NaCl	50
	100
	200
KCl	50
	100
	200
AlCl ₃	0,1
	0,15
	0,25

4.3.2 Adição de moléculas sinalizadoras Óxido Nítrico (NO) e Ácido Abscísico (ABA)

Para o tratamento com o óxido nítrico foram usadas 4 concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP) como doador do NO (Tabela 6). A solução de SNP foi adicionada em cada concentração aos meios de cultura autoclavados antes do ágar solidificar com auxílio de microfiltros com poros de 0.22 μ M, dentro da câmara de fluxo. A coleta dos calos para extração foi realizada no terceiro dia após inoculados no meio com SNP e no quinto dia quando inoculados no meio com ABA (XU e DONG, 2005; WU *et al.*, 2009).

Tabela 6. Tratamentos de elicitação com moléculas sinalizadoras.

Molécula	Concentração
SNP (NO)	5 mM (mmol.L ⁻¹)
	10 mM (mmol.L ⁻¹)
	20 mM (mmol.L ⁻¹)
	30 mM (mmol.L ⁻¹)
ABA	3 mg.L ⁻¹
	6 mg.L ⁻¹
	9 mg.L ⁻¹

4.3.3 Estresse por UV

O tratamento de elicitação com raios UV foi realizado usando uma lâmpada no comprimento de onda de 365 nm (UV-C). As lâmpadas foram colocadas a 10 cm dos frascos que continham os calos com tempo de exposição aos raios com 10, 25 e 45 min (Figura 18). A coleta dos calos expostos à radiação UV foi realizada 48 horas após o tratamento (MOON *et al.*, 2017).

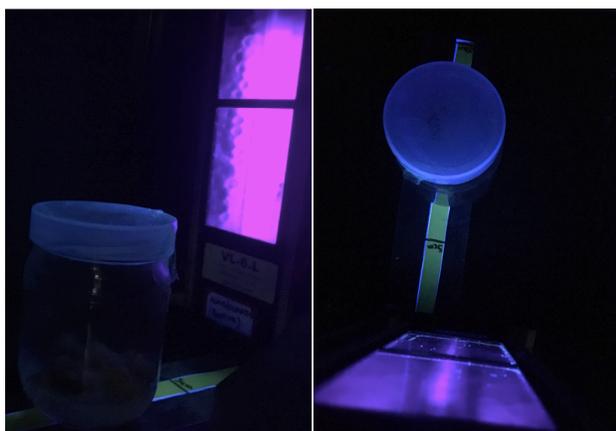


Figura 18. Exposição dos calos a radiação UV₃₆₅. (Vista lateral e superior).

4.4 Condições testadas para melhorar (ou induzir) a formação de calo friável

Com o intuito de melhorar a formação de calos friáveis de *D. macrophylla* foram testados novos tratamentos alterando a composição do meio de cultura alternando a concentração dos nutrientes e a concentração dos reguladores de crescimento.

4.4.1 Meios de cultura

Foram avaliados os meios de cultura MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962), o B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968), o Woody Plant Basic Medium (WPM) (LLOYD e McCOWN, 1980), MS com redução do 50% da concentração dos nutrientes e MS com redução do 50% da concentração dos nitratos (Tabela 7). Para todos os meios de cultura a fonte de carbono utilizada foi a sacarose a 3%, ágar 0,8% como agente solidificante, pH ajustado a $5.7 \pm 0,1$ e os reguladores de

crescimento 2 ANA + 2 BAP (mg.L⁻¹), foram inoculados 20 explantes por tratamento. A incubação dos explantes foi realizada a 26 °C sem luz.

Tabela 7. Composição de meios de cultura usados em cultura de tecidos *in vitro*.

Nutriente	MS	B5	WPM	MS ^{1/2}	MS -50% nitratos
Macronutrientes (mg.L ⁻¹)					
NH ₄ NO ₃	1.650	-	400	825	825
KNO ₃	1.900	2.500	-	950	950
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	386,33	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	72,5	220	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	180,54	185	370
KH ₂ PO ₄	170	-	170	85	170
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	-	-	13,9	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	-	-	18,65	37,3
FeNaEDTA	-	-	36,7	-	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150	-	-	-
Fe	-	28	-	-	-
K ₂ SO ₄	-	-	990	-	-
Micronutrientes (mg.L ⁻¹)					
KI	0,83	0,75	-	0,415	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	3	6,2	3,1	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	10	16,9	11,15	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	2	8,6	4,3	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,25	0,0125	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	-	0,0125	0,025
Componentes orgânicos (mg.L ⁻¹)					
Tiamina-HCl	0,1	10	1	0,0125	0,1
Piridoxina-HCl	0,5	1	0,5	0,025	0,5
Ácido nicotínico	0,5	1	0,5	0,025	0,5
Glicina	2	-	2	1	2,0
Mio-Inositol	100	100	100	50	100
Sacarose	30	30	30	30	30

Após 6 semanas foram avaliadas as porcentagens de formação de calo friável, formação de calo com raiz, crescimento do calo (grande ou pequeno) e morte de explantes.

4.4.2 Concentração de hormônios nos meios de cultura

Também foram testados outros tratamentos mudando a concentração dos reguladores de crescimento ANA e BAP (tabela 8). Foi usado o meio MS com 100% dos nutrientes, o pH ajustado a $5.7 \pm 0,1$, sacarose a 3% e ágar 0,8%, e foram inoculados 20 explantes por tratamento. A incubação dos explantes foi realizada em 26 °C sem luz.

Tabela 8. Tratamentos com ANA e BAP para a otimização da formação de calo friável.

Tratamento	ANA(mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)
A	2	1
B	1	1
C	1	2
D	1,5	2
E	4	2
F	2	2
G	2	4

Após 6 semanas foram avaliadas as porcentagens de formação de calo friável, formação de calo com raiz, crescimento do calo (grande ou pequeno) e morte de explantes.

4.5 Caracterização Anatômica e Histoquímica dos calos

Foi realizada uma caracterização anatômica e histoquímica geral dos calos de *D. macrophylla* no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Amazonas e algumas fotografias obtidas no microscópio de luz do Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Para isso, primeiramente foi preparada a solução FAA₇₀ para fixar os calos,

foram misturados 50 mL de Formaldeído (37%) com 50 mL de Ácido Acético Glacial (100%) e 900 mL de Etanol (70%) (JOHANSEN, 1940).

Os calos controle e dos tratamentos intermediários das eliciações com sais (100 mM NaCl, 100 mM KCl e 0,15 mM AlCl₃) foram fixados na solução FAA₇₀ por 72 h e posteriormente estocados em uma solução de Etanol 70% dentro da geladeira até o momento das análises. A fixação consiste em manter o material o mais semelhante possível ao material vivo para sua futura análise.

Para as análises, os calos estocados em etanol 70% foram lavados com água destilada e realizados cortes longitudinais manualmente. Para a caracterização anatômica foi realizada uma coloração adicionando os corantes Safranina e Azul de Astra 1:9 sob os calos e após 1 minuto lavado-os com água destilada. Nessa análise as paredes celulares são coradas de azul e a coloração rosa é indicativo de que as células são diferenciadas. As células sem nenhuma tingção também foram observadas no microscópio de luz.

Para as análises histoquímicas dos calos tratados com sais, foram realizadas colorações com cloreto férrico (FeCl₃) (10%) para a detecção de substâncias fenólicas (JOHANSEN, 1940), Reagente de Wagner para a detecção de alcaloides (FURR e MAHLBERG, 1981), ácido sulfúrico (H₂SO₄) para a detecção de terpenoides (GEISSMEN e GRIFFIN, 1971).

Os calos foram corados com FeCl₃ por 30 minutos e posteriormente lavados com água destilada. A detecção de substâncias fenólicas ocorre quando são observadas colorações verde intenso, púrpura, azul ou negro.

Com o reagente de Wagner os calos foram corados por 10 minutos e posteriormente lavados com água destilada. A detecção de substâncias nitrogenadas ocorre quando são observadas colorações vermelhas.

Com H₂SO₄ os calos foram corados e imediatamente observados no microscópio. A detecção de terpenoides ocorre quando os tecidos coram de vermelho acastanhado.

Foram preparadas lâminas temporais pingando em uma lâmina uma gota de água destilada colocando os cortes já corados sobre a mesma, com auxílio de um pincel; após foi colocada a lamínula com cuidado. Assim, os cortes foram

observados no microscópio de luz e tiradas as respectivas fotografias.

4.6 Preparação dos extratos

4.6.1 Extratos provenientes do teste de germinação

As plântulas germinadas *in vitro* e no viveiro, as sementes e os tegumentos das sementes foram secos no liofilizador. Após a secagem, o material vegetal seco foi pesado, macerado e extraído unicamente com metanol (MeOH) em uma proporção de 15 mL de solvente para 1 g de material seco, utilizando banho de ultrassom por 20 minutos com quatro repetições. Os extratos foram filtrados em cada repetição e concentrados.

Tabela 9. Extratos provenientes das plântulas germinadas de *D. macrophylla* (teste de germinação).

Código da amostra	Material extraído
Dm-S	Sementes
Dm-T	Tegumento
Dm-est 1	Plântulas no estágio 1
Dm-est 2	Plântulas no estágio 2
Dm-est 3	Plântulas no estágio 3
Dm-V	Plântulas germinadas no viveiro
Dm-FV	Folhas das Plântulas do viveiro
Dm-CV	Caules das Plântulas do viveiro
Dm-RV	Raízes das Plântulas do viveiro

4.6.2 Calos e suspensões

Os calos provenientes dos tratamentos de elicitação e da curva de crescimento foram limpos utilizando pinças para retirada de fragmentos do meio de cultura e as suspensões celulares filtradas e lavadas com água destilada. Após isso, o material vegetal foi mantido no congelador por um dia e posteriormente liofilizado. Após a liofilização, o material vegetal seco foi pesado, macerado e extraído unicamente com MeOH na proporção 15 mL de solvente para 1 g de

material seco, auxiliado por banho de ultrassom por 20 minutos com quatro repetições. Os extratos foram filtrados em cada repetição e concentrados.

Tabela 10. Extratos dos calos de *D. macrophylla* tratados com elicitores.

Código da amostra	Material extraído
Dm-CON	Calos sem elicitación (CONTROLE)
Dm-50 Na	Calos elicitados com 50 mM de NaCl
Dm-100 Na	Calos elicitados com 100 mM de NaCl
Dm-200 Na	Calos elicitados com 200 mM de NaCl
Dm-50 K	Calos elicitados com 50 mM de KCl
Dm-100 K	Calos elicitados com 100 mM de KCl
Dm-200 K	Calos elicitados com 200 mM de KCl
Dm-10 Al	Calos elicitados com 0,1 mM de AlCl ₃
Dm-25 Al	Calos elicitados com 0,15 mM de AlCl ₃
Dm-50 Al	Calos elicitados com 0,25 mM de AlCl ₃
Dm-3A	Calos elicitados com 3 mg.L ⁻¹ de ABA
Dm-6A	Calos elicitados com 6 mg.L ⁻¹ de ABA
Dm-9A	Calos elicitados com 9 mg.L ⁻¹ de ABA
Dm-5S	Calos elicitados com 10 mM de SNP
Dm-10S	Calos elicitados com 20 mM de SNP
Dm-20S	Calos elicitados com 30 mM de SNP
Dm-30S	Calos elicitados com 40 mM de SNP
Dm-10UV	Calos expostos por 10 min a UV ₃₆₅
Dm-25UV	Calos expostos por 25 min a UV ₃₆₅
Dm-45UV	Calos expostos por 45 min a UV ₃₆₅

4.7 Análise dos extratos

4.7.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Todos os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) utilizando cromatoplasmas comparativas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV_{254nm}. A eluição das placas foi realizada com diferentes sistemas de solventes orgânicos em proporções diferentes. Para a revelação das substâncias foram utilizados os reveladores químicos: anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico (Ce(SO₄)₂), hidróxido de potássio (KOH), cloreto férrico

(FeCl₃), 2-aminoetil difenilborinato/polietilenoglicol (NP/PEG) e reagente de Dragendorff, e como revelador físico luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm.

As triplicatas dos extratos dos calos tratados com elicitores bem como os extratos provenientes dos testes de germinação foram comparados em placas cromatográficas no mesmo sistema de eluição e reveladas com anisaldeído sulfúrico. Para comparar qualitativamente a concentração de substâncias em cada extrato, as amostras foram padronizadas em uma concentração de 15 mg/mL e aplicados 2 µL de cada amostra usando capilares graduados.

4.7.2 Fracionamento do extrato metanólico dos calos de *D. macrophylla*

4.7.2.1 Cromatografia em coluna aberta (CC)

Após a análise por CCDC dos perfis químicos, o microextrato metanólico dos calos de *D. macrophylla* (255 mg) que não foi exposto a nenhum tratamento de elicitação (Dm-CON), foi fracionado inicialmente em coluna aberta (d= 1,5 cm) usando como fase estacionária o adsorvente Sephadex LH-20 e como fase móvel o solvente orgânico MeOH. Foram coletadas 12 frações, que foram analisadas novamente por CCDC usando os sistemas de eluição AcOEt/MeOH 8:2, 7:3 e AcOEt/MeOH/H₂O/ácido acético 9:1:1:1 com dupla eluição. As frações que se mostraram interessantes (F4-F5) foram reunidas e refracionadas (155 mg) em coluna aberta (d= 1,3 cm) usando como fase estacionária sílica (SiO₂) e os sistemas de solventes AcOEt/MeOH 8:2, 7:3, 1:1 e MeOH 100%. Dessa coluna foram coletadas 24 frações que posteriormente foram analisadas por CCDC. As frações F4 e F5 foram reunidas e analisadas por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) e RMN de ¹H, bem como a fração 3.

4.7.2.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Após os fracionamentos cromatográficos em colunas abertas as frações 3, 4 e 5 da coluna de SiO₂, foram reunidas para separação por CCDP. Para a confecção das placas, 100 g de sílica gel 60 foram umedecidos em 300 mL de

água destilada. Uma vez umedecidas e sem formação de bolhas, a sílica foi aplicada em placas de vidro de 20x20 cm (previamente lavadas com água e depois com acetona para a remoção de impurezas) e mantidas na estufa por 1 h a 100 °C para a evaporação total da água e ativação das mesmas. Após ativação, a amostra foi aplicada com auxílio de capilar de vidro, deixando uma distância de 1 cm da base. A CCDP foi eluída uma vez com o sistema CHCl₃/MeOH 7:3 e foram separadas 6 frações. As áreas onde as substâncias foram observadas na placa com luz UV nos comprimentos de onda 365 e 254 nm, foram marcadas para a remoção manual. Elas foram recolhidas separadamente e extraídas com solventes orgânicos. Em seguida, foram filtradas com auxílio de funil, kitassato e vácuo. Após a filtração, a amostra separada foi concentrada e pesada.

4.7.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A fração 3, proveniente da CCDP foi analisada por LC/MS e esta análise indicou mistura com outras substâncias. Para análise da amostra, a mesma foi dissolvida em MeOH e 5 gotas de acetonitrila (ACN) em coluna analítica C₁₈ (Phenomenex®; 250 x 4,6 mm) com volume de injeção de 8 µL e fluxo de 1 mL/min. A análise foi realizada no modo reverso de eluição, no sistema isocrático utilizando MeOH/H₂O 20:80.

Para a purificação, 10 mg da amostra foram dissolvidos em 150 µL de MeOH e 3 gotas ACN em coluna semipreparativa C₁₈ (Phenomenex®; 254 x 10 mm) com volume de injeção de 50 µL e fluxo de 4,7 mL/min. A análise foi realizada no modo reverso de eluição, no método isocrático utilizando MeOH/H₂O 20:80.

Na análise da amostra por CLAE foram observados 3 picos com absorção máxima em 236 nm. O terceiro pico (t_R = 11,5 min) pertencente à substância de interesse foi observado em maior concentração. Durante a purificação foram recolhidas 7 frações, sendo que o pico 3 foi coletado na fração 6 e depois analisada por RMN de ¹H, sendo denominada **substância I**.

4.7.3 Identificação/Elucidação estrutural da substância isolada

4.7.3.1 Ressonância Magnética Nuclear

Para a proposta de identificação/elucidação estrutural da substância isolada foi utilizada a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Após evaporação do solvente, a substância proveniente do pico 4 da separação por CLAE, foi diluída em 200 μL do solvente deuterado dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$). Para a identificação da mesma foi utilizada a RMN de ^1H de 300 MHz (Bruker Fourier 300).

4.7.3.2 Análise dos microextratos por RMN de ^1H

Para esta análise, 15 mg de cada amostra proveniente dos extratos do teste de germinação (sementes, tegumentos, plântulas germinadas *in vitro* e *ex vitro*) foram padronizados e diluídos em 500 μL do solvente deuterado $\text{DMSO-}d_6$. No caso dos calos cultivados *in vitro* provenientes dos testes de elicitação, foram pesados 25 mg dos extratos e diluídos em 500 μL de $\text{DMSO-}d_6$.

Foram também feitas análises de RMN de ^1H dos extratos metanólicos preparados a partir das amostras recolhidas durante os dias de experimento da curva de crescimento de células em suspensão e dos calos. Para isso, foram diluídos 15 mg das amostras em 500 μL de $\text{DMSO-}d_6$.

4.8 Análise quimiométrica dos extratos

Os espectros de RMN de ^1H dos microextratos foram convertidos a formato .csv, onde foi criada uma matriz com os dados do deslocamento químico e a intensidade dos sinais. Esses dados foram posteriormente exportados para o programa R Studio e excluídas as regiões onde não se apresentavam sinais interessantes.

4.8.1 Microextratos dos testes de germinação

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos do material vegetal usado nos testes de germinação *in vitro* bem como as partes das plântulas germinadas no viveiro, foram analisadas para selecionar sinais interessantes na região característica de hidrogênios ligados a nitrogênios, bem como sinais da substância isolada. Assim, foi realizada a análise de PCA/Fuzzy dos dados.

4.8.2 Calos e suspensões

Os dados dos extratos de calos dos e suspensões de *D. macrophylla* que se encontravam no dia 35 após seu subcultivo foram avaliados também com o valor das integrais dos sinais da substância isolada em relação às do solvente $\text{DMSO-}d_6$. De igual forma, os dados dos extratos provenientes das curvas de crescimento tanto dos calos como das células em suspensão, foram avaliados também a partir dessa relação e foi observada a produção da substância ao longo do tempo de crescimento das culturas *in vitro* enquanto à sua concentração na amostra.

4.8.3 Calos elicitados

Foram identificadas as áreas dos espectros onde se encontravam sinais de ^1H interessantes para fazer uma análise geral do perfil químico dos calos em cada tratamento de elicitação. Após serem exportados os dados do espectro a R Studio, foi realizada a análise de PCA, PCA/Fuzzy e HCA para identificar os grupos de tratamentos que tiveram um efeito parecido no perfil químico dos calos elicitados.

Foi também realizada uma análise em relação às regiões do espectro pertencentes à molécula isolada para avaliar o efeito dos elicitores na concentração da mesma na amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultura de Tecidos *In Vitro*

5.1.1 Desinfestação das sementes

Todos os tratamentos de desinfestação mostraram uma alta porcentagem de assepsia e sobrevivência sem apresentar diferença significativa entre eles quando foram avaliados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (Tabela 11). O tratamento que apresentou melhores resultados (98,8%) foi o T2, onde as sementes foram pré-desinfetadas com solução biocida, imersas em etanol 70% por 1 minuto e 5 minutos em NaClO ao 2%. Embora esse tratamento tenha apresentado melhores resultados na assepsia das sementes, poderia se prescindir do uso da solução biocida, já que todos os tratamentos testados podem-se considerar satisfatórios pela alta porcentagem de assepsia e sobrevivência das sementes, além de serem estatisticamente iguais. Quando são realizados tratamentos de desinfestação de explantes na cultura *in vitro*, sempre é procurado usar a menor quantidade de desinfetantes e um menor tempo de exposição a eles, isto trará menor quantidade de dano ao explante (SMITH, 2013) e diminuirá custos. O estabelecimento de plântulas *in vitro* a partir de sementes é o melhor método para obter explantes assépticos sem danos causados por agentes desinfetantes que possam comprometer a regeneração ou crescimento das novas culturas (CHAWLA, 2002)

Esse é o primeiro relato do desenvolvimento de um protocolo de desinfestação das sementes de *D. macrophylla*, além de apresentar melhores resultados quando comparados com os obtidos na espécie do mesmo gênero *Duroia saccifera*, onde 25 % das sementes apresentou contaminação por fungos (SOUZA, 2016).

Tabela 11. Porcentagem de sementes vivas e assépticas e contaminadas após os tratamentos de desinfestação.

Tratamento de desinfestação	Tempo de imersão (min)		Contaminação		Sementes vivas e assépticas (%)
	Etanol 70%	NaClO 2%	Fúngica(%)	Bacteriana(%)	
T1*	1	3	5,00	0	95,0 ^a
T2*	1	5	1,25	0	98,8 ^a
T3*	1	10	2,50	0	97,5 ^a
T4**	1	5	10,00	0	90,0 ^a
T5	1	3	3,75	1,25	95,0 ^a
T6	1	5	7,50	1,25	91,3 ^a
T7	1	10	8,75	2,50	88,0 ^a

*-Tratamentos com pre-desinfestação usando solução biocida

**- Tratamento feito sem retirar o tegumento das sementes (n=20)

% seguidas pela mesma letra minúscula não são diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey a uma probabilidade de 5%

5.1.2 Germinação das sementes

As sementes que se conservaram assépticas e vivas, e que foram transferidas para meios de cultura com concentrações diferentes de ácido giberélico, apresentaram altos índices de germinação em todas as concentrações testadas (Figura 19).

Quando foram analisados pelo teste de Tukey, nenhum dos quatro tratamentos apresentou diferença significativa na germinação das sementes (Figura 20). Os tratamentos intermediários com 2 e 5 mg.L⁻¹ de AG₃ apresentaram as maiores taxas de germinação com 89,1 e 88,4 %, respectivamente. É também a primeira vez que é relatado um protocolo de germinação de sementes *in vitro* da espécie *D. macrophylla*. Comparando esses resultados com a germinação das sementes da espécie *D. saccifera* onde 50% das sementes germinaram quando tratadas com 5 mg.L⁻¹ de AG₃ (SOUZA, 2016), foram obtidos melhores resultados.

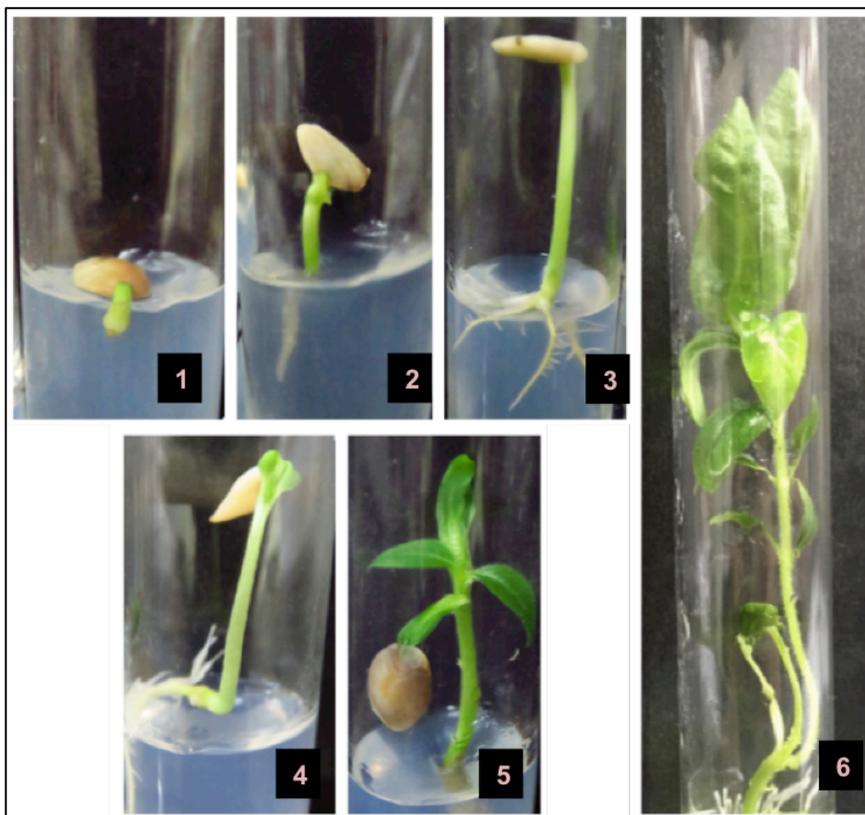


Figura 19. Processo de germinação *in vitro* das sementes de *D. macrophylla* 1. Emergência do hipocótilo, 2. Alongamento do hipocótilo e emergência da radícula, 3. Alongamento do hipocótilo e crescimento das raízes secundárias, 4. Primórdio foliar e exposição dos cotilédones, 5. Desenvolvimento foliar, 6. Plântula totalmente formada.

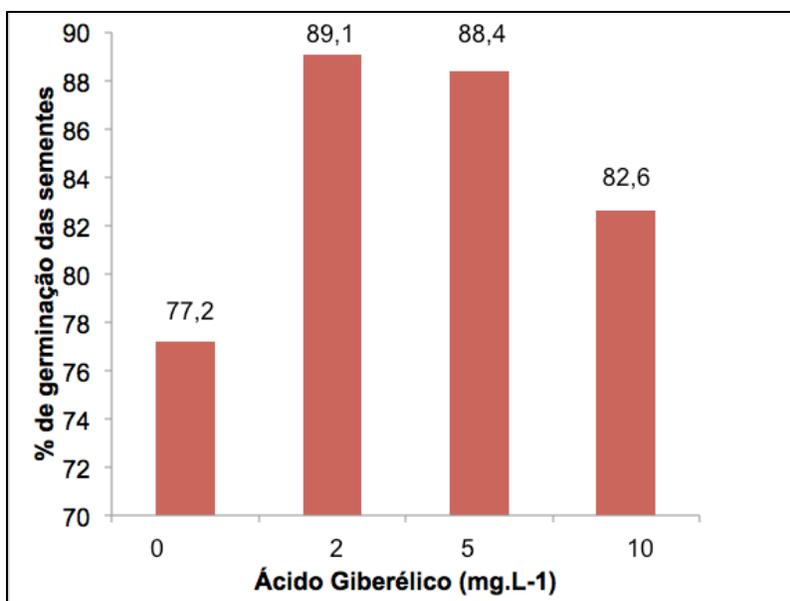


Figura 20. Porcentagens de germinação das sementes tratadas com AG₃

Foi avaliada também, a porcentagem de germinação das sementes após 3 e 6 meses em relação à interação do tratamento de desinfestação e a concentração de AG₃ no meio (Tabela 12). Assim, foi observada uma diferença significativa no tempo de germinação das sementes quando foram tratadas com a solução biocida bem como a presença de tegumento na semente. Quando a solução biocida não foi utilizada no processo de desinfestação, foram observadas maiores taxas de germinação em menor tempo. Os agentes biocidas contêm substâncias químicas tóxicas que ajudam na eliminação de microrganismos podem prejudicar os explantes e comprometer os cultivos (SMITH, 2013).

Também foi observado que a presença do tegumento retarda o processo de germinação das sementes. Em muitas espécies de plantas, as camadas de cobertura de sementes (tegumentos) impõem uma restrição física à protrusão da radícula, que deve ser superada pelo potencial de crescimento do embrião (KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005), podendo explicar o lento processo de germinação em sementes de *D. macrophylla* quando o tegumento não foi retirado da semente. Taiz e Zeiger (2010) explicam que os embriões das sementes que apresentam dormência imposta pela testa ou tegumento, germinarão rapidamente só quando entrarem em contato com água e oxigênio, o qual foi o caso das sementes de *D. macrophylla* quando o tegumento foi retirado.

Quando o AG₃ foi utilizado nas sementes de *D. macrophylla*, as taxas de germinação foram maiores, embora não apresentaram diferenças significativas. No entanto, quando o meio não foi suplementado com AG₃, a taxa de germinação (77,2 %) pode ser considerada satisfatória. Este resultado pode ser explicado pela disponibilidade endógena de AG₃ que é suficiente para estimular a germinação das sementes, como explicado por Souza e colaboradores (2016), onde também relataram que as sementes de *Genipa americana* (Rubiaceae) não requerem o uso de AG₃ externo para germinação *in vitro*, onde o mesmo foi relatado na espécie da mesma família *Oldenlandia affinis* (SEYDEL e DÖRNENBURG, 2006). As giberelinas tem vários sítios de síntese e um deles é precisamente nas sementes em desenvolvimento e estágios tardios, mais especificamente nos embriões durante o processo de germinação (TAIZ e ZEIGER, 2010).

Tabela 12. Porcentagem (%) de germinação após 3 - 6 meses.

Tratamento de desinfestação	(% de germinação após de 3 e 6 meses)			
	0 mg.L ⁻¹ AG ₃	2 mg.L ⁻¹ AG ₃	5 mg.L ⁻¹ AG ₃	10 mg.L ⁻¹ AG ₃
T1*	31,6 – 57,9 <i>bc</i>	55,0 – 90,0 <i>ab</i>	52,6 – 78,9 <i>abc</i>	66,7 – 100,0 <i>a</i>
T2*	50,0 – 66,7 <i>abc</i>	53,3 – 86,7 <i>ab</i>	73,7 – 100,0 <i>a</i>	52,6 – 94,7 <i>ab</i>
T3*	21,1 – 73,7 <i>abc</i>	60,0 – 86,7 <i>ab</i>	68,4 – 100,0 <i>a</i>	66,7 – 77,8 <i>abc</i>
T4**	-	-	16,7 – 66,7 <i>abc</i>	-
T5	63,2 – 78,9 <i>abc</i>	70,0 – 85,0 <i>abc</i>	87,5 – 87,5 <i>ab</i>	80,0 – 100,0 <i>a</i>
T6	70,0 – 100,0 <i>a</i>	80,0 – 95,0 <i>ab</i>	68,4 – 94,7 <i>ab</i>	70,0 – 80,0 <i>abc</i>
T7	52,6 – 84,2 <i>abc</i>	90,0 – 90,0 <i>ab</i>	78,9 – 89,5 <i>ab</i>	40,0 – 45,0 <i>c</i>

*Tratamentos com pre-desinfestação suando solução biocida

** Tratamento feito sem retirar o tegumento das sementes (n=20)

% seguidas pela mesma letra minúscula não são diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey a uma probabilidade de 5%.

Apesar de não haver diferenças significativas do teste de Tukey ($p < 0,05$) no uso de ácido giberélico para a germinação, as concentrações entre 2 e 10 mg.L⁻¹ foram mais efetivas na brotação de folhas e, conseqüentemente, no estabelecimento de plântulas *in vitro* (Tabela 13). Além de quebrar a dormência das sementes para a germinação, as giberelinas também tem a função de alongamento de caule (TAIZ e ZEIGER, 2010). Isto pode explicar que além das giberelinas endógenas, a planta *D. macrophylla* precisa da aplicação de AG₃ para obter maiores taxas de brotação de folhas após germinada a semente.

Após os testes de germinação, as plântulas foram transferidas a meio de cultura MS, 3% de sacarose e 0,8% de ágar sem nenhum regulador de crescimento. Nesse meio vem sendo conservadas e repicadas no laboratório com fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e 26 °C.

Tabela 13. Porcentagem de brotação de folhas após 3 - 6 meses.

Tratamento de desinfestação	% de brotação de folhas após de 3 e 6 meses			
	0 mg.L ⁻¹ AG ₃	2 mg.L ⁻¹ AG ₃	5 mg.L ⁻¹ AG ₃	10 mg.L ⁻¹ AG ₃
T1*	10,5 – 21,1	15,0 – 60,0	21,1 – 57,9	16,7 – 50,0
T2*	5,6 – 44,4	6,7 – 40,0	10,5 – 68,4	31,6 – 47,4
T3*	0 – 10,5	6,7 – 40,0	5,3 – 57,9	16,7 – 44,4
T4**	-	-	0 – 33,3	-
T5	10,5 – 42,1	20,0 – 45,0	25,0 – 62,5	25,0 – 70,0
T6	5,0 – 15,0	30,0 – 70,0	31,6 – 57,9	20,0 – 50,0
T7	5,3 – 21,1	45,0 – 60,0	36,8 – 68,4	10,0 – 35,0

*Tratamentos com pre-desinfestação suando solução biocida

** Tratamento feito sem retirar o tegumento das sementes (n=20)

5.1.3 Indução de calos

A partir de todos os tratamentos de indução a partir das folhas das plântulas foram produzidos calos. Foram formados diferentes tipos de calos, como calo compacto clorofilado, calo branco compacto, calo com raiz e calo semifriável (Figura 21). Em nenhum dos tratamentos foi produzido calo completamente friável (mole e que se separa facilmente). Essa textura é desejável por ser um bom inóculo para o estabelecimento de suspensões celulares, além de serem células menos propensas a criar agregados celulares. Os tamanhos das células agregadas podem afetar a produção de metabólitos secundários devido a seus diferentes graus de diferenciação e condições de crescimento (MIAO *et al.*, 2012).

Os tratamentos com as distintas concentrações e tipos de hormônios tiveram diferença significativa na formação de calos semifriáveis (Tabela 14), sendo que quando os explantes foram tratados com 2 ANA + 2 BAP mg.L⁻¹ (TC-H) foi obtida a maior porcentagem (62,5%). Esses calos apresentaram consistência ligeiramente compacta em seu centro, porém quando cresceram, a formação de calo friável na superfície foi mais evidente (Figura 21e).

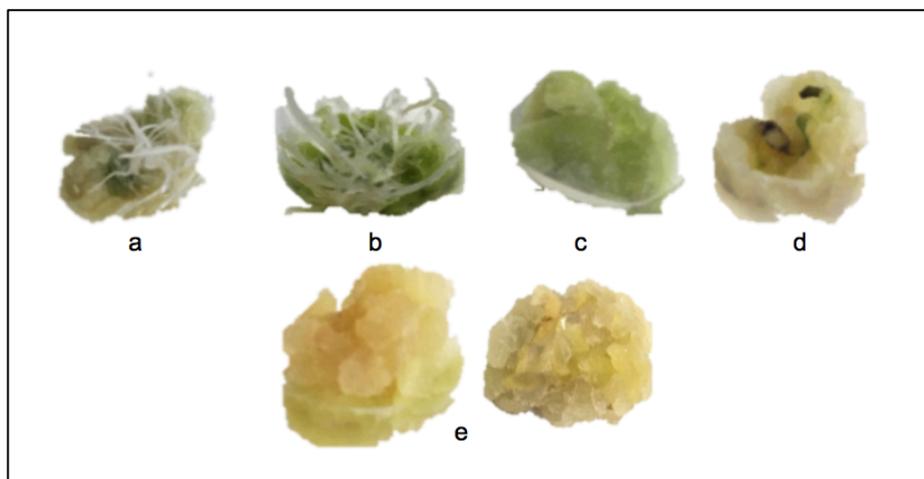


Figura 21. Tipos de calos formados a partir de explante folhar de *D. macrophylla*: a) calo branco com raiz, b) calo clorofilado com raiz, c) calo clorofilado compacto, d) calo branco compacto, e) calo semifriável.

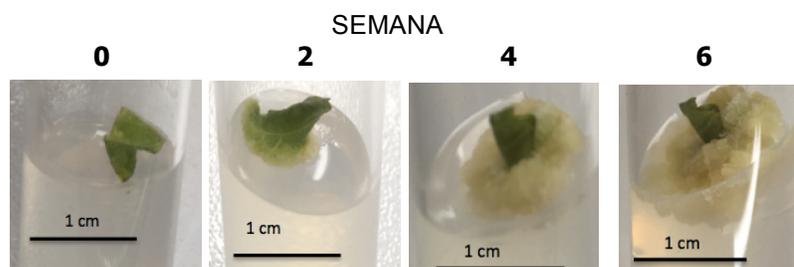


Figura 22. Formação de calos em explantes folhares de *D. macrophylla* durante 6 semanas.

Anteriormente, ZANCA (2015) realizou a indução de calos de *D. macrophylla* a partir de folhas da árvore previamente desinfestadas. Esses calos foram induzidos testando unicamente na concentração de 4 mg. L^{-1} de 2,4-D + 2 mg. L^{-1} de KIN no meio de cultura com fotoperíodo de 16 h, obtendo calos multiformes majoritariamente compactos e clorofilados. Nesse trabalho, as folhas das plântulas germinadas *in vitro* que foram submetidas a essas mesmas condições, apresentaram a formação de calos também compactos e clorofilados, além de alguns deles formarem raízes. Isto último pode indicar que as folhas mais jovens de *D. macrophylla* contém maior teor de auxinas que as folhas de árvores totalmente desenvolvidas. As folhas jovens das plantas são locais de síntese de auxinas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992). Isto só pode ser afirmado para a espécie estudada nesse trabalho, porque na espécie do mesmo gênero *D.*

saccifera, essas mesmas concentrações de auxinas e condições de crescimento apresentaram ótimos resultados na formação de calo completamente friável em folhas jovens de plântulas germinadas *in vitro* (SOUZA, 2016).

Tabela 14. Porcentagens dos tipos de calos de *D. macrophylla* formados nos distintos tratamentos

Tratamento	% Calo semifriável	% Calo com raiz
TC-A	0 ^a	12,5
TC-B	5 ^a	55
TC-C	22,5 ^{a,b,c}	7,5
TC-D	5 ^a	0
TC-E	10 ^{a,b}	0
TC-F	15 ^{a,b}	5
TC-G	10 ^{a,b}	20
TC-H	62,5 ^d	10
TC-I	12,5 ^{a,b}	10
TC-J	5 ^a	0
TC-K	37,5 ^{b,c,d}	0
TC-L	50 ^{c,d}	5

*% seguidas pela mesma letra minúscula não são diferentes entre si de acordo com o teste de Duncan a uma probabilidade de 5%.

O fator fotoperíodo teve também um impacto bastante significativo na indução de calo mais friável em todos os tratamentos. Os calos que cresceram no escuro não apresentaram coloração verde em nenhum dos tratamentos e foi obtida uma maior formação de calo friável (Figura 23). Sabe-se que cada espécie e explante precisam de condições específicas para a indução de calos. Por exemplo, no caso *D. macrophylla* a ausência de luz nas culturas foi essencial para a produção de calos moles e sem clorofila (friáveis). Por outro lado, na espécie *D. saccifera* foram obtidos calos totalmente friáveis na presença de luz (SOUZA, 2016). Vários trabalhos tem relatado o efeito do fotoperíodo na formação de diferentes tipos de calos em distintos explantes (KHAN *et al.*, 2006; SOORNI; KAHRIZI; MOLSAGHI, 2012; SIDDIQUE e ISLAM, 2016). A formação de calos verdes (clorofilados) e compactos de *D. macrophylla* na presença de luz pode ser explicado pelo fato de que a luz estimula a fotossíntese, a qual ocorre nos

cloroplastos que contém os pigmentos verdes especializados na absorção da luz (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992). Por isso, a coloração dos calos mantidos no escuro foi mais esbranquiçada, já que na ausência de luz a clorofila não foi necessária para estimular a fotossíntese. A fotossíntese pode ser limitada pela luz ou pela concentração de CO₂, os calos crescidos no escuro são limitados unicamente de luz e é por isso que conseguem sobreviver, já que as plantas tem a capacidade de aclimação a ambientes sem luz. Isto ocorre porque no escuro não há assimilação fotossintética de carbono, mas pelo fato da respiração mitocondrial continuar, o CO₂ é emitido pela mesma planta (TAIZ e ZEIGER, 2010).

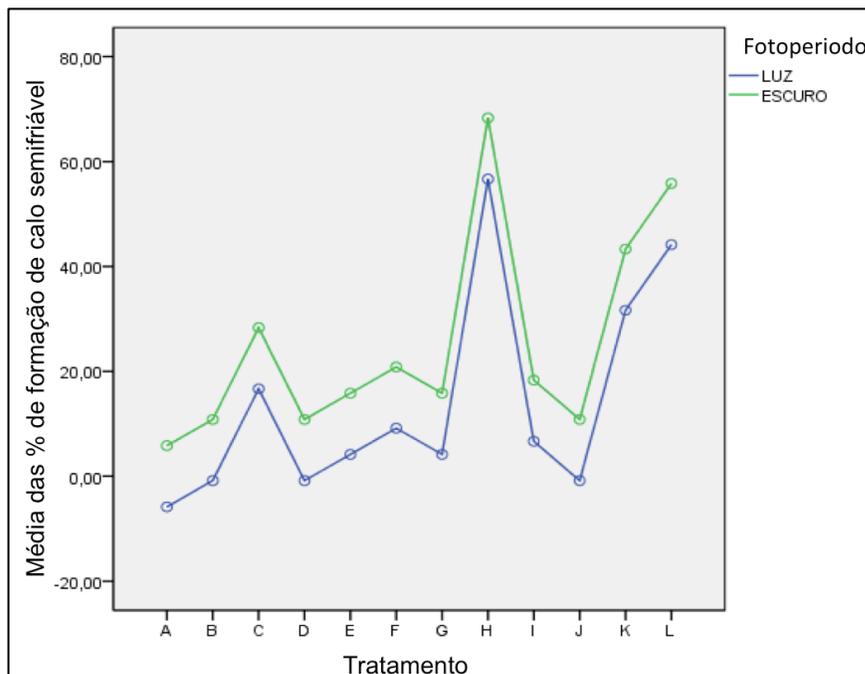


Figura 23. Gráfico de perfil dos tratamentos em porcentagem de formação de calos semifriáveis.

Em vários dos tratamentos, a formação de calos com raiz se apresentou sobretudo quando a auxina ANA foi usada. No entanto, unicamente o tratamento B (2 mg.L⁻¹ de ANA +2 mg.L⁻¹ de KIN) sem ser importante o fotoperíodo usado, teve diferenças significativa na formação de calo com raiz. As culturas *in vitro* de raízes tem sido usadas principalmente para a produção de metabólitos secundários que são sintetizados especificamente nas raízes da planta (GIRI e ZAHEER, 2016), além de ser um sistema de cultura organizado e diferenciado que possui

estabilidade genética e biossintética (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010). A formação de calos com raiz a partir de folhas de *D. macrophylla* poderia ser útil para futuras pesquisas com culturas *in vitro* de tecido diferenciado da espécie.

5.2 Caracterização anatômica dos calos de *D. macrophylla*

As características macroscópicas dos calos semifriáveis de *D. macrophylla* apresentaram uma consistência compacta no centro do calo e na periferia se observou a formação de calo mais mole e que se desprendia fácil.

Quando foram observados no microscópio, os calos mostraram que a sua composição celular é extremamente heterogênea (como esperado), variando a forma das células, onde na parte central do calo as células apresentaram uma aparência mais esférica e na periferia mais alongadas (Figura 24).

As células esféricas apresentaram uma morfologia característica de células meristemáticas com diâmetros similares (isodiamétricas) que variaram entre 25 e 75 µm. Esse tipo de células geralmente apresentam tamanho pequeno, um ritmo de divisão alto e citoplasma denso (CHIAVEGATTO *et al.*, 2015). As células alongadas localizadas na periferia do calo apresentaram larguras entre 110-180 µm. Provavelmente se encontravam em divisão, porém, com um ritmo de divisão baixo.

Os calos corados com Azul de Astra e Safranina apresentaram em seu centro uma coração rosa, com paredes celulares primárias coradas de azul. As células da periferia coraram a parede unicamente de azul. Também foi observado que as células do centro mostraram uma acomodação mais ordenada e com menos espaços em relação às células que se encontravam na periferia (Figura 25). Esses resultados sugerem que as células do centro dos calos que mostraram uma textura mais compacta, apresentaram um grau de diferenciação maior, ou seja, um comportamento parenquimático que pode estar associado à formação de xilema ou floema (tecidos vasculares) nos calos (BORNMAN *et al.*, 1976). As células parenquimáticas geralmente apresentam uma parede celular primária

pouco engrossada e mostram um grau menor de diferenciação que outras células de tecidos das plantas (EVANS, 2009).

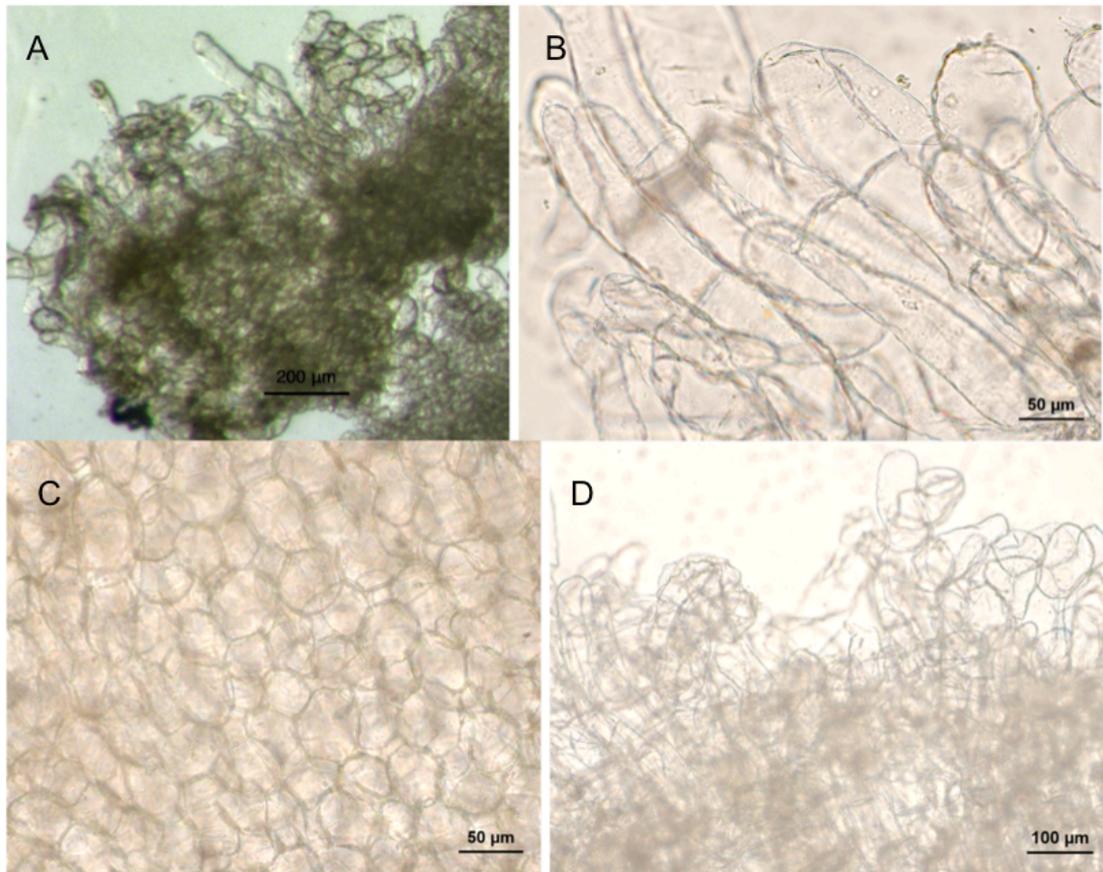


Figura 24. Calos de *D. macrophylla* observados no microscópio de luz 40X. A. Células dos calos B e D. Células alongadas da periferia C. Células esféricas.

Na periferia dos calos foram observadas células meristemáticas totalmente desdiferenciadas, o que concorda com as observações macroscópicas mencionadas anteriormente. As células meristemáticas são caracterizadas por possuírem um protoplasto capaz de se dividir e uma parede celular primária composta de celulose (EVANS, 2009). Com essa descrição anatômica, pode-se afirmar que os calos de *D. macrophylla* induzidos a partir de folhas, podem ser descritos como semifriáveis por não serem totalmente compostos de células desdiferenciadas.

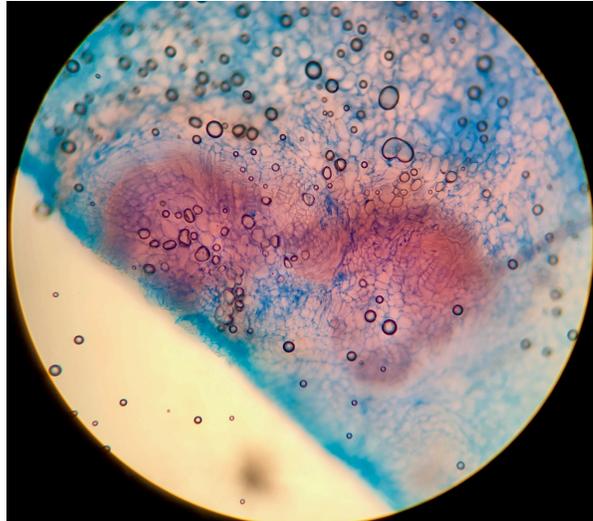


Figura 25. Calos de *D. macrophylla* corados com Azul de Astra e Safranina observados no microscópio de luz.

5.3 Curvas de crescimento

5.3.1 Curva de crescimento dos calos

Após a indução no meio 2 mg.L^{-1} de ANA + 2 mg.L^{-1} de BAP (TC-H), os calos foram repicados mais duas vezes a cada 30 dias no mesmo meio de cultura, e após isso, foram subcultivados pesando 0,7 g e inoculados em 25 mL de meio de cultura. A cada 3 dias foram retirados 3 calos aleatoriamente para serem pesados. Ao longo do tempo de crescimento, foi observado que os calos de *D. macrophylla* apresentaram uma consistência mais friável na sua superfície com o passar do tempo (Figura 26).

A obtenção de curvas de crescimento é importante para conhecer o comportamento das células ao longo do tempo de cultura, já que pode fornecer informações que servirão para a continuação dos estudos de uma espécie específica.

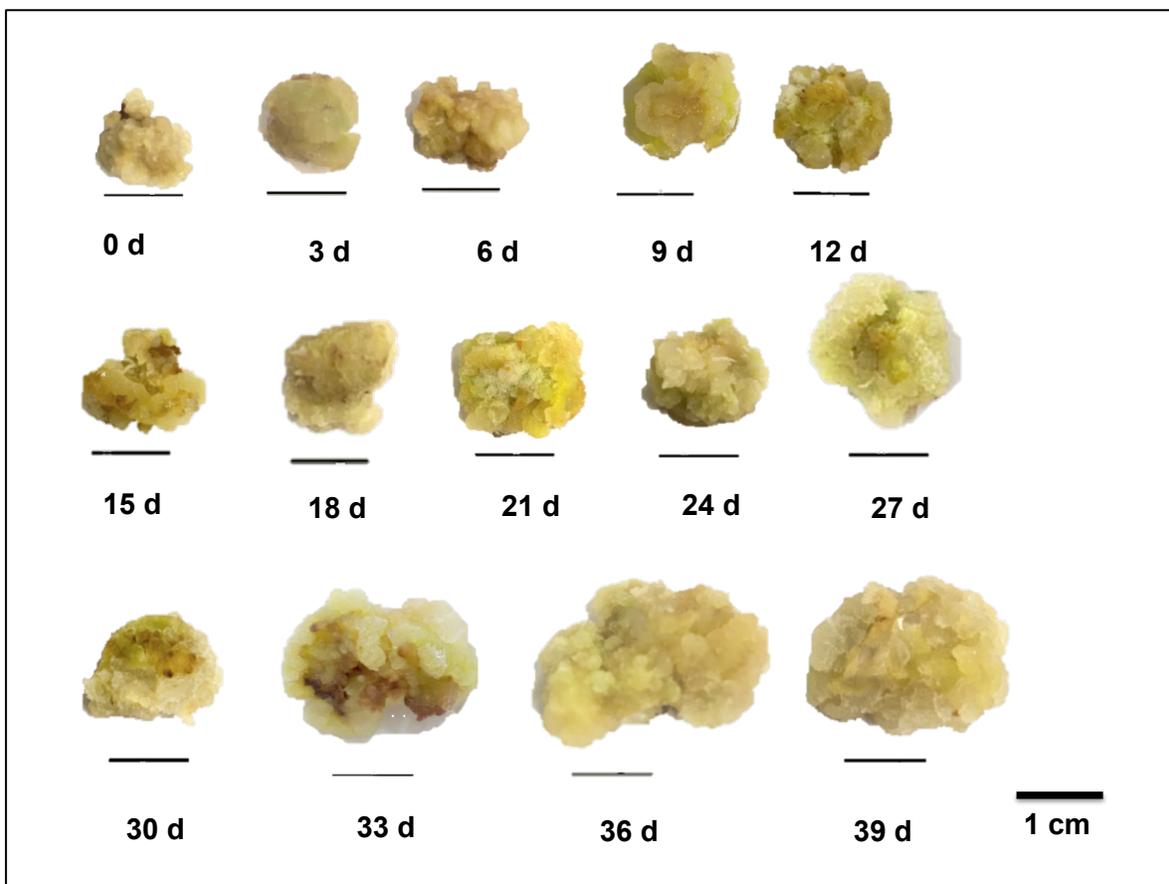


Figura 26. Calos semifriáveis do tratamento H (2 ANA + 2 BAP mg.L⁻¹) de *D. macrophylla* em diferentes dias da curva de crescimento.

Foram calculadas as médias estatísticas das massas fresca e seca obtidas dos calos ao longo do tempo de crescimento e foram ajustadas ao modelo de Gompertz com auxílio do software Statistica 7.0 (Tabela 15). O modelo pode se considerar adequados para a descrição da cinética de crescimento dos calos de *D. macrophylla*, já que os R² foram maiores a 90%.

Tabela 15. Constantes do modelo de Gompertz dos calos de *D. macrophylla*

Gompertz $Y=a*\exp(1-\exp(b-c*T))$				
	a	b	c	R ² (%)
Massa Fresca	0,267	0,938	0,055	96,5
Massa Seca	0,205	0,644	0,090	90,1

A partir do modelo foram obtidas as curvas de crescimento da massa fresca e seca. Foram colocados no gráfico as massas observadas no experimento (azul)

e na curva obtida com o modelo (vermelho) pode se observar que os dados não tiveram um desvio grande da curva obtida (Figura 16).

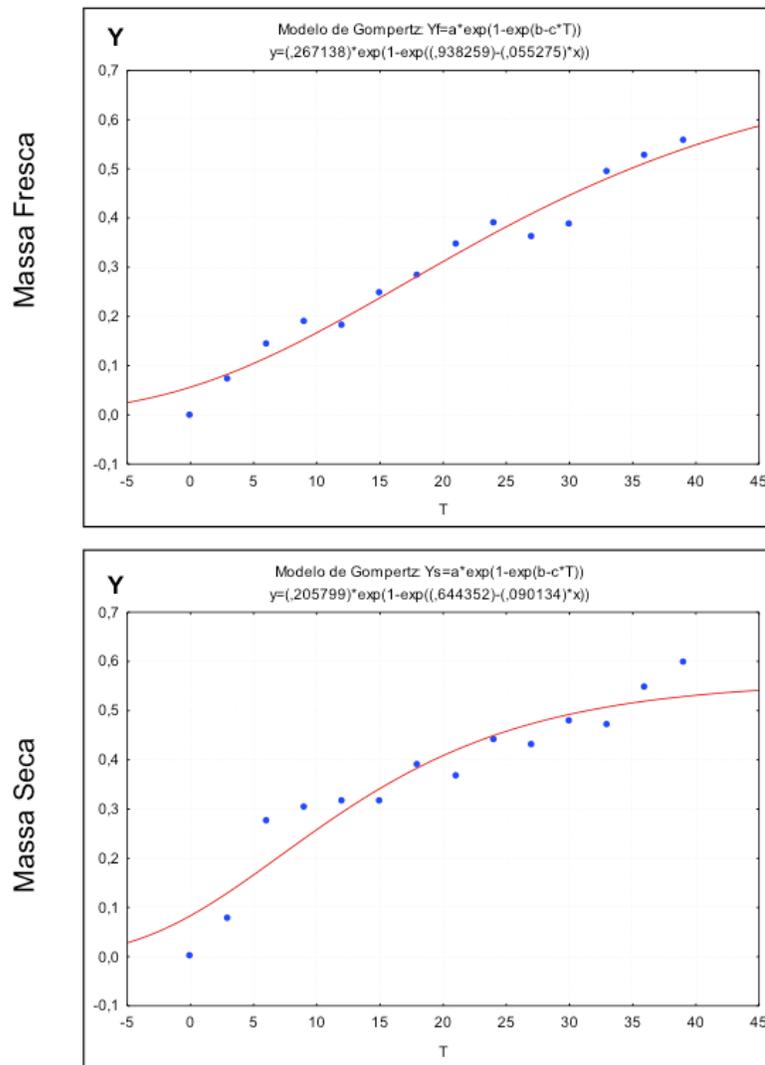


Tabela 16. Curvas de crescimento dos calos de *D. macrophylla* ajustadas ao modelo de Gompertz.

A partir do gráfico, se pode observar que a fase *lag* de crescimento foi quase imperceptível, já que um crescimento exponencial foi observado desde o primeiro dia. Dos dias 30 ao 33 foi observada uma massa de calo constante pelo que se pode inferir que os calos se encontravam na fase estacionária de crescimento, porém, no dia 36 teve um aumento de massa novamente até o dia 42 (término do experimento).

Esse tipo de comportamento é chamado de crescimento diáuxico e tem sido amplamente reportado em microrganismos, no entanto também foi comprovado em culturas de células vegetais (LEE; LEE, 1996). O crescimento diáuxico ocorre quando duas fontes diferentes de carbono estão presentes no meio de cultura e é exibido um crescimento bifásico exponencial das células. A primeira fase de crescimento ocorre quando as células usam uma fonte de carbono preferida, e a segunda fase de crescimento começa quando a fonte de carbono menos preferida é usada após a fonte de carbono preferida ter sido esgotada (CHU e BARNES, 2016). É provável que após o esgotamento da sacarose adicionada no meio de cultura, as células dos calos de *D. macrophylla* tenham utilizado outra fonte de carbono derivada do seu próprio metabolismo para continuar crescendo.

5.3.2 Estabelecimento e curva de crescimento das suspensões celulares

Foram inoculados calos de consistência friável para iniciar as suspensões celulares e incubados a 26 °C em ausência de luz (Figura 27a). Após 60 dias, as células não apresentaram um crescimento aparente, porém não tinham oxidado. Cada espécie requer condições específicas de crescimento, e a temperatura é um fator muito importante a ser considerado (EVANS, 2009), por isso a temperatura da plataforma *shaker* foi aumentada para 30 °C e após 30 dias as culturas começaram a formar aglomerados compactos de células (Figura 27b). As suspensões celulares de espécies da mesma família: *Morinda citrifolia* (ZENK; EL-SHAGI; SCHULTE, 1975), *Galium mollugo* (SIEWEKE e LEISTNER, 1992) e *Morinda elliptica* (ABDULLAH et al., 1998) também apresentaram um melhor crescimento celular a 30 °C.

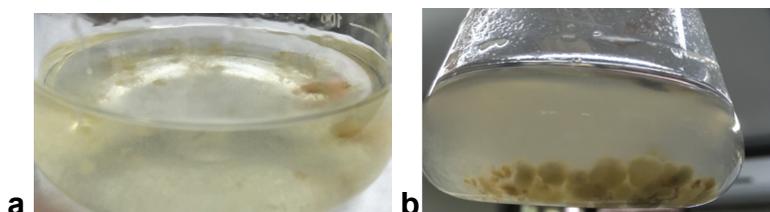


Figura 27. Suspensão celular de *D. macrophylla* A. Calo friável inoculado , B. Agregados celulares formados

Apesar dos calos inoculados para iniciar a suspensão de *D. macrophylla* serem de consistência friável, para o início do seu crescimento em meio líquido precisaram formar agregados compactos. A formação de agregados ou aglomerados em culturas de suspensão de células de plantas é muito comum, já que um certo grau de agregação celular é necessário para o crescimento celular (FRANKLIN e DIXON, 1994).

Antes de estudar a produção de metabólitos, é essencial deixar que as culturas celulares se estabilizem (MUSTAFA *et al*, 2011), por isso as culturas foram subcultivadas mais duas vezes a cada 30 dias para estabelecer a suspensão celular e aumentar a massa de células. Uma vez estabelecidas as suspensões celulares, foi realizada a curva de crescimento das mesmas inoculando 2 g de células em 100 mL e a cada 7 dias retiradas três para serem pesadas.

Foi observado que ao longo do tempo de crescimento, as suspensões começaram a crescer sem formar aglomerados e sua consistência era muito mais friável (Figura 28).

Foram calculadas as médias estatísticas das massas fresca e seca obtidas das células ao longo do tempo de crescimento e foram ajustadas ao modelo de Gompertz com auxílio do software Statistica 7.0 (Tabela 17). Os dados se ajustaram muito bem ao modelo e descreve quase em >98,5% à cinética de crescimento das células em suspensão de *D. macrophylla*.

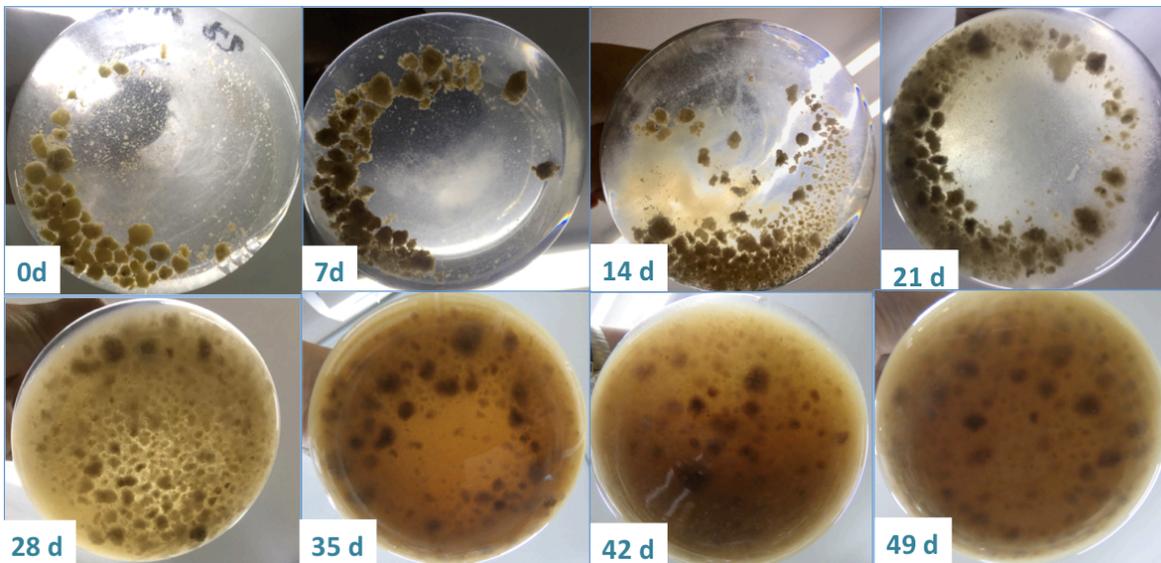


Figura 28. Suspensões celulares de *D. macrophylla* em diferentes dias da curva de crescimento.

Tabela 17. Constantes do modelo de Gompertz das suspensões de *D. macrophylla*.

Gompertz $Y=a*\exp(1-\exp(b-c*T))$				
	a	b	c	R ² (%)
Massa Fresca	0,433	2,120	0,118	98,5
Massa Seca	0,364	1,829	0,100	98,7

A partir do modelo foram obtidas as curvas de crescimento da massa fresca e seca, sendo colocados no gráfico os dados observados no experimento (azul) e a curva obtida com o modelo (vermelho), pode se observar que os dados se ajustam muito bem ao modelo (Figura 29). Isso é muito útil, já que a partir do modelo poderão se prever dados não coletados durante esse experimento como a massa produzida em um intervalo específico de tempo. Também podem se identificar as fases de crescimento que poderão servir para estabelecer o intervalo de tempo de subcultura com maior precisão.

Nos gráficos se pode observar que a fase *lag* se apresentou até o 8º dia de cultivo. Nessa fase o crescimento é lento porque as células estão sob o estresse da inoculação e adaptação ao novo ambiente e às novas condições nutricionais e fisiológicas (AL-KHAYRI, 2012).

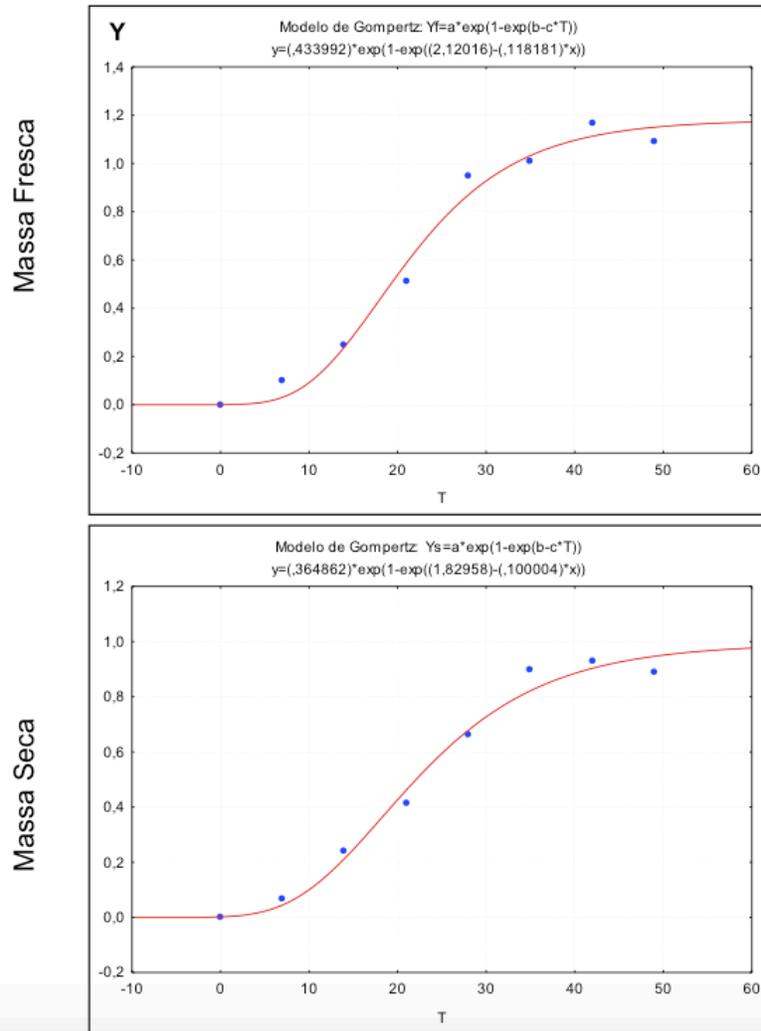


Figura 29. Curvas de crescimento das células em suspensão de *D. macrophylla* ajustadas ao modelo de Gompertz.

A fase exponencial se apresentou do 9º dia até o 25º dia aproximadamente, o qual permite estabelecer o tempo de subcultivo das suspensões celulares de *D. macrophylla* no 25º dia se o objetivo fosse a acumulação rápida de biomassa. Subcultivar as suspensões no final da fase de crescimento exponencial trará a maior produção de biomassa por unidade de tempo, e se a subcultura fosse realizada quando as células tivessem entrado na fase estacionária, resultaria em fases *lag* mais longas devido à menor viabilidade celular (MUSTAFA *et al.*, 2011).

A fase linear das suspensões ocorreu do 25º dia até o 35º dia, alcançando uma massa máxima de 29,4 g e após isso, se apresentou a fase estacionaria onde não houve mais crescimento celular. Vários trabalhos tem definido essas duas últimas fases do crescimento das células para realizar a elicitação para a produção de metabólitos secundários (XU e DONG, 2005; RAMANI e CHELLIAH, 2007), porém também pode ser realizada durante todo o período de crescimento das células (PATEL e KRISHNAMURTHY, 2013).

5.3.3 Parâmetros cinéticos

A partir das constantes obtidas do modelo de Gompertz das massas frescas, foram calculados os parâmetros cinéticos de cada tipo de cultura (Tabela 18). A velocidade máxima de crescimento das células em suspensão foi 3,3 vezes maior que a dos calos, e conseqüentemente as células em suspensão aumentaram até 13,7 vezes sua massa e os calos 2,6 vezes somente. Não é de surpreender que as células em suspensão apresentaram melhor crescimento que os calos cultivados em meio semissólido já que taxas de crescimento das células cultivadas em suspensão são geralmente maiores que taxas de crescimento em meio semissólido (ZULDIN *et al.*, 2013).

Tabela 18. Parâmetros cinéticos dos calos e das células em suspensão de *D. macrophylla*.

Parâmetros Cinéticos	Calos	Suspensão
μ_{max} (d ⁻¹)	0,015	0,05
λ (dia)	-1,116	9,4
G (dia)	4,9	3,7
I.C.	2,6	13,74

A partir da obtenção do parâmetro de tempo lag (λ), se pode confirmar o observado nos gráficos das curvas de ambas culturas, onde os calos não apresentaram fase *lag* de crescimento e as suspensões demoraram para começar a crescer 9,4 dias. Portanto, é provável que as células inoculadas para iniciar as

suspensões celulares da curva se encontravam na fase estacionária de crescimento, o que levou a um período longo de fase *lag* nas novas culturas.

Anteriormente foi estabelecido um sistema de células em suspensão da espécie *D. saccifera*, onde foi usado um calo completamente friável como inóculo e com crescimento vigoroso em meio líquido (BRILHANTE, 2018). Os parâmetros cinéticos dessa espécie foram melhores que os obtidos com a *D. macrophylla*, onde calo semifriável, com tendência a formar aglomerados, foi usado para o estabelecimento das culturas. Isto pode explicar porque as células de *D. macrophylla* que cresceram em agregados compactos tiveram um crescimento menor.

Alguns sistemas de células vegetais em suspensão de espécies da família Rubiaceae, que são fontes de metabólitos de interesse são resumidos na tabela 19. Comparando os índices de crescimento (I.C.) se pode considerar que crescimento das células em suspensão de *D. macrophylla* estabelecido nesse trabalho é intermediário.

Tabela 19. Parâmetros cinéticos de suspensões celulares de Rubiáceas

Espécie	Metabólito	I.C.	μ_{max} (d ⁻¹)	Referência
<i>Duroia macrophylla</i>	Iridoides	13,74	0,05	López-Vázquez (2019)
<i>Duroia saccifera</i>	-	17,45	0,219	Brilhante (2018)
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Emetina e Cefaelina	4,0	-	Jha <i>et al</i> (1991)
<i>Galium mollugo</i>	Antraquinonas	2,0	-	Sieweke e Leistner (1992)
<i>Oldenlandia affinis</i>	Kalata B1	31,52	0,38	Seydel e Dörnenburg (2006)
<i>Rubia tinctorum</i>	Antraquinonas	1,7-4,89	-	Busto <i>et al</i> (2013)
<i>Rudgea jasminoides</i>	Polissacáridos	5,0	-	Oliveira-Júnior <i>et al</i> (2010)

Apesar de não ter um alto índice de crescimento comparado com outras espécies, as suspensões celulares de *D. macrophylla* se apresentam como uma fonte promissora de obtenção de biomassa com parâmetros cinéticos considerados bons para a continuação de estudos com a espécie, inclusive

otimizar as condições de crescimento para alcançar maiores rendimentos de biomassa.

5.4 Melhoramento da formação de calo friável

Como já foi discutido anteriormente, a indução da formação de calos com consistência friável ajuda na otimização do crescimento em culturas em suspensão. Nos primeiros experimentos realizados, foi concluído que as concentrações de 2 ANA +2 BAP mg.L⁻¹ em meio MS mostraram melhores resultados na formação de calos friáveis, porém não em um 100 %.

Nos novos testes para o melhoramento da formação de calo friável foram mudadas as concentrações e níveis de reguladores de crescimento e de composição de meio de cultura. Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre eles ($p >0,05$), porém, foi possível observar que quando os níveis de ambos tipos de reguladores de crescimento são baixos (menos de 2 mg.L⁻¹), é obtida uma maior taxa de formação de calo friável e quando a concentração da auxina ANA é ligeiramente mais baixa em relação à citocinina BAP, também mostrou melhores resultados (Figura 30). A espécie *Morinda elliptica* (Rubiaceae) apresentou resultados similares no crescimento celular dos calos quando o meio MS foi usado em combinação com concentrações baixas de reguladores de crescimento (0,5 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de cinetina (KIN)) (ABDULLAH *et al*, 1998).

Os tratamentos C e D onde a concentração de BAP foi de 2 mg. L⁻¹ e de ANA 1 e 1,5 mg. L⁻¹ respectivamente foram observadas porcentagens de 85% de formação de calos friáveis, porém o tratamento D mostrou formação de calos de maior tamanho (Tabela 20). Isto representa 15% mais aos resultados obtidos nos primeiros experimentos com as concentrações de 2 mg.L⁻¹ de ANA + 2 mg.L⁻¹ de BAP. Ainda assim, os calos obtidos não foram de uma consistência 100% friável, porém ainda podem ser realizados mais experimentos para encontrar um melhor balanceamento entre os reguladores de crescimento auxinas e citocininas, já que

isso é o que determina o estado de diferenciação e desdiferenciação dos calos (SKOOG AND MILLER, 1957).

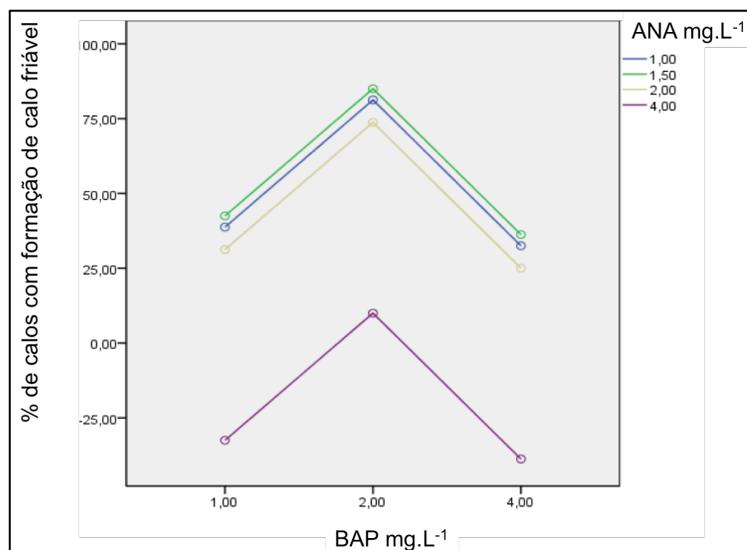


Figura 30. Gráfico de perfil em porcentagem de formação de calo friável em distintas concentrações de ANA e BAP.

Tabela 20. Porcentagem de tipos de calo formados nos tratamentos com ANA e BAP.

Tratamento	ANA (mg. L ⁻¹)	BAP (mg. L ⁻¹)	Formação de calo friável (%)	Calo grande (%)	Calo pequeno (%)	Calo com raiz (%)
A	2	1	35	35	0	65
B	1	1	35	25	10	65
C	1	2	85	40	45	10
D	1,5	2	85	85	0	10
E	4	2	10	0	10	35
F	2	2	70	60	10	20
G	2	4	25	10	15	15

Além dos reguladores de crescimento, a seleção de um meio de cultura adequado em relação às concentrações de nutrientes no meio de cultura é crucial para o crescimento das células vegetais (MURTHY; LEE; PAEK, 2014). Os tratamentos variando a composição do meio de cultura não apresentaram diferenças significativas na formação de calos friáveis ($p > 0,05$), porém, foi observado que os meios WPM (meio reduzido em nitrogênio) e o MS com redução do 50% do mesmo, promoveram o crescimento dos calos (Tabela 21). Um dos componentes mais importantes do meio basal é o nitrogênio, e existem espécies

que não requerem ou não toleram altas concentrações, como é o caso da espécie *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) que apresentou maior formação de calo friável quando o meio de cultura foi suplementado só com a metade das fontes de nitrogênio do meio MS (STELLA e BRAGA, 2002).

Tabela 21. Porcentagem de tipos de calo formados nos diferentes meios de cultura acrescidos com 2 ANA + 2 BAP (mg.L⁻¹).

Meio	Formação de calo friável (%)	Calo grande (%)	Calo pequeno (%)	Calo com raiz (%)
MS	70	65	15	20
MS (50 %)	75	60	15	10
WPM	90	85	10	15
B5	80	50	50	20
MS -50% NIT	80	80	0	20

Também foi possível notar que quando além do nitrogênio, os outros nutrientes estiveram presentes em menor quantidade no meio de cultura (nos meios B5 e MS com redução do 50% dos nutrientes) apresentaram um menor crescimento dos calos. Isto sugere que os calos de *D. macrophylla* não toleram altas concentrações de nitrogênio, o que impede seu crescimento, porém, todos os demais nutrientes são essenciais para o mesmo.

Ainda existem muitas variáveis que podem ser exploradas para otimizar a formação de calos friáveis de *D. macrophylla*. Por exemplo, mudando as fontes de carbono, as concentrações de outros nutrientes do meio (MURTHY; LEE; PAEK, 2014) e até usando outro tipo de explantes como segmentos nodais das plântulas (ARMIJOS-GONZÁLEZ e PÉREZ-RUIZ, 2016).

5.5 Caracterização histoquímica dos calos

Os calos corados com os distintos reagentes histoquímicos foram observados no microscópio de luz para verificar a presença dos metabólitos secundários respectivos.

Quando os calos foram corados com FeCl₃ foram observadas pequenas

manchas de coloração preta e marrom em todas as amostras (Figura 31), sendo que os calos tratados com AlCl_3 apresentaram uma coloração mais intensa e manchas maiores. Isto pode sugerir que com a exposição a esse elicitor os calos produzem maiores quantidades de substâncias fenólicas, porém seria necessário realizar um estudo mais aprofundado com mais amostras para comprovar essa afirmação.

Na coloração com o reagente de Wagner não foram encontradas colorações vermelho-acastanhadas, pelo qual não foi possível verificar a presença de substâncias nitrogenadas nos calos (Figura 32).

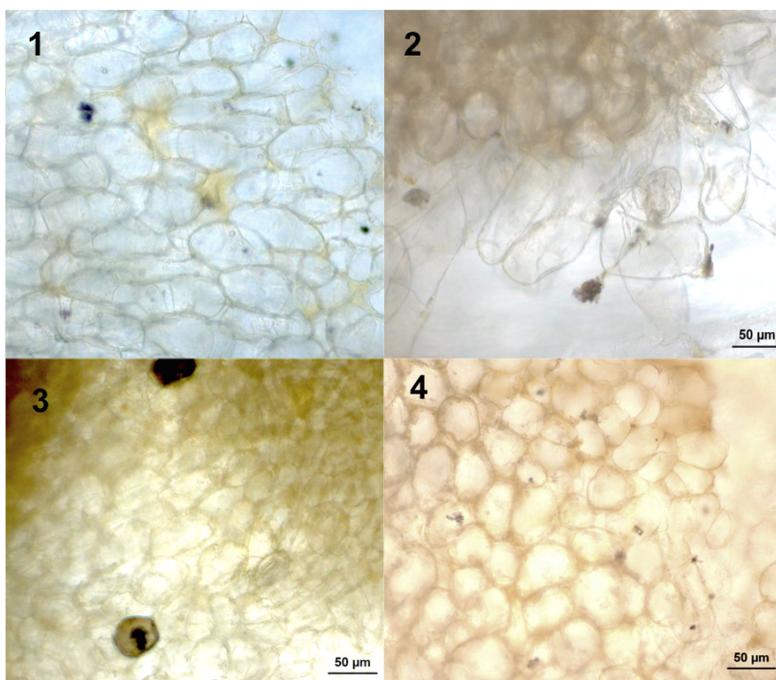


Figura 31. Calos de *D. macrophylla* corados com FeCl_3 observados no microscópio de luz. 1. Controle, 2. C. 50 mM KCl, 3. 0,15 mM AlCl_3 , 4. 50 mM NaCl.

Finalmente, quando os calos foram corados com H_2SO_4 foram observadas a corações laranjas e vermelho-acastanhadas em todas as amostras (Figura 33) Nos calos tratados com AlCl_3 foi observada uma coração mais intensa, o qual pode-se sugerir que nesse elicitor, os calos induzem a produção de terpenoides, p que foi corroborado pelas análises de RMN, de CCDC e quimiométricas, onde esta condição produziu mais quantidade do iridoide (monoterpeno).

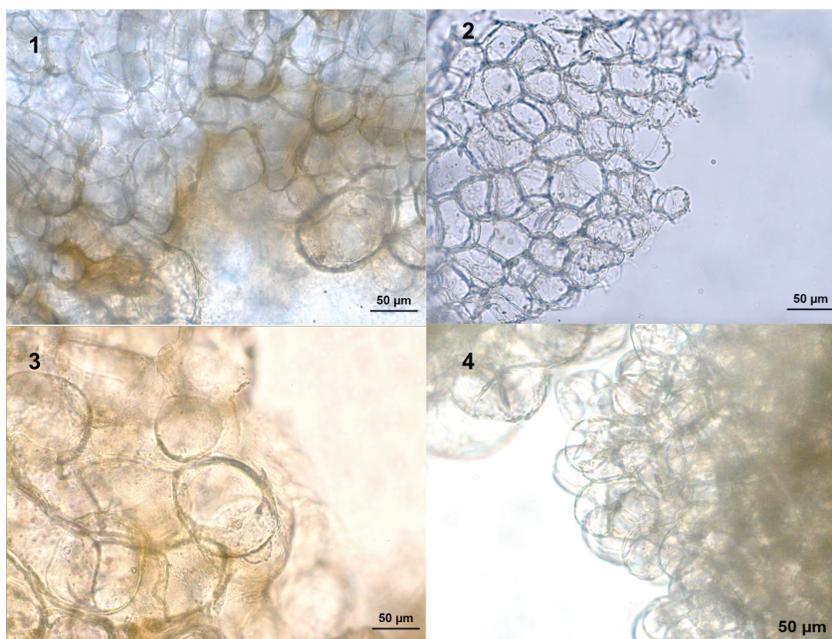


Figura 32. Calos de *D. macrophylla* corados com o reagente de Wagner observados no microscópio de luz. 1. Controle, 2. 50 mM KCl, 3. 0,15 mM AlCl₃, 4. 50 mM NaCl.

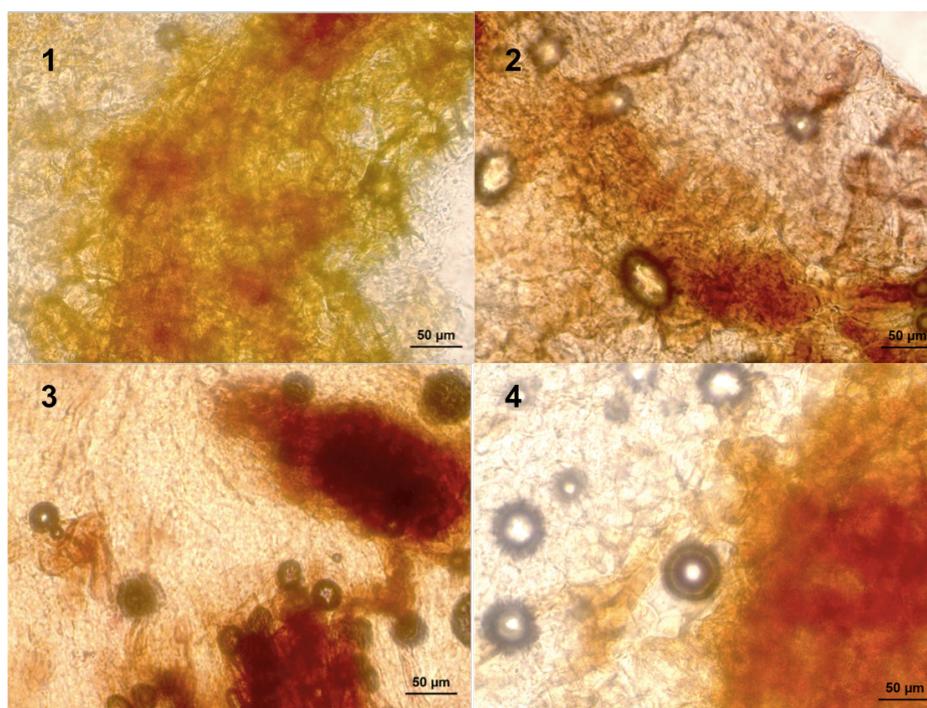


Figura 33. Calos de *D. macrophylla* corados com H₂SO₄ observados no microscópio de luz. 1. Controle, 2. 50 mM KCl, 3. 0,15 mM AlCl₃, 4. 50 mM NaCl.

Esses resultados são unicamente descritivos e não podem ser usados para realizar conclusões, porém, servem para obter um panorama geral das principais classes de metabólitos secundários presentes nos calos de *D. macrophylla*.

5.6 Análise fitoquímica dos extratos

A extração dos metabólitos presentes nos calos foi realizada de forma padronizada, usando metanol na proporção de 1:15 g/mL (massa amostra/volume de solvente) e repetindo a extração por 4 vezes, usando banho de ultrassom por 20 minutos em cada extração.

5.6.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

5.6.1.1 Microextratos do teste de germinação

Os extratos provenientes do teste de germinação foram aplicados na mesma concentração nas cromatoplaças de sílica. Foram observadas manchas nas CCDC quando reveladas na luz UV₃₆₅ indicando a presença de grupos cromóforos e quando observadas na luz UV₂₅₄, em todos os extratos com exceção do extrato dos tegumentos, foi observada uma mancha preta no Rf = 0,36, essa mesma mancha apareceu em cor azul intenso quando a placa foi revelada com anisaldeído sulfúrico o que indicou a presença de iridoides (Figura 34). Os iridoides são conhecidos por serem muito sensíveis quando tratados com reagentes ácidos, o qual hidrolisa ligações glicosídicas e decompõe a estrutura dando produtos de coloração azul (ZGÓRKA, 2008). Esse iridoide foi observado em maior concentração nas sementes e todas as partes das plântulas germinadas no viveiro (Figura 34B e C). Os extratos das plântulas germinadas *in vitro* também tiveram a presença do iridoide, porém em menores concentrações.

Alguns iridoides já foram isolados de outra espécie do gênero, a *Duroia hirsuta* (PAGE; MADRINAN; TOWERS, 1994), porém é a primeira vez que há indícios da presença de iridoides na espécie *D. macrophylla*, e também que uma

análise fitoquímica é realizada com plântulas germinadas *in vitro*. A tribo Ixoroidae, à qual pertence a espécie, tem os iridoídeos como marcadores quimiotaxonômicos (MARTINS e NUNEZ, 2015), pelo qual não é de surpreender ter encontrado a presença dessa classe química nos extratos.

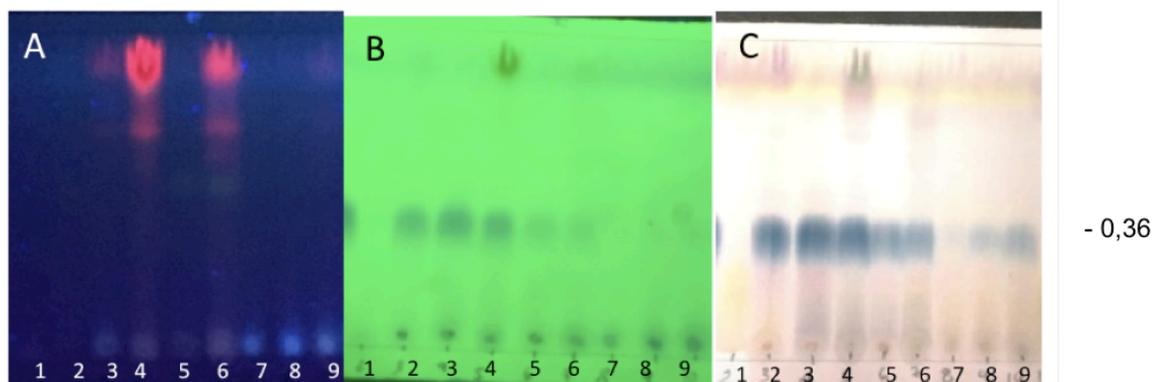


Figura 34. CCDC dos microextratos dos testes de germinação. Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2. A) UV₃₆₅, B) UV₂₅₄, C) Anisaldeído sulfúrico. Extratos MeOH: 1. Tegumento, 2. Semente, 3. Caule, 4. Folhas viveiro, 5. Raízes viveiro 6. Planta completa viveiro, 7. Plântulas *in vitro* estágio 1, 8. Estágio 2, 9. Estágio 3.

É importante destacar que esse mesmo iridoide se apresentou desde o estágio embrionário da plântula (semente) até a formação de plântulas. Estes metabólitos podem servir a uma variedade de papéis adaptativos na dispersão de sementes ou como uma defesa contra predadores de sementes não dispersantes ou patógenos (WHITEHEAD; TIRAMANI; BOWERS, 2016). Os iridoídeos têm sido relatados por serem substâncias de defesa geral e por apresentarem efeito tóxico pós-ingestão em predadores (BIERE; MARAK; VAN DAMME, 2004). Beckman (2013) explica que toxicidade de folhas jovens e sementes causada pelos metabólitos secundários possuem valor adaptativo e são importantes na evolução das espécies.

A biossíntese de metabólitos secundários geralmente ocorre em órgãos e tecidos específicos e é frequentemente restrita a uma etapa do desenvolvimento da planta (HARTMAN, 1996), a qual pode influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas das substâncias (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Muitos metabólitos secundários são sintetizados e se acumulam nos tecidos jovens em desenvolvimento, particularmente nas

folhas, ou em tecidos produtivos, bem como em flores e sementes. Estes proporcionam proteção aos tecidos jovens, tornando-se menos abundantes e importantes conforme os tecidos envelhecem (BENNET e WALLSGROVE, 1994). Isto pode explicar porque não se tinha relatado anteriormente a presença de iridoides nos estudos fitoquímicos com indivíduos adultos de *D. macrophylla* (MARTIS, 2014; NUNEZ, 2009).

5.6.1.2 Calos e suspensões

Os extratos metanólicos dos calos e suspensões de *D. macrophylla* que se encontravam no 30º e 28º dia, respectivamente, após seu subcultivo, também foram analisados por CCDC, foram aplicados na mesma concentração nas cromatoplasas de sílica (Figura 35). Foram observadas manchas nas CCDC quando reveladas na luz UV₃₆₅ indicando a presença de substâncias com duplas ligações.

No Rf = 0,1 nas CCDC ao serem reveladas com FeCl₃, apresentaram manchas cor marrom em ambos extratos, o que podem indicar a presença de substâncias fenólicas. Nesse mesmo local da placa foram observadas na luz UV₃₆₅ fluorescências azuis quando reveladas com NP/PEG e manchas verde-amareladas no Rf = 0,32 quando reveladas com KOH, o que poderia indicar a presença de substâncias fenólicas. Indícios de substâncias fenólicas com atividade antioxidante nos extratos de *D. macrophylla* foram relatados anteriormente (MARTINS *et al.*, 2014). Na família Rubiaceae, muitas substâncias fenólicas como antraquinonas e flavonoides tem sido produzidas em culturas de calos e suspensões vegetais. As espécies *Galium mollugo* e *G. uliginosum* foram relatadas como produtoras de antraquinonas em células em suspensão na ausência de luz (LEDÜC; RUHNAU; LEISTNER, 1991) e em cultura de calos das espécies *Anthocephalus indicus* (INDU *et al.*, 2013) e *Uncaria elliptica* (LAW e DAS, 1989) foi relatada a produção de flavonoides.

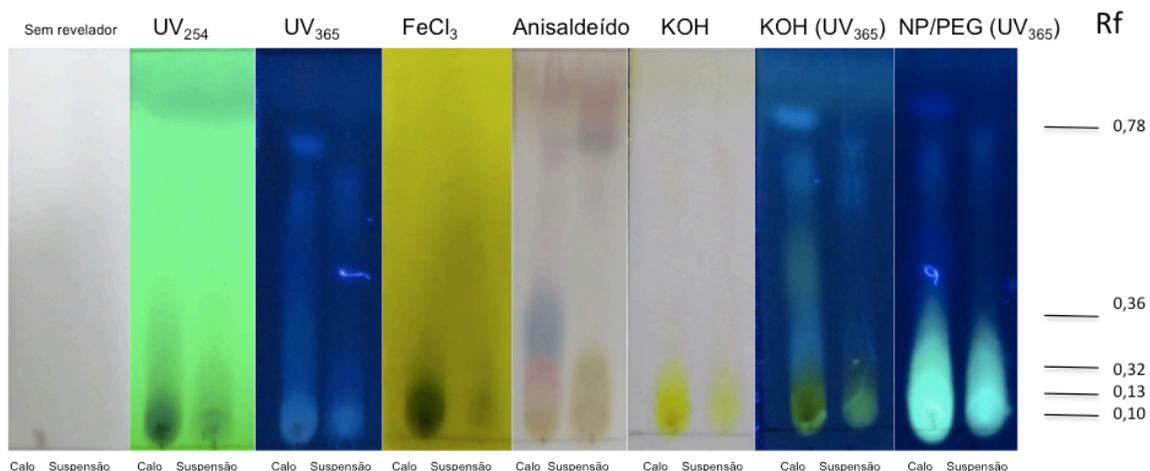


Figura 35. CCDC dos extratos de culturas *in vitro* de *D. macrophylla*. Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2.

Quando a placa foi revelada com anisalaldeído sulfúrico foi possível observar a possível presença de substâncias fenólicas antes mencionadas, foi observada uma coração verde/marrom. Também apresentaram manchas cor púrpura e roxas no extrato das suspensões ($R_f = 0,78$) que pode indicar a presença de terpenos e uma mancha rosa no extrato dos calos ($R_f = 0,13$) o que pode indicar a presença de esteroides. A presença de terpenos nos extratos dos calos de *D. macrophylla* foi relatada anteriormente (ZANCA, 2015; TANATA, 2017) e de terpenos e esteroides nos extratos dos calos de *D. saccifera* (SOUZA, 2016; BRILHANTE, 2018).

Também foi observada uma mancha azul no extrato dos calos ($R_f = 0,36$) o que indicou a presença do mesmo iridoide produzido pelas plântulas e sementes. No entanto, essa mancha não apareceu no extrato das suspensões. Esses resultados indicam que os iridoide podem ser produzidos tanto em tecidos diferenciados (plântulas) e nas sementes, assim como em células desdiferenciadas de calos de *D. macrophylla*. Foi relatada a produção de iridoide em culturas *in vitro* de calos e suspensões das espécies da família Rubiaceae, *Gardenia jasmonides* (NAGATOSHI *et al.*, 2011) e *Genipa americana* (UEDA; IWAHASHI; TOKUDA, 1991).

5.6.1.3 Curvas de crescimento

Os extratos metanólicos dos diferentes dias da curva de crescimento dos calos foram aplicados na mesma concentração nas cromatoplaças de sílica, e revelados com anisaldeído sulfúrico para observar a produção do iridoide ($R_f = 0,36$) durante as etapas de crescimento das culturas. Entre os dias 30 a 36, nas fases exponencial-linear foi observada uma maior concentração do iridoide (azul) (Figura 36) o qual foi comprovado mediante RMN de ^1H e será apresentado mais na frente.

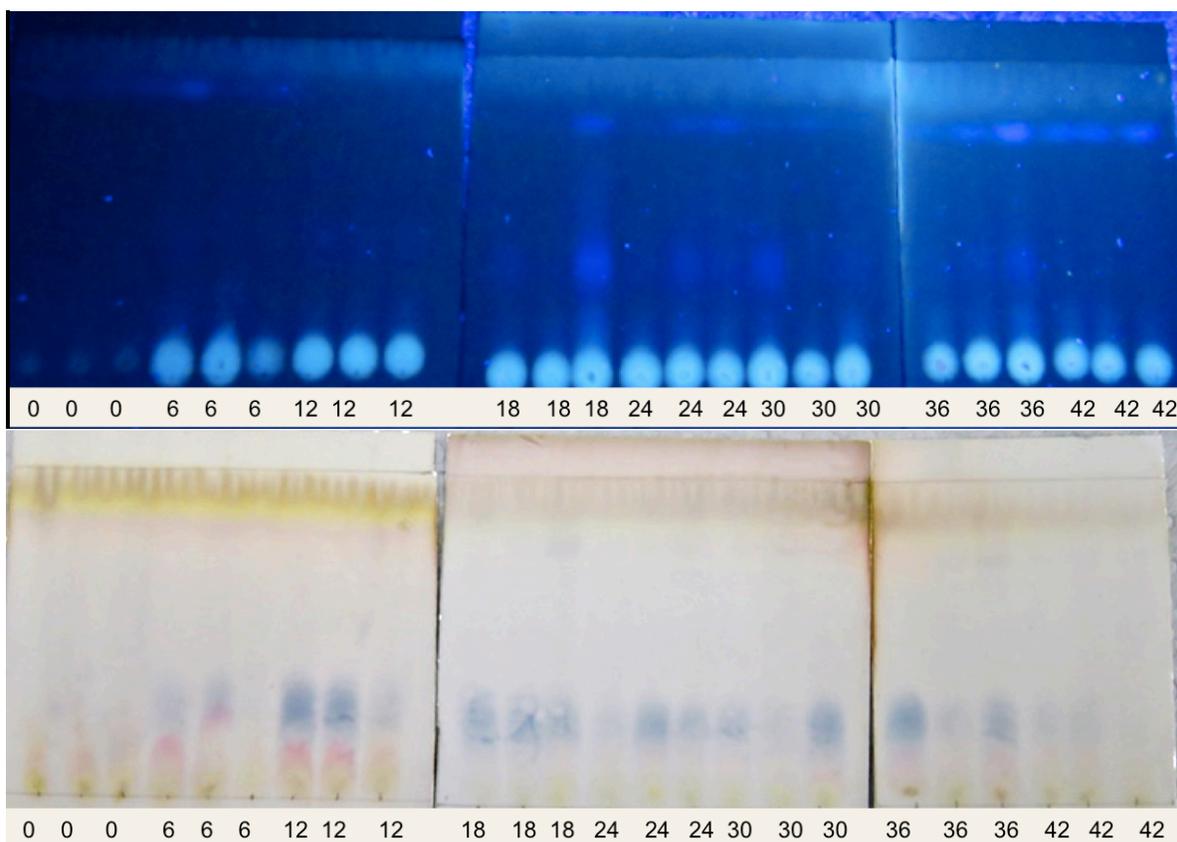


Figura 36. Placas CCDC observadas em lux UV₃₆₅ e reveladas com anisaldeído sulfúrico das triplicatas de distintos tempos de cultura dos calos de *D. macrophylla*. Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2.

Os extratos metanólicos dos diferentes dias da curva de crescimento das suspensões celulares também foram aplicados na mesma concentração nas cromatoplaças de sílica e revelados com anisaldeído sulfúrico. No período de 28 a

35 dias da fase exponencial-linear foi observada uma maior concentração de metabólitos secundários, após esse período a concentração diminuiu (Figura 37).

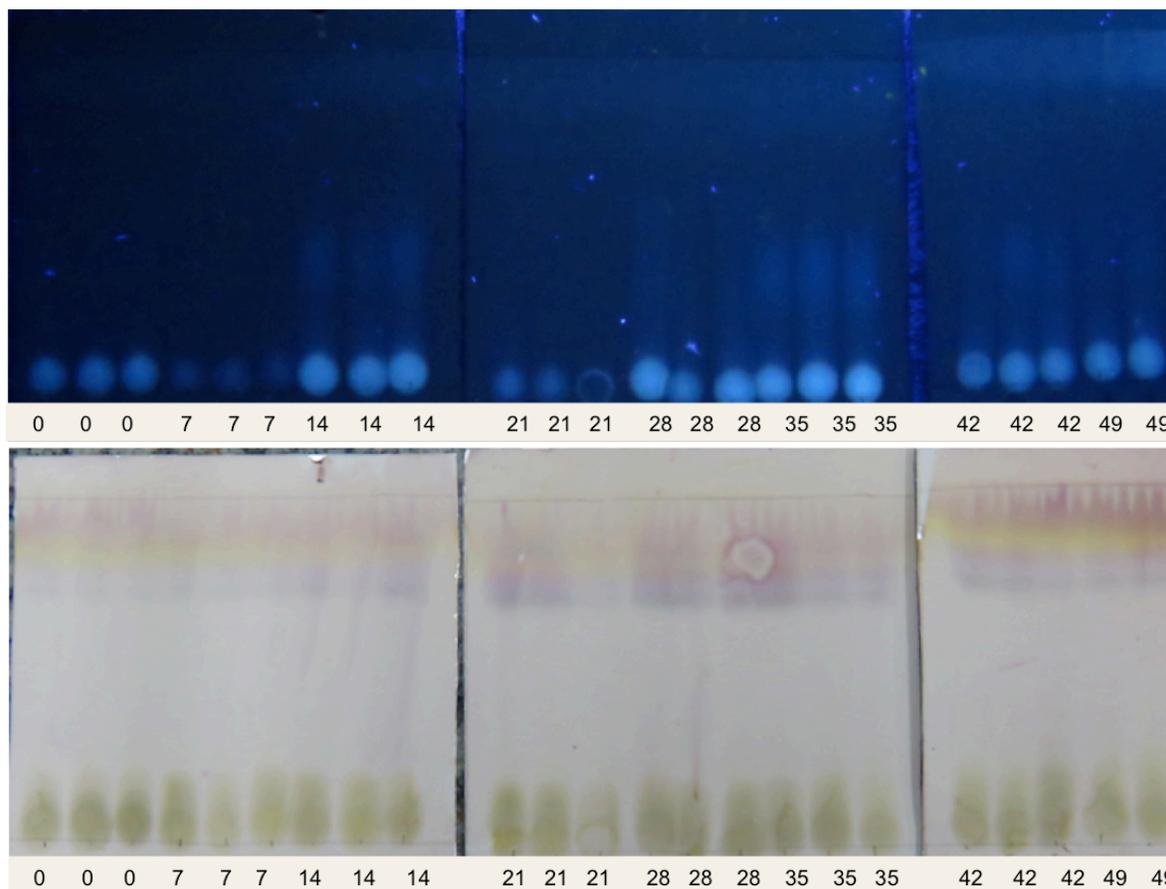


Figura 37. Placas CCDC observadas em lux UV365 e reveladas com anisaldeído sulfúrico das triplicatas de distintos tempos de cultura das suspensões celulares de *D. macrophylla*. Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2.

5.6.1.4 Calos elicitados

Os tratamentos de elicitação dos calos foram realizados 33 dias após seu subcultivo. Todas as triplicatas dos tratamentos de elicitação dos calos foram analisadas por CCDC e aplicadas na mesma concentração nas cromatoplasmas de sílica (Figura 38). As CCDC permitiram comparar qualitativamente as concentrações de metabólitos nos calos em cada tratamento de elicitação.

Quando as placas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico foi observado que a mancha azul pertencente ao iridoide foi mais intensa em alguns tratamentos que em outros comparados com os calos do controle que não foram expostos a

nenhum tratamento de elicitação (Figura 39). Em geral foi possível observar que alguns tratamentos com NaCl, KCl, ABA e UV inibiram a produção do iridoide, no entanto, os calos tratados com AlCl₃ e SNP promoveram a produção do mesmo. Isso também foi observado na luz UV₂₅₄ onde manchas mais escuras se apresentaram no local onde se encontrava o iridoide nas CCDC, o que sugeriu que uma quantidade maior de massa do iridoide foi produzida quando esses tratamentos foram usados.

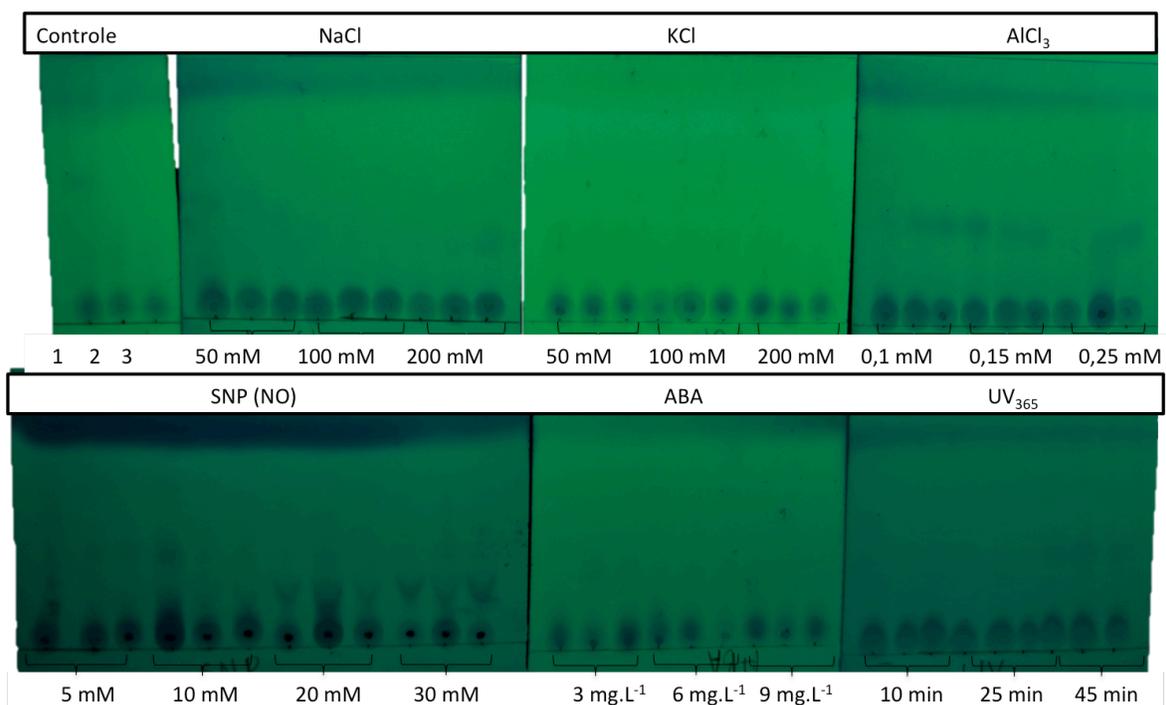


Figura 38. Placas de CCDC observadas na luz UV₂₅₄ dos extratos dos calos de *D. macrophylla* tratados com diferentes elicitores. Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2.

Ao serem observadas na luz UV₃₆₅, foi possível observar que nas CCDC dos calos tratados com SNP (NO), foram observadas mais bandas ao longo da placa as quais não foram observadas nos outros tratamentos.

Todas as triplicatas de cada tratamento foram analisadas unicamente por CCDC e a caracterização por RMN de ¹H foi realizada só com uma delas.

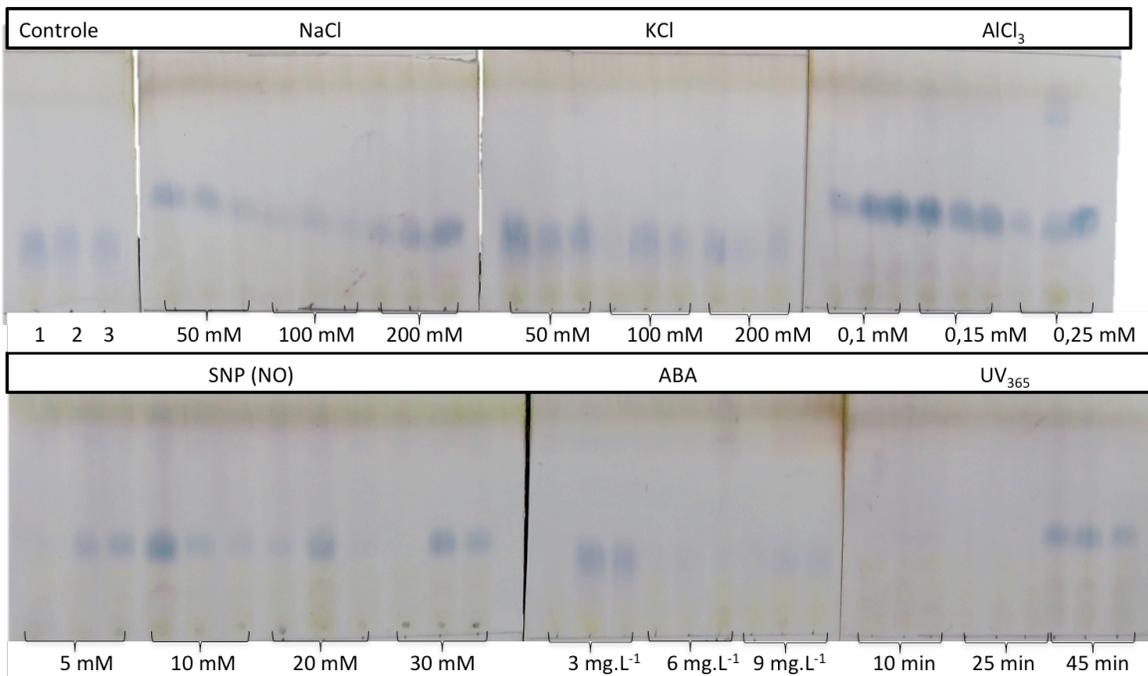


Figura 39. Placas de CCDC reveladas com anisalaldeído sulfúrico dos extratos dos calos de *D. macrophylla* tratados com diferentes elicitores. Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2.

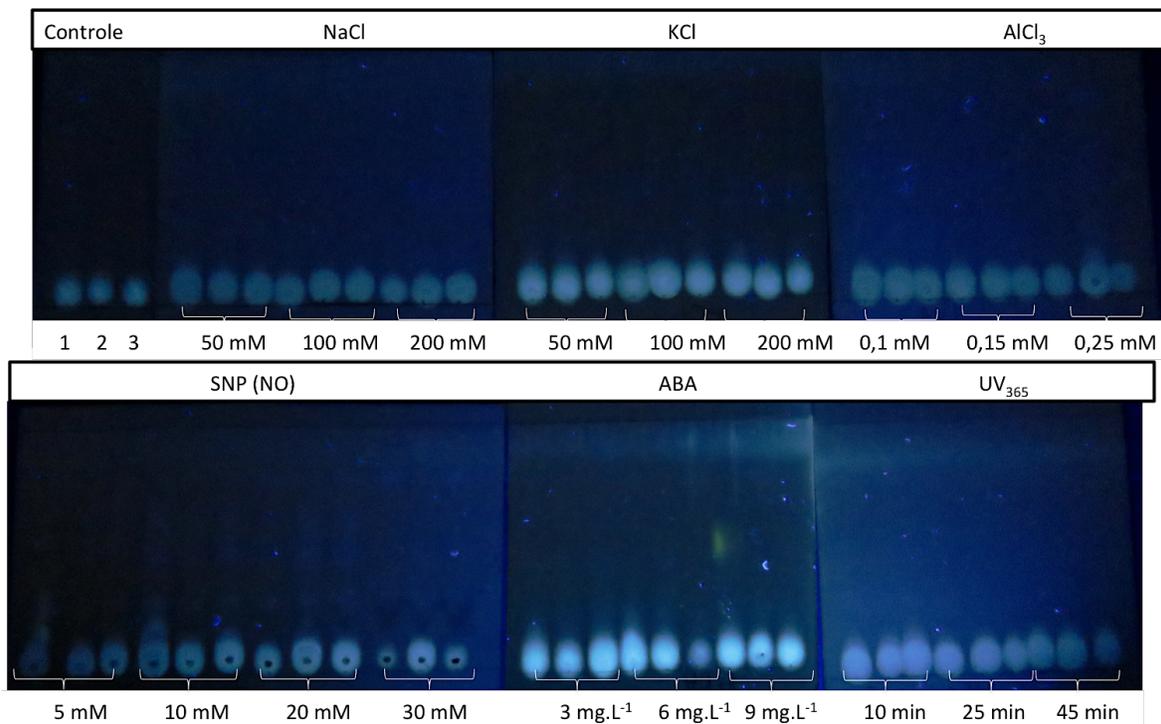


Figura 40. Placas de CCDC observadas na luz UV₃₆₅ dos extratos dos calos de *D. macrophylla* tratados com diferentes elicitores. Sistema de eluição AcOEt/MeOH 8:2.

5.6.2. Fracionamento do extrato dos Calos

O extrato metanólico dos calos de *D. macrophylla* (255 mg), foi fracionado primeiramente usando uma Coluna empacotada com Sephadex LH-20 (d=1,5 cm), da qual foram obtidas 10 frações. As frações foram analisadas por CCDC (Figura 41), a tabela 22 resume os sistemas de eluição usados e as classes químicas reveladas.

Tabela 22. Análise em CCDC das frações obtidas da coluna 1 (Sephadex LH-20).

Fração	Sistema de eluição	Revelador	Classe química
1-3	AcOEt/MeOH 8:2	Anisaldeído	Terpenos, Esteroides
4-5	AcOEt/MeOH 8:2	Anisaldeído	Terpenos Iridoídes
		FeCl ₃	Substâncias fenólicas
6-10	AcOEt/MeOH/H ₂ O 9:1:1	FeCl ₃	Substâncias fenólicas
		NP/PEG	Substâncias fenólicas

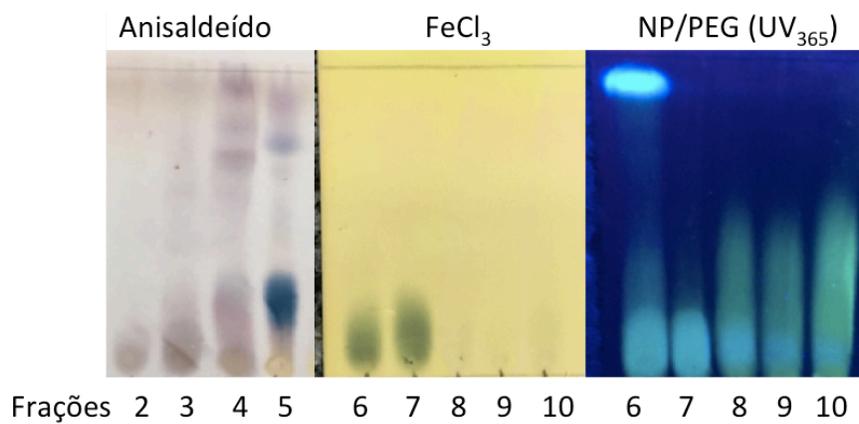


Figura 41. Placas de CCDC das frações da coluna 1 (Sephadex LH-20).

As frações 4 e 5 que tiveram os indícios da presença de um iridoide quando reveladas com anisaldeído, foram reunidas e refractionadas (155 mg) em uma coluna de SiO₂ (d= 1,3 cm). Dessa coluna foram obtidas 24 frações, porém só foram analisadas por CCDC as primeiras 5 frações (Tabela 23) já que a substância de interesse foi encontrada nas frações 3, 4 e 5 e as outras foram reservadas para a análise posterior.

Tabela 23. Análise das frações da coluna 2 de SiO₂ por CCDP.

Fração	Sistema de eluição	Revelador	Classe química
1-2	CHCl ₃ /MeOH 7:3	Anisaldeído	-
3	CHCl ₃ /MeOH 7:3	Anisaldeído	Iridoide
4-5	CHCl ₃ /MeOH 7:3	Anisaldeído	Iridoide

As frações 3 e 4-5 que continham os indícios de iridoides, foram analisadas por LC-MS e 4-5 por RMN de ¹H para verificar seu grau de pureza, porém as mesmas frações tiveram que ser reunidas e refractionadas por CCDP (22 mg). Para realizar a CCDP foi usado o sistema de eluição CHCl₃/MeOH 7:3 e eluída uma vez. Foram separadas 6 frações (Figura 42), a fração 3 que continha o iridoide (10 mg) foi analisada por LC-MS para verificar seu grau de pureza, no entanto, ainda se encontrava em mistura com pelo menos duas substâncias mais, pelo qual foi realizada a purificação mediante o uso de CLAE.

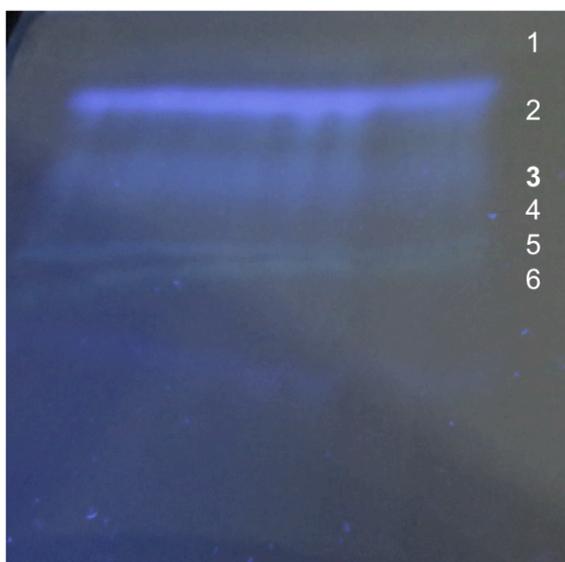


Figura 42. Placa de CCDP das frações 3-5 da coluna 2 de SiO₂ observadas na luz UV₃₆₅.

A fração 6 proveniente da purificação por CLAE continha a substância isolada, denominada **Substância I**. De 255 mg de extrato metanólico dos calos de

D. macrophylla que não foram expostos a nenhum tratamento de elicitação foram obtidos 1 mg da Substância I tendo um rendimento de 0,39 % (Tabela 24).

Tabela 24. Rendimentos do fracionamento dos calos de *D. macrophylla*.

Peso fresco (g)	Peso seco (mg)	Peso extrato (mg)	Rendimento extrato (%)	Substância I (mg)	Rendimento Substância (%)
8,64	740	255	34,4	1	0,39

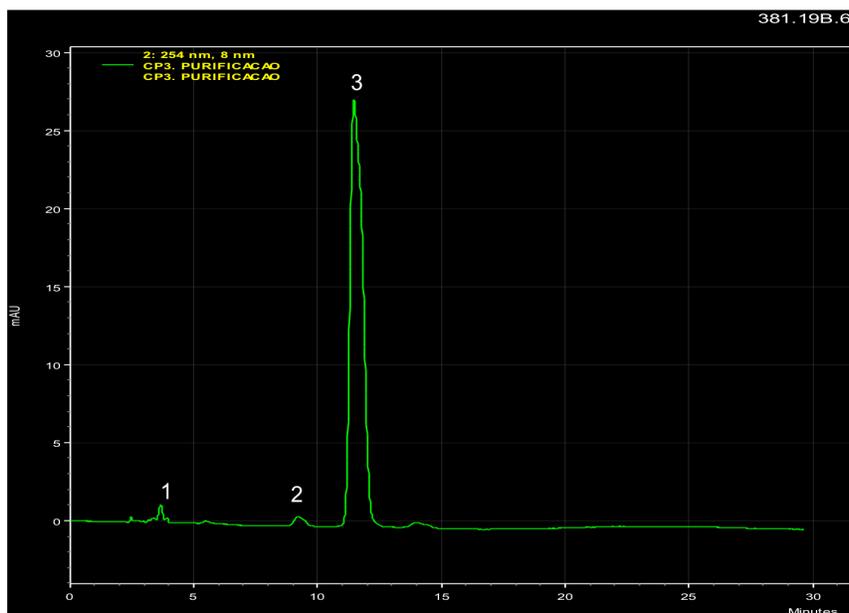


Figura 43. Cromatograma de purificação por CLAE da fração 3 obtida da CCDP (H₂O/MeOH 80:20).

O processo de fracionamento do extrato metanólico dos calos está apresentado no fluxograma da Figura 44.

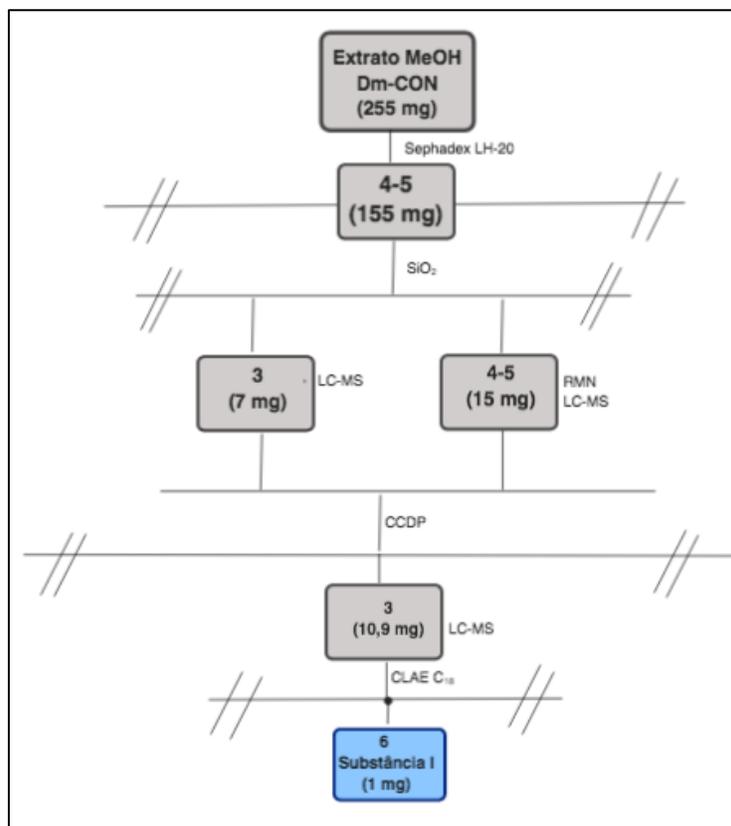


Figura 44. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato metanólico dos calos de *D. macrophylla*.

5.6.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

5.6.2.1 Elucidação da substância I

A substância I foi analisada por RMN de ^1H (Figura 45) e foram identificados alguns dos sinais dos hidrogênios pertencentes ao esqueleto da molécula (Tabela 25). A substância ainda se encontra em processo de elucidação, porém foi possível concluir que se trata de um iridoide glicosilado, já que conta com deslocamentos químicos característicos dessa classe química de metabólitos secundários (DINDA; CHOWDHURY; MOHANTA, 2009; DINDA; DEBNATH; BANIK, 2011; DINDA; DEBNATH; HARIGAYA, 2007a, 2007b; EL-NAGGAR e BEAL, 1980; DAMTOFT *et al.*, 1981) além de revelar em cor azul nas CCDC reveladas com anisaldeído sulfúrico (ZGÓRKA, 2008).

Tabela 25. Deslocamentos dos sinais do hidrogênio da substância I

^1H	δ ppm
1	5,68 dd ($J = 1,8; 1,5$ Hz)
3	7,3 d ($J = 1,5$ Hz)
5	2,93 m
6	3,4 s
7	5,98 dd ($J = 6,0; 2,8$ Hz)
8	5,67 dd ($J = 6,0 1,6$ Hz)
9	2,44 dd ($J = 9,0; 1,6$)
1'	4,44 d ($J = 7,92$ Hz)

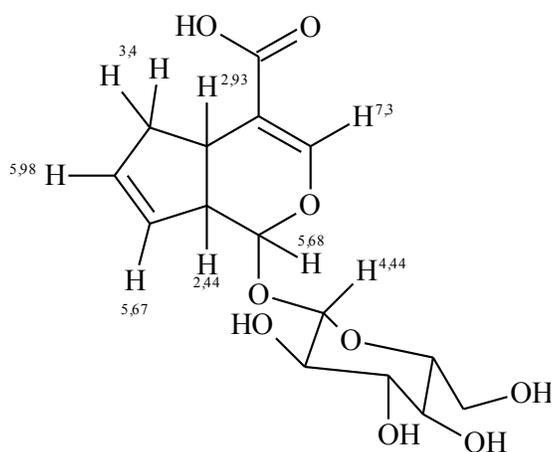


Figura 45. Proposta do esqueleto da Substância I com alguns dos deslocamentos químicos identificados.

5.6.2.2 Microextratos das plântulas e sementes

Os extratos do material vegetal usado nos testes de germinação *in vitro* bem como as partes das plântulas germinadas no viveiro foram analisadas para identificar possíveis sinais de interesse (Figura 46) .

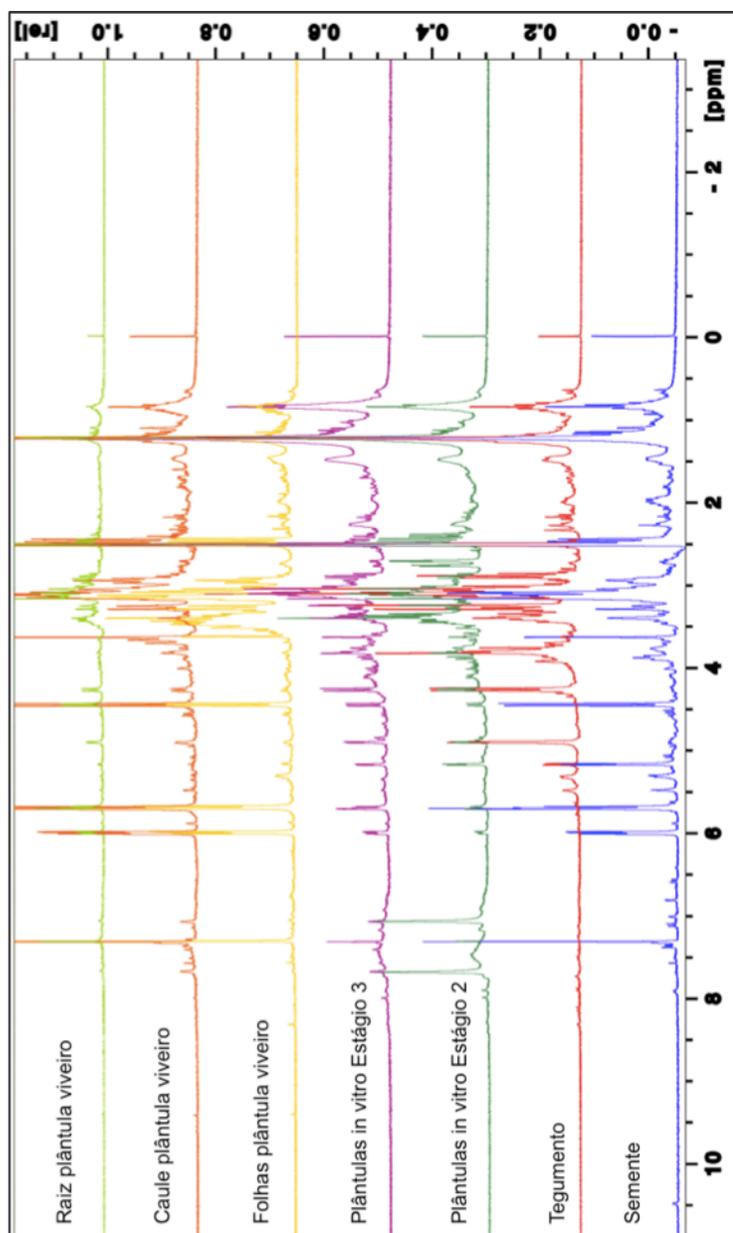


Figura 46. Espectros de RMN de ^1H de diferentes extratos metanólicos de *D. macrophylla*.

Foi verificado que todos os extratos, com exceção dos tegumentos, apresentaram os sinais pertencentes ao iridoide isolado do extrato dos calos. Como foi analisada a mesma massa de extratos diluída no mesmo volume de solvente foi possível comparar os espectros em termos de concentração. Como pode ser observado na Figura 47, as sementes e as plântulas germinadas no viveiro apresentaram maior intensidade de sinais nos deslocamentos do iridoide (δ_{H} 7,3 e 5,98) o qual concorda com os resultados observados nas CCDC quando

revelados com anisaldeído sulfúrico onde a mancha azul pertencente à substância foi mais intensa. Com base nessas informações, esse resultado era esperado, já que as plântulas germinadas *ex vitro* se encontravam expostas a estresses que as induzem a produzir maiores teores de metabólitos secundários (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

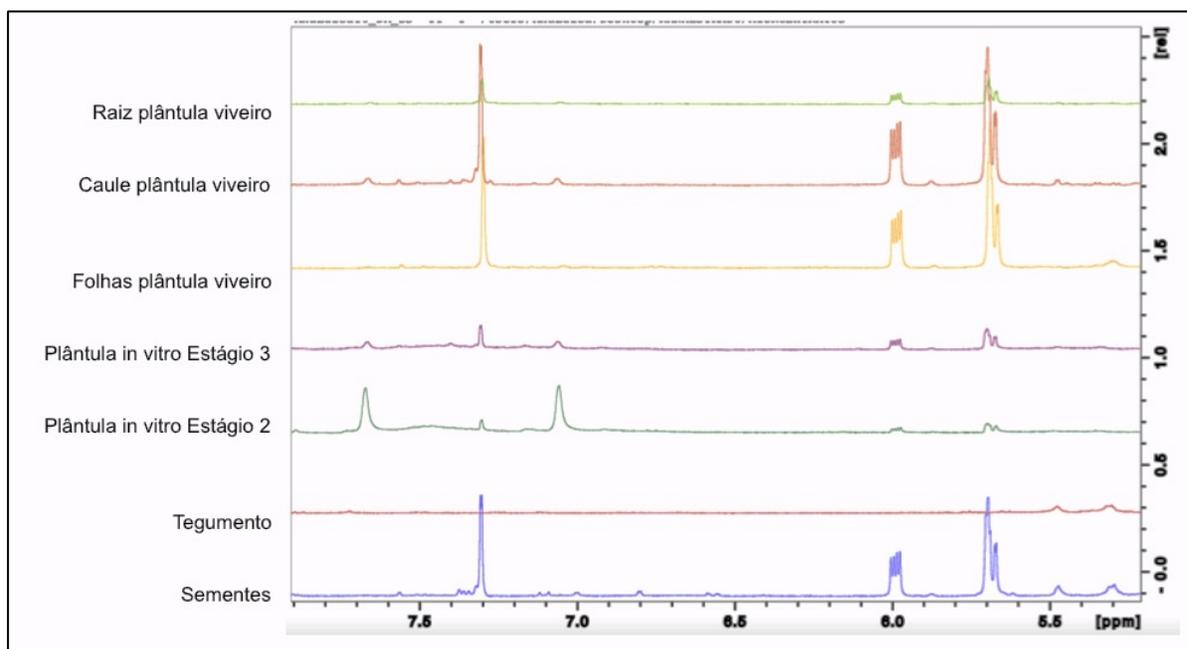


Figura 47. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H na região entre δ_{H} 5-8 de diferentes extratos de *D. macrophylla*.

Um padrão interessante foi observado nesses espectros: quando a concentração do iridoide (a intensidade dos sinais) no extrato foi mais alta, foi possível observar sinais na região de δ_{H} 8 a 10,5 os quais são característicos de hidrogênios ligados a nitrogênio (Figura 48). Isso pode indicar que o teor do iridoide influencia na produção de alcaloides, o qual é explicado mais a frente pelas análises quimiométricas. Os extratos das folhas, do caule e das raízes apresentaram um sinal em δ_{H} 9,4, o caule foi o único a apresentar também um sinal em δ_{H} 8,3 e as sementes apresentaram um sinal em δ_{H} 10,5. Sinais nesses deslocamentos químicos foram encontrados em alguns dos alcaloides isolados dos galhos de indivíduos adultos de *D. macrophylla* por Martins (2014).

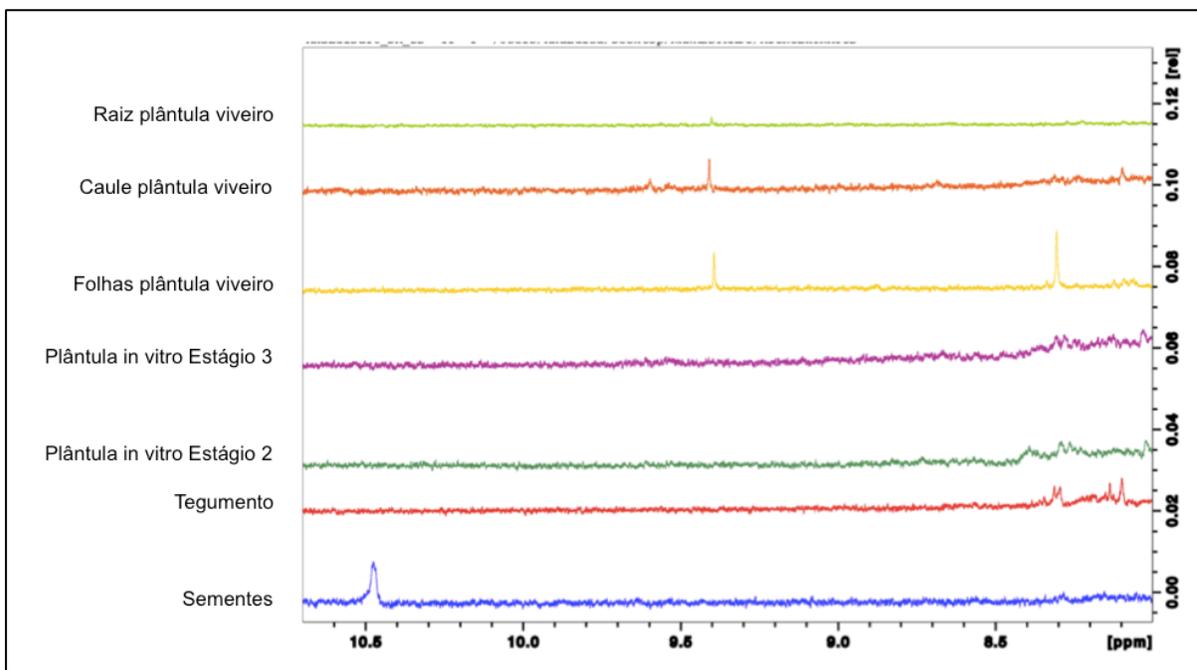


Figura 48. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H entre δ_{H} 8 - 10,5 de diferentes extratos de *D. macrophylla*

5.6.2.3 Calos e suspensões

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos dos calos e suspensões coletados após 30° e 28° dia do seu subcultivo foram analisados (Figura 50). Alguns sinais no espectro nos deslocamentos entre δ_{H} 6,5 e 8 indicaram a presença de hidrogênios ligados a anéis aromáticos provavelmente das substâncias fenólicas que revelaram nos reveladores FeCl_3 e NP/PEG nas análises de CCDC nos dois extratos. Foram também visualizados sinais na região entre δ_{H} 2,5 e 3,6 característicos de hidrogênios de carbonos carbinólicos (provavelmente de açúcar) em ambos extratos.

Existe um grupo de metabólitos secundários de polaridade alta chamados de feniletanoides glicosilados, que são anéis aromáticos ligados a açúcares e possuem variadas atividades biológicas (XUE e YANG, 2016) (Figura 49). Essas substâncias são amplamente encontradas em extratos de culturas *in vitro* de plantas e geralmente são produzidos em culturas que também produzem iridoides glicosilados (PIĄTCZAK; GRĄBKOWSKA; WYSOKIŃSKA, 2018). As substâncias fenólicas reveladas nas placas de CCDC dos extratos dos calos e das suspensões

se encontravam muito próximo do ponto de aplicação (AcOEt/MeOH 8:2) o que indica que são muito polares. Foi possível observar também, sinais de dubletos em δ_H 4,3 e 5,1, característicos de hidrogênios de carbonos anoméricos de açúcares, os quais, associados com os sinais na região de hidrogênios aromáticos, sugerem a presença de feniletanoides glicosilados (PEREIRA *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2004) (Figura z) ou até mesmo flavonoides glicosilados. Isto poderia indicar a presença desse tipo de substâncias, porém seria necessário o isolamento para ser confirmada essa suposição.

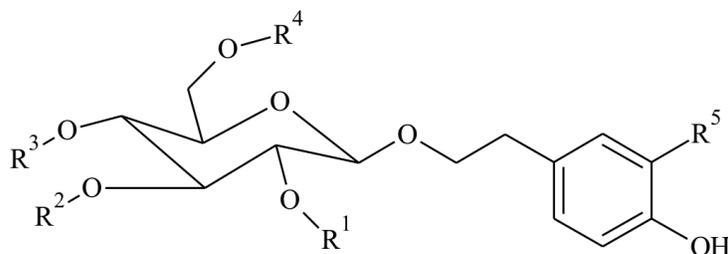


Figura 49. Esqueleto básico de feniletanoides glicosilados produzidos por culturas *in vitro* de tecidos vegetais (PIĄTCZAK *et al.*, 2018).

A região dos espectros entre δ_H 0,5 e 2,5 apresentaram vários sinais em formas de multipletos característicos de hidrogênios que poderiam pertencer à esteroides ou triterpenoides revelados por anisaldeído sulfúrico e visualizados na região superior das placas de CCDC.

Também como apresentado nos resultados das placas de CCDC o espectro das suspensões não apresentou os sinais do iridoide isolado. A cultura de calos e de suspensão celular da espécie estudada foi realizada em presença dos mesmos nutrientes e reguladores de crescimento, porém, as condições de crescimento temperatura (26 e 30 °C) e tipo de sistema de crescimento (semissólido e líquido) foram diferentes. Isto pode explicar a diferença no perfil químico de ambas culturas já que o crescimento e desenvolvimento das plantas, assim como as quantidades ou tipos de metabólitos secundários produzidos, são afetados pela temperatura (EVANS, 2009).

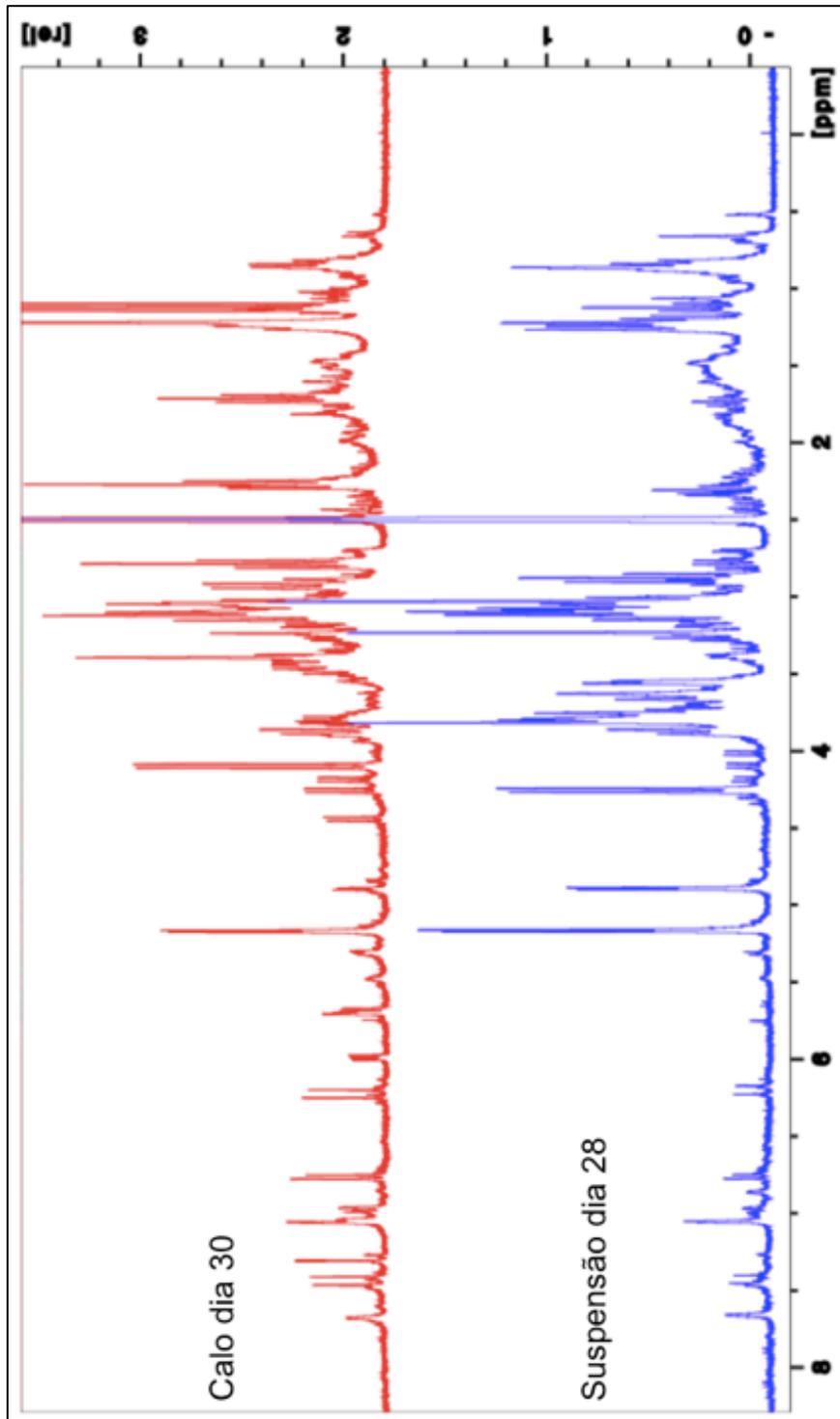


Figura 50. Espectros de RMN de ^1H dos calos e suspensões celulares de *D. macrophylla*.

Em relação ao tipo de cultura, existem distintas diferenças entre o crescimento em meio semissólido e líquido, pois no meio líquido a disponibilidade de nutrientes e gases é maior e se distribui uniformemente, assim as células em

suspensão podem não se encontrar num ambiente tão estressante quanto os calos no meio semissólido e por tanto, não precisam produzir de metabólitos secundários. Ao mesmo tempo, a disponibilidade de nutrientes e gases por ser mais uniforme em meio líquido, poderia se encontrar, em consequência, mais saturado que no meio semissólido, o qual também pode inibir a produção dos metabólitos. Por isso, é necessário realizar mais estudos alterando as concentrações de nutrientes, usando distintos reguladores de crescimento, condições de crescimento ou adicionando elicitores, já que cada planta precisa de estímulos e condições específicas para agir da forma desejada (LINDEN *et al.*, 2001; ZHONG, 2001).

Outro ponto importante é que as células em suspensão de *D. macrophylla* na fase estacionária apresentaram uma consistência mais friável, ou seja, mais desdiferenciada quando comparada com as células do calo. Muitos metabólitos secundários, além de serem sintetizados quando as plantas são expostas a um estresse, precisam de um tecido diferenciado para poderem ser produzidos (SHILPA; VARUN; LAKSHIMI, 2010). Isto poderia explicar porque os calos, que tinham consistência semifriáveis (ou seja, com um grau menor de desdiferenciação), conseguiram produzir o iridoide e também maior concentração de metabólitos secundários.

5.6.2.4 Curvas de crescimento

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos de diferentes tempos de crescimento dos calos e suspensões foram analisados. O perfil químico dos calos foi semelhante, já que foram observados os mesmos sinais em todos os espectros, variando unicamente na intensidade dos sinais dependendo do período de crescimento (Figura 51); por exemplo, foi observada a produção do iridoide em relação ao sinal em δ_{H} 5,98 (Figura 52). O iridoide começou a ser produzido no 6º dia de cultivo até o 30º dia onde apresentou a maior concentração (intensidade de sinal) e no 36º dia o iridoide diminuiu sua concentração. Esses resultados concordam com os obtidos nas análises de CCDC, onde a mancha azul indicando a produção do iridoide foi revelada com anisalaldeído sulfúrico.

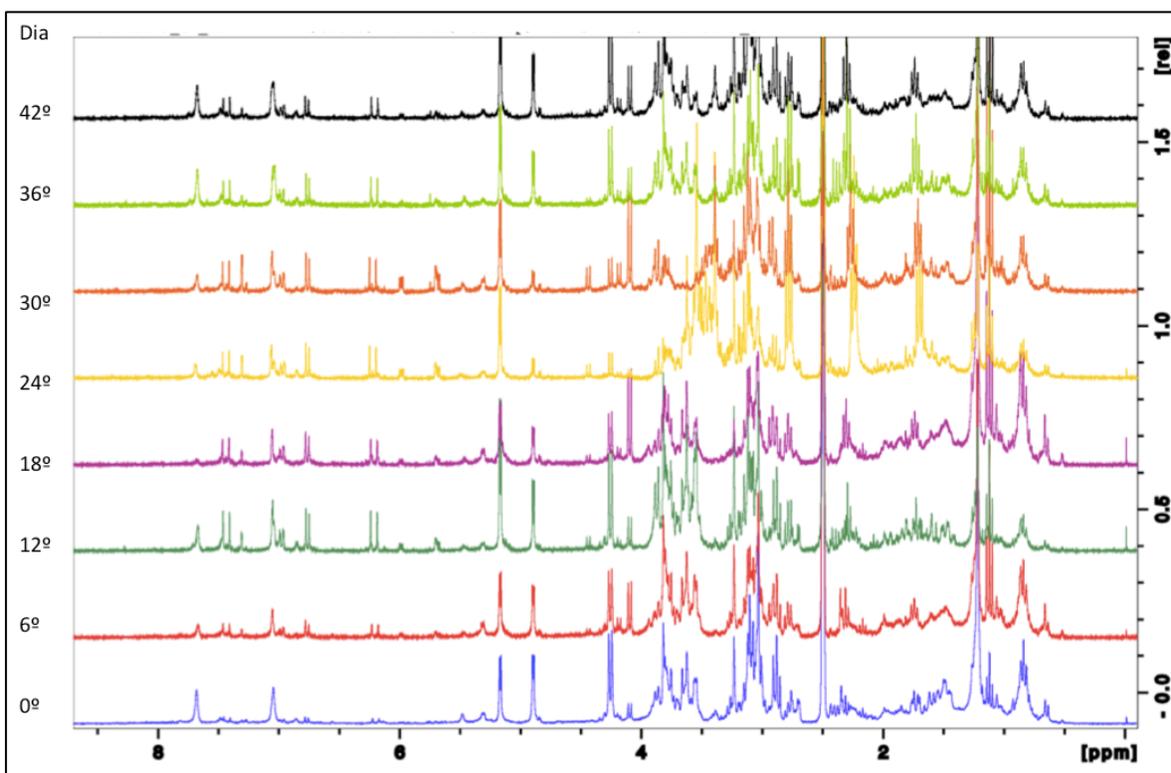


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H da curva de crescimento dos calos de *D. macrophylla*.

Também foi observado no espectro que um dubleto no deslocamento δ_{H} 4,89 (Figura 52) teve o comportamento oposto ao sinal em δ_{H} 5,98 do iridoide; isto quer dizer que quando o sinal em δ_{H} 4,89 era mais intenso, o sinal do iridoide era menos intenso e vice-versa. Foi realizado um gráfico com relação dos sinais em δ_{H} 5,98 (iridoide) e δ_{H} 4,89 com o sinal do DMSO- d_6 (2,5 ppm) para observar sua presença ao longo do tempo (Figura 53). Esses resultados indicam que provavelmente a molécula à qual pertence o dubleto poderia estar envolvida na síntese mas também no consumo do iridoide, podendo ser um precursor ou um produto do mesmo.

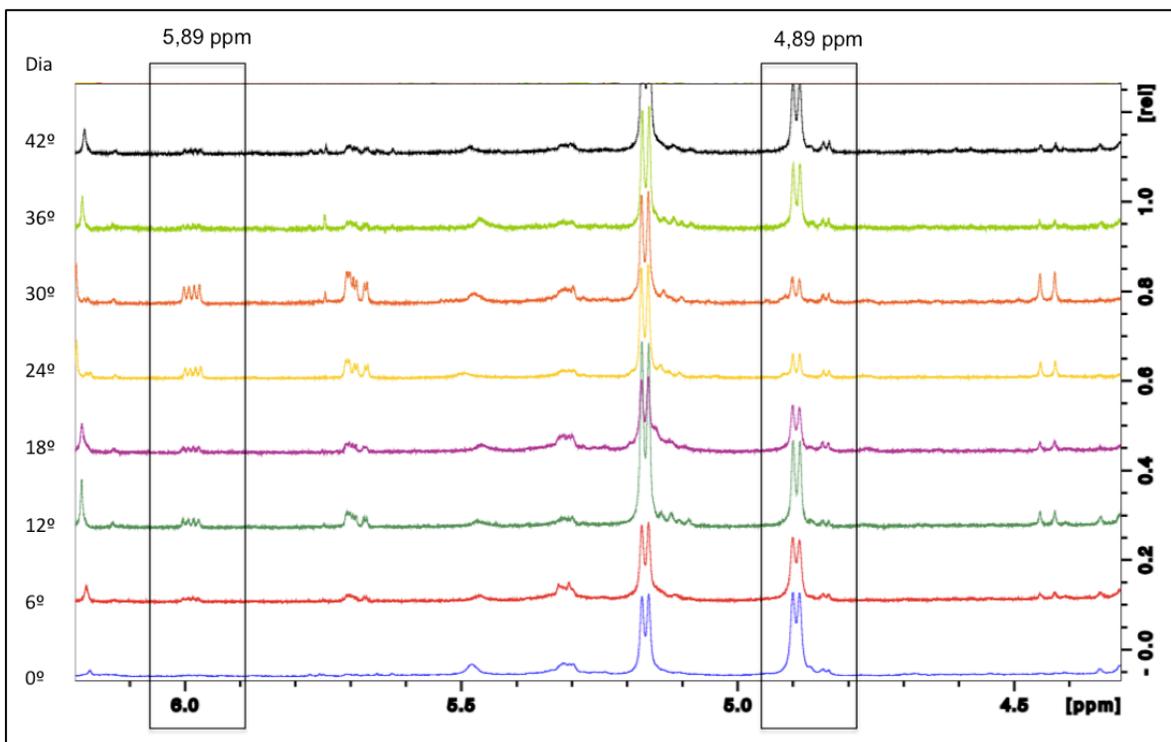


Figura 52. Ampliações dos espectros de RMN de ^1H da curva de crescimento dos calos de *D. macrophylla*.

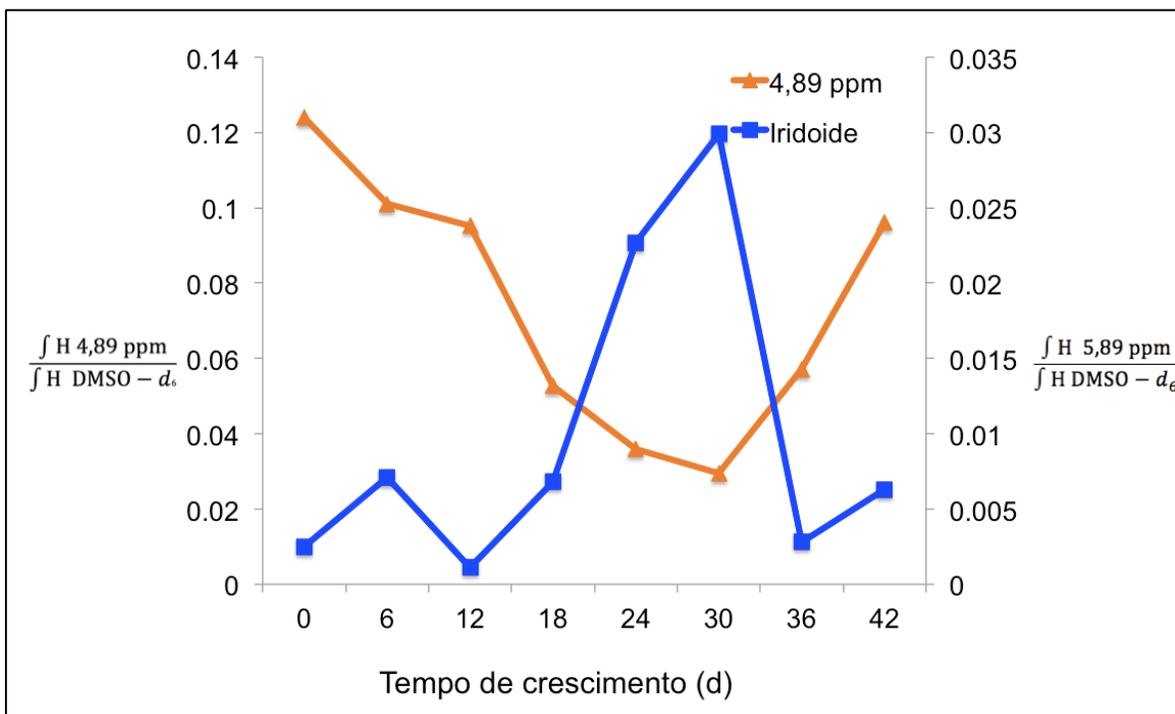


Figura 53. Gráfico da produção do iridoide e a substância envolvida na síntese ao longo do tempo nos calos de *D. macrophylla*.

Outro fator analisado, foi a produção do iridoide em relação ao crescimento dos calos no tempo (Figura 54). Foi identificado que a maior produção do iridoide aconteceu no 30º dia durante a fase estacionária de crescimento, porém após esse tempo, foi observada a queda na produção do mesmo e um aumento de massa dos calos. Anteriormente foi discutida a possibilidade de um crescimento diáuxico nos calos por ter acontecido um aumento de massa posterior à fase de crescimento estacionária. Esses resultados corroboram com o que está sendo suposto, pois provavelmente a diminuição da produção do iridoide foi devida à ativação do crescimento exponencial da segunda fase de crescimento, onde ocorreu o consumo de outro açúcar presente no meio de cultura, diferente à sacarose que foi adicionada no meio.

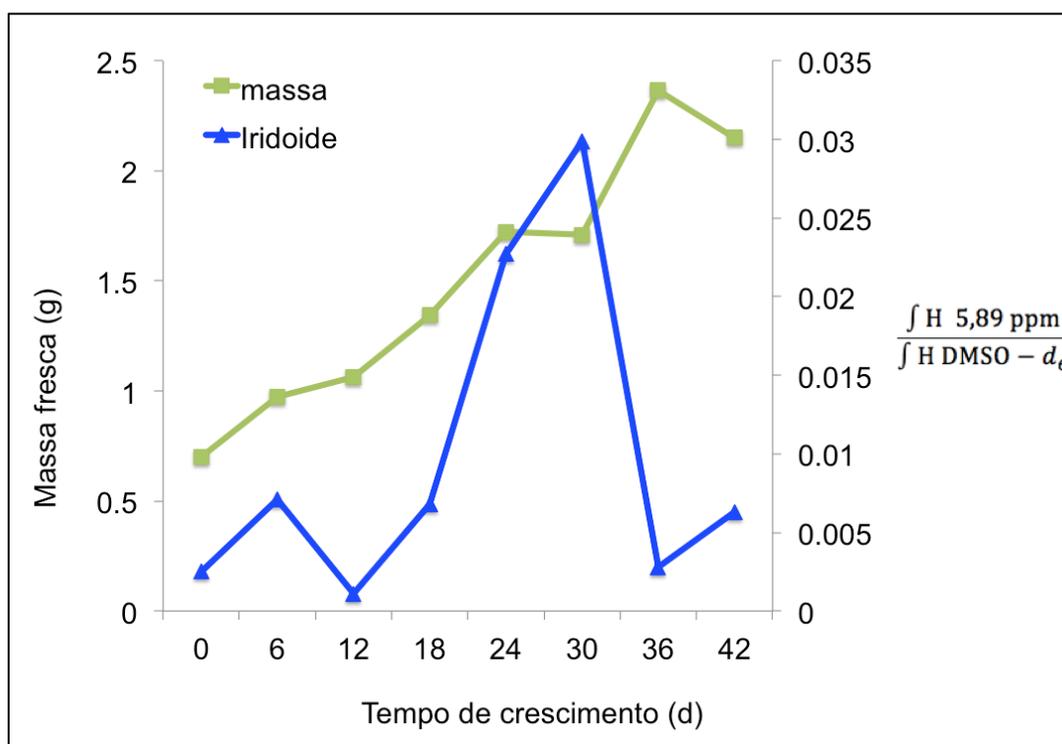


Figura 54. Gráfico da produção de massa e do iridoide ao longo do tempo nos calos de *D. macrophylla*

No caso das suspensões celulares o perfil químico foi também muito semelhante em todos os tempos, variando só na intensidade dos sinais. Tomando como exemplo os sinais da região dos aromáticos em δ_H 7,66, 7,05 e 5,75, pode-

se observar que entre os 35° e 42° dias da fase estacionária houve uma maior intensidade dos sinais (Figura 55). Isto concorda com os resultados observados nas placas de CCDC reveladas com anisaldeído sulfúrico, onde nesses dias da fase estacionária foi encontrada a maior concentração dos metabólitos secundários. No 21° dia da fase exponencial também foi observada a diminuição desses e outros sinais no espectro, o quais são característicos dessa etapa de crescimento, onde as células investem sua energia para produzir mais biomassa e por tanto menor quantidade de metabólitos secundários.

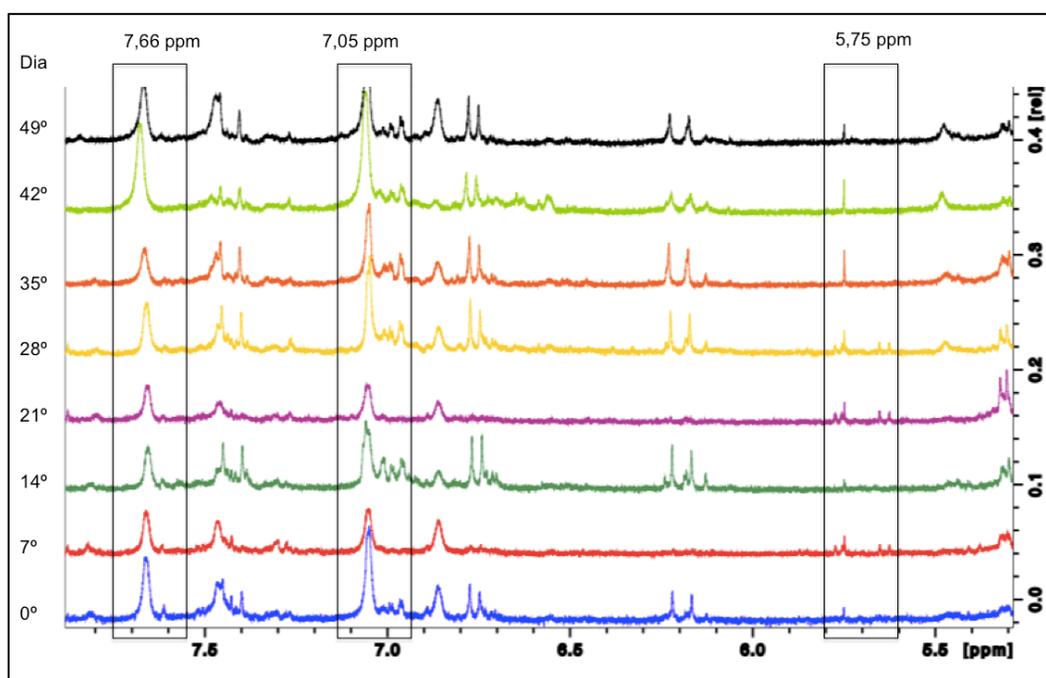


Figura 55. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da região entre δ_{H} 5,5 e 8,0 da curva de crescimento das suspensões de *D. macrophylla*.

5.7 Análise Quimiométrica

5.7.1 Microextratos dos testes de germinação

A partir das análises de projeção dos componentes principais (PCA) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos das plântulas germinadas tanto *in vitro* como *ex vitro*, sementes e tegumentos, foi possível observar a variação

entre os perfis químicos. Nesse caso, os sinais analisados se encontravam entre δ_H 0,6-10,51, no entanto, foram avaliadas unicamente as regiões do espectro onde se apresentavam sinais e as que não continham foram excluídas da análise (ANEXO I).

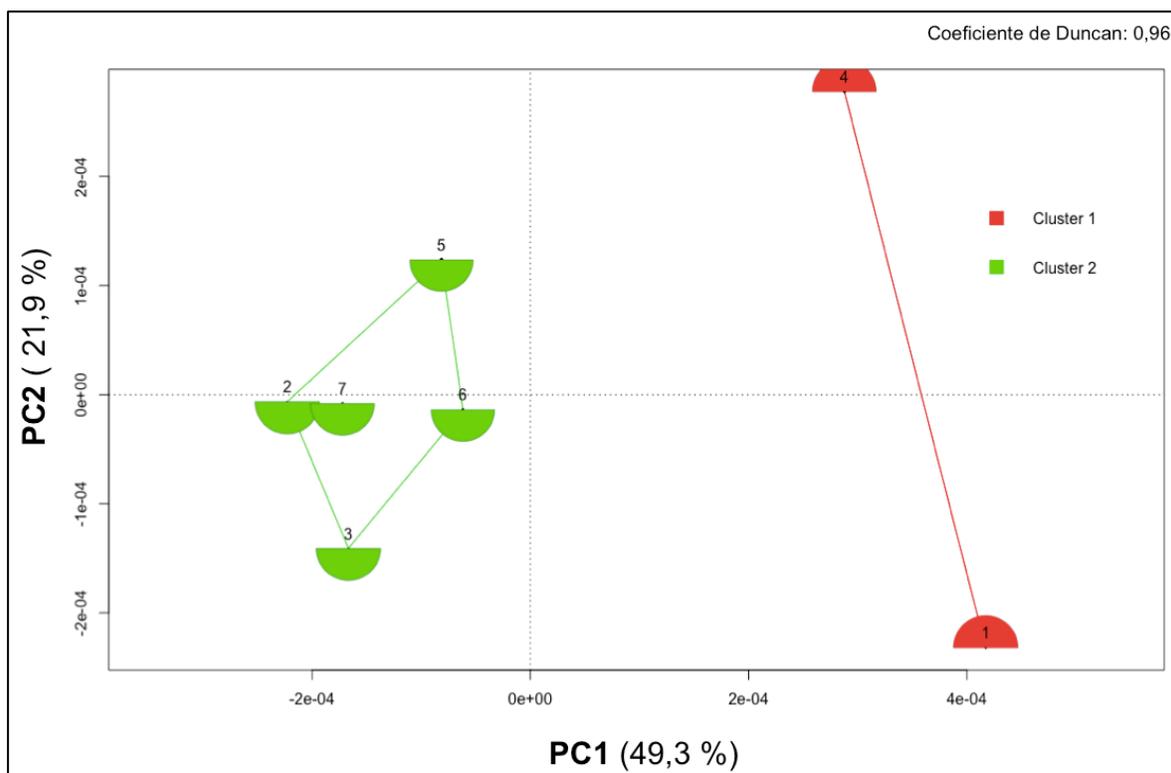


Figura 56. Gráfico de ordenação de *clusters* PCA/Fuzzy dos scores dos espectros inteiros de extratos de *D. macrophylla*. 1. Caule viveiro, 2. Plântula *in vitro* Est 2, 3. Plântula *in vitro* Est 3, 4. Folha viveiro, 5. Raiz viveiro, 6. Semente, 7. Tegumento.

A análise multivariada PCA/Fuzzy revelou que havia diferenças significativas no perfil de metabólitos nos extratos, dividindo-os em dois *clusters* enquanto os PC1 e PC2 explicaram a maior parte dos dados (71,2%) (Figura 56). Ambos os *clusters* se encontraram distribuídos nos quatro quadrantes: o primeiro *cluster* (verde) ficou conformado pelas sementes, os tegumentos, as plântulas germinadas *in vitro* e as raízes das plântulas do viveiro e se distribuiu nos quadrantes III e IV do mapa. A única amostra desse *cluster* que ficou no quadrante 4 foi o extrato das raízes da plântula do viveiro, o qual parece estar associado à intensidade maior dos sinais em δ_H 3,14 - 3,53 conforme ao observado no mapa

de *loadings* (Figura 57). Nesses deslocamentos foram identificados alguns dos sinais do iridoide isolado e dessa forma é possível afirmar que as raízes apresentaram maior produção dessas substâncias em relação às plântulas germinadas *in vitro*.

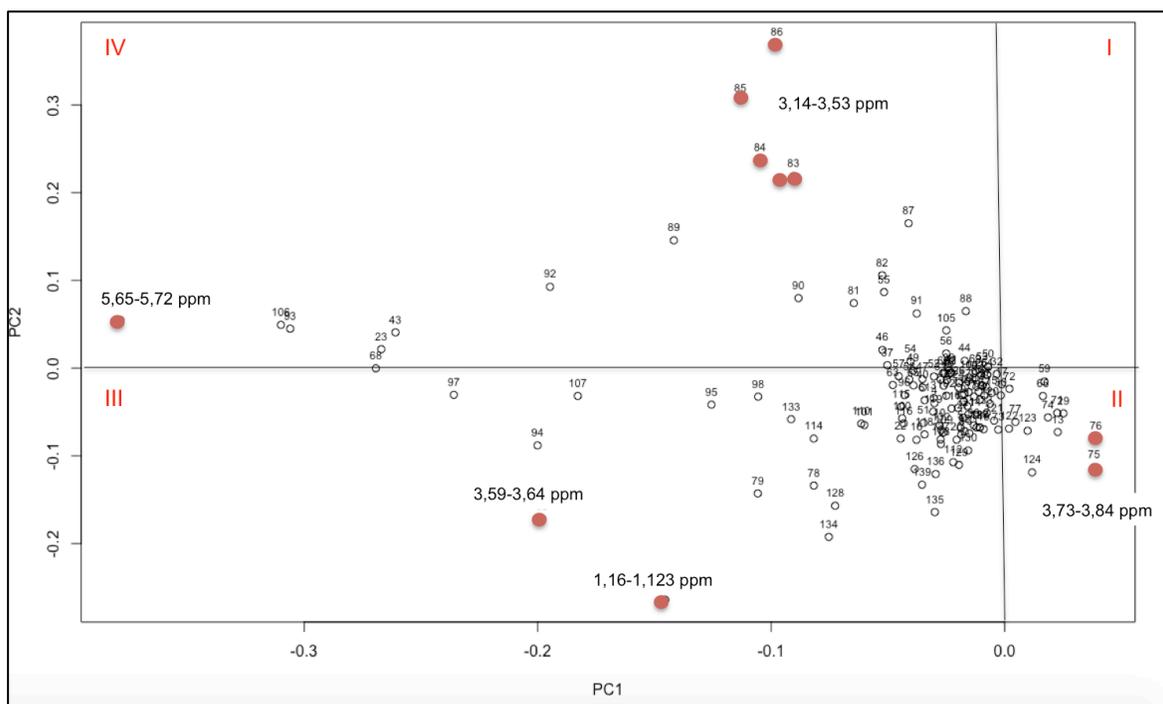


Figura 57. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos) dos espectros de RMN de ^1H sobre as *loadings* das amostras de plântulas, sementes e tegumentos. Cada número representa uma região do espectro (ANEXO 2), os pontos em vermelho representam os deslocamentos dos sinais que afetam a localização das amostras no mapa.

O *cluster 2* (vermelho) ficou conformado pelas amostras das folhas e o caule das plântulas germinadas no viveiro, localizadas nos quadrantes I e II do mapa, respectivamente. O fator indicativo que localizou as amostras nesses dois quadrantes foi a intensidade de sinal nos deslocamentos químicos δ_{H} 3,73 - 3,84 característicos de hidrogênios ligados a açúcares, onde as folhas apresentaram em maior concentração essas moléculas.

A diferença entre as amostras dos dois *clusters* parece estar associada à intensidade dos sinais presentes nos deslocamentos entre δ_{H} 5,65 - 5,72 que pertencem ao iridoide isolado dos calos. Com isso pode-se afirmar que as folhas e

caules apresentaram maior concentração dessa substância nos seus extratos quando comparadas com as plântulas germinadas *in vitro*, as raízes e as sementes. Para maior especificidade na divisão de *clusters* entre as amostras, foi realizada uma análise hierárquica de *clusters* (HCA) e no dendrograma da Figura 58, pode-se visualizar as amostras classificadas por similaridade do seu perfil químico.

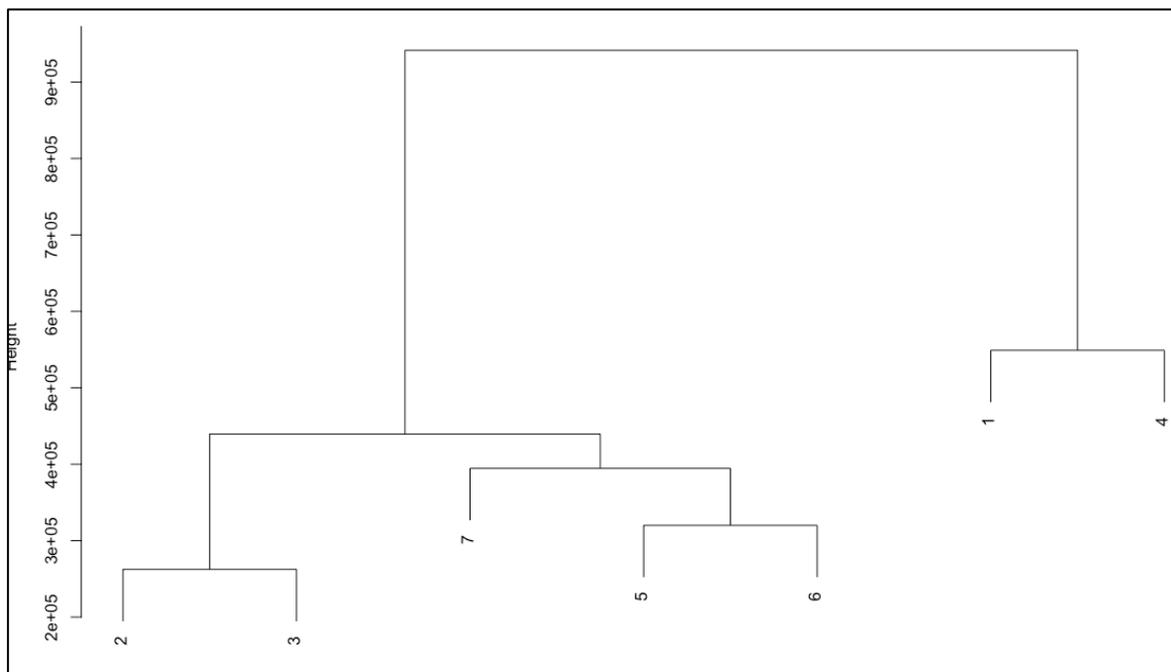


Figura 58. Gráfico de ordenação hierárquica de clusters (HCA) dos espectros inteiros de extratos de *D. macrophylla*. 1.Caule viveiro, 2. Plântula *in vitro* Est 2, 3. Plântula *in vitro* Est 3, 4.Folha viveiro, 5. Raiz viveiro, 6. Semente, 7. Tegumento, 8. Plântula viveiro.

Os extratos do material vegetal usado nos testes de germinação *in vitro* bem como as partes das plântulas germinadas no viveiro, também foram analisadas pela PCA/Fuzzy selecionando três sinais nos deslocamentos δ_H 5,98 (sinal do iridoide isolado), 8,95 (sinal de hidrogênio aromático); 9,4 e 10,5 (sendo os dois últimos bastante característicos de hidrogênios ligados a nitrogênio de alcaloides indólicos) (Figura 59). Os três últimos sinais de deslocamentos químicos são similares aos sinais dos alcaloides indólicos previamente isolados da planta *in natura* e cuja produção está sendo almejada por este estudo.

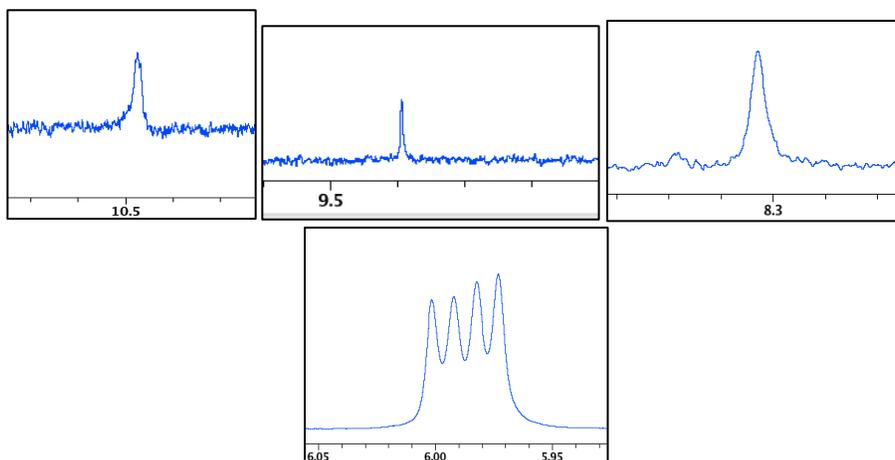


Figura 59. Sinais selecionados para fazer a análise quimiométrica dos microextratos do material vegetal do teste de germinação.

As amostras foram classificadas em 3 *clusters* confirmando que havia diferenças significativas entre as amostras em relação aos sinais antes mencionados e a PC1 e PC2 explicaram praticamente todos dados (99,1%) (Figura 60). O primeiro *cluster* (verde) ficou conformado pelas amostras das plântulas germinadas *in vitro* e os tegumentos; o segundo (azul) pelas amostras das sementes, as plântulas germinadas no viveiro e pelas raízes. Finalmente o terceiro *cluster* (vermelho) pelas amostras das folhas e dos caules. O fator indicativo do posicionamento dos *clusters* no mapa está associado aos deslocamentos pertencentes ao iridoide e aos hidrogênios ligados a nitrogênios (Figura 61). Ou seja, onde houve menor quantidade de iridoide presente na amostra, mais à esquerda do mapa foram localizados. O inverso ocorreu com os deslocamentos pertencentes a moléculas com hidrogênios ligados a nitrogênios, onde houve maior quantidade dessas moléculas presentes no extrato, mais à direita do mapa foram localizadas. Esses resultados sugerem que de fato, a quantidade de iridoide presente nos extratos influencia na produção de moléculas com hidrogênios ligados a nitrogênio, que provavelmente sejam alcaloides.

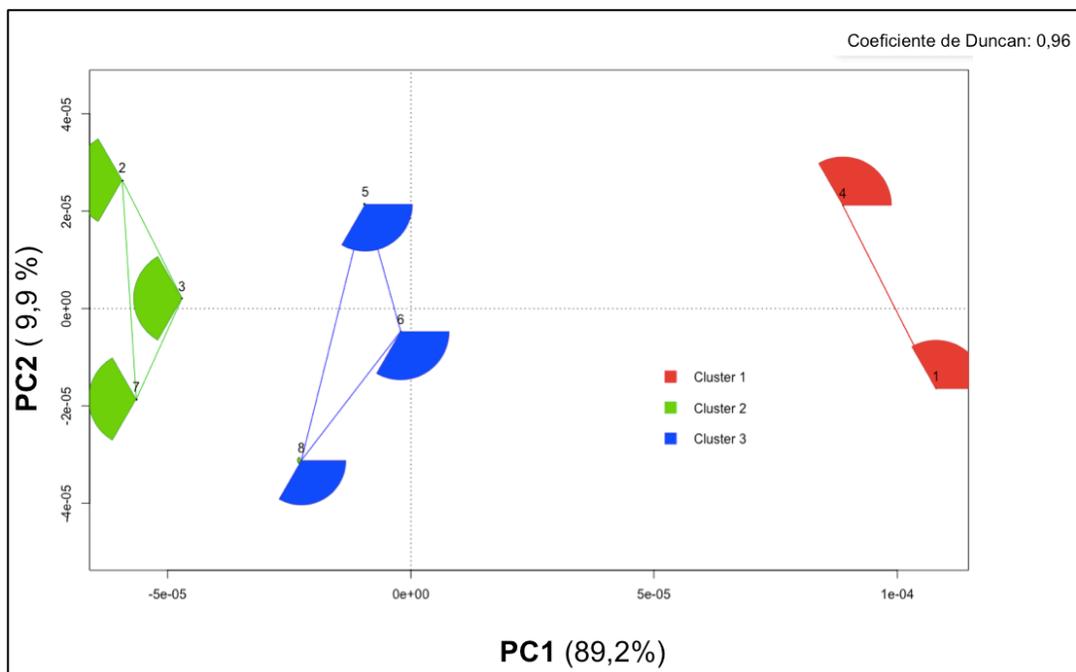


Figura 60. A) Gráfico de ordenação de *clusters* PCA/Fuzzy dos scores dos sinais δ_H 5,98 (iridoide) e 8,95 (hidrogênio aromático), 9,4 e 10,5 ppm (hidrogênios ligados a nitrogênios) presentes nos extratos de *D. macrophylla*. 1. Caule viveiro, 2. Plântula *in vitro* Est 2, 3. Plântula *in vitro* Est 3, 4. Folha viveiro, 5. Raiz viveiro, 6. Semente, 7. Tegumento, 8. Plântulas viveiro.

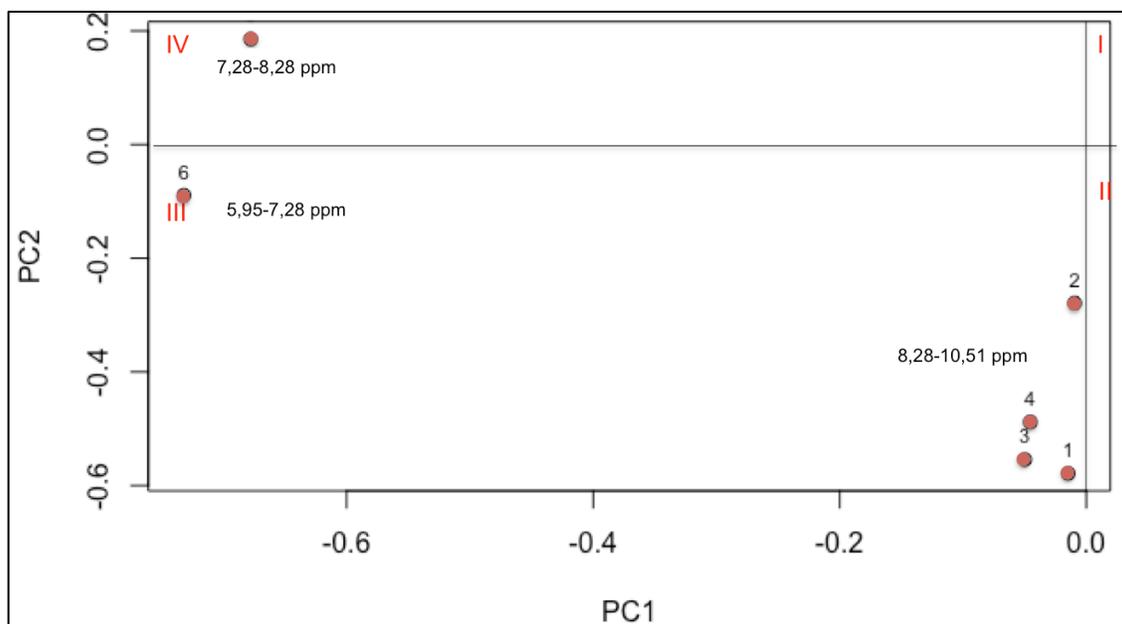


Figura 61. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos do iridoide e hidrogênios ligados a nitrogênios) dos espectros de RMN de 1H sobre os *loadings* das amostras de plântulas, sementes e tegumentos. Cada número representa uma região do espectro, os pontos em vermelho representam os deslocamentos dos sinais que afetam a localização das amostras no mapa.

Para uma melhor visualização da divisão de *clusters* entre as amostras, foi realizada uma análise hierárquica de *clusters* (HCA). No dendrograma da figura 62 é possível observar as amostras classificadas por similaridade na produção do iridoide e de alcaloides.

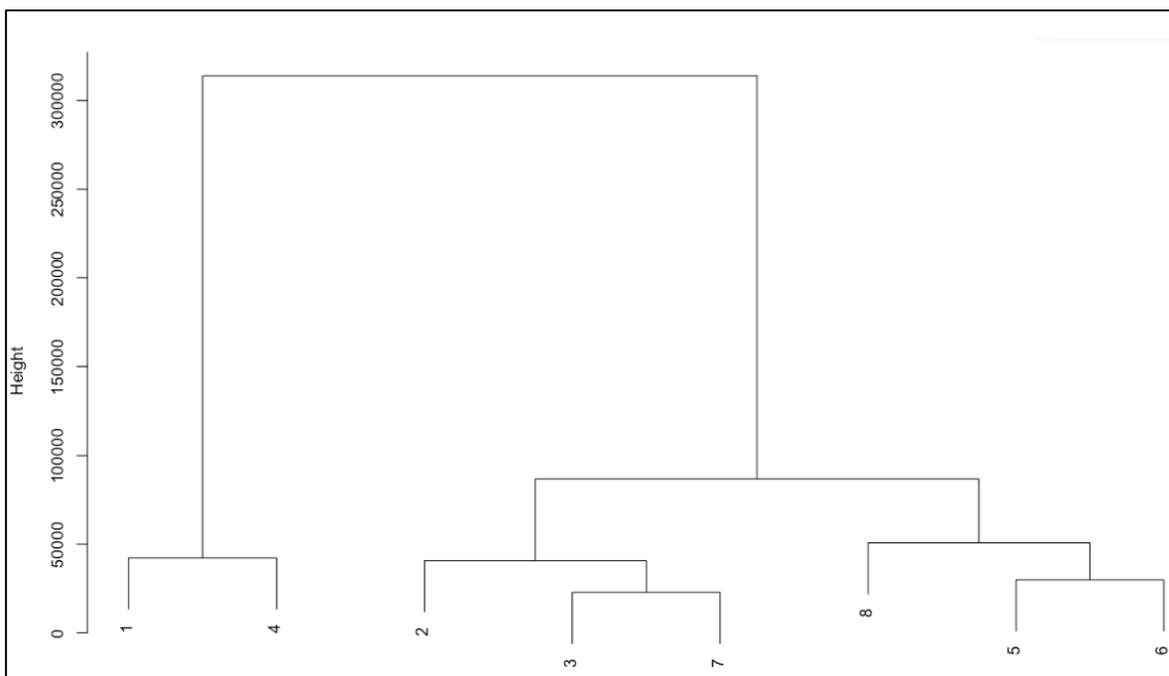


Figura 62. Gráfico de ordenação hierárquica de *clusters* (HCA) com os sinais δ_H 5,98 ppm (iridoide) e 8,95 ppm, 9,4 ppm e 10,5 ppm (hidrogênios ligados a nitrogênios) dos extratos de *D. macrophylla*: 1. Caule viveiro, 2. Plântula *in vitro* Est 2, 3. Plântula *in vitro* Est 3, 4. Folha viveiro, 5. Raiz viveiro, 6. Semente, 7. Tegumento, 8. Plântulas viveiro.

5.7.2 Calos elicitados

Os dados dos espectros de RMN de 1H das amostras dos calos elicitados foram analisados por PCA/Fuzzy, no qual foi possível verificar a variação entre os perfis químicos das amostras, por tanto, é possível afirmar que os tratamentos de elicitação tiveram diferenças significativas no estresse dos calos de *D. macrophylla*. A região do espectro analisada se encontra entre os deslocamentos δ_H 0,45 - 8,04, visto que só nessa região havia presença de sinais. Aquelas regiões onde não se apresentaram sinais foram excluídas (ANEXO 3).

Foram ordenados mediante a análise PCA/Fuzzy 4 *clusters* diferentes e as PC1 e PC2 explicaram a maioria dos dados (78,9%) (Figura 63). Vários dos tratamentos com NaCl, KCl, com exposição aos raios UV e as concentrações altas de SNP (20 e 30 mM), não causaram modificação significativa no perfil químico dos calos, já que se encontraram no *cluster* do quadrante IV (azul claro) onde o controle foi agrupado.

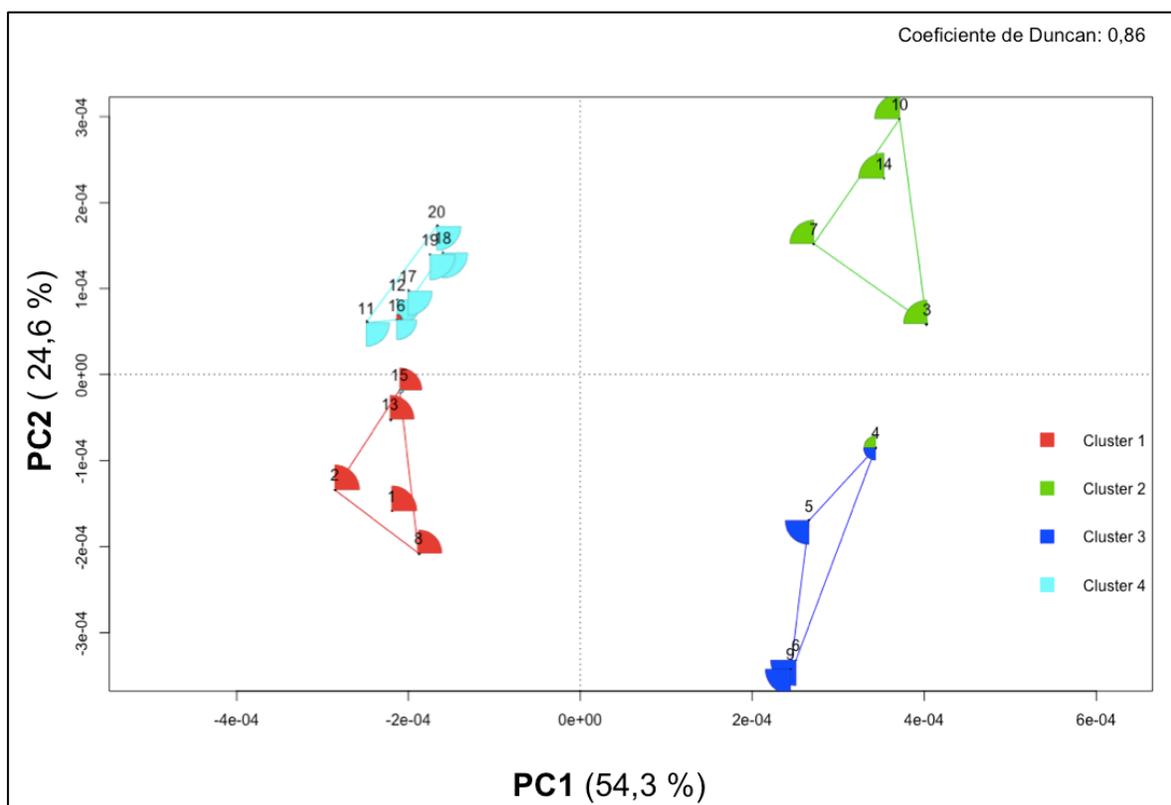


Figura 63. Gráfico de ordenação de *clusters* PCA/Fuzzy dos espectros inteiros dos calos elicitados de *D. macrophylla*: 1. Dm-100 K, 2. Dm-100 Na, 3. Dm-10 Al, 4. Dm-15 Al, 5. Dm-200 K, 6. Dm-200Na, 7. Dm-25 Al, 8. Dm-50 K, 9. Dm-50 Na, 10. Dm-10 S, 11. Dm-20 S, 12. Dm-30 S, 13. Dm-3 A, 14. Dm-5 S, 15. Dm-6 A, 16. Dm-9 A, 17.Dm-10 UV, 18. Dm-25 UV, 19. Dm-45 UV, 20. Dm-Controle.

Os tratamentos com ABA e algumas concentrações de NaCl e KCl foram agrupados no *cluster* do quadrante III (vermelho), esses extratos apresentaram menores concentrações de metabólitos secundários como pode ser observado no mapa de *loadings* (Figura 64).

Os tratamentos com AlCl_3 , 10 e 5 mM de SNP, 50 mM de NaCl e 200 de KCl, apresentaram maiores diferenças em relação aos outros tratamentos e foram classificados em mais dois *clusters* nos quadrantes I (verde) e II (azul escuro). O fator indicativo da ordenação dessas amostras nesses quadrantes parece estar relacionado com os sinais entre δ_{H} 2,41 - 2,46 que pertencem ao iridoide isolado, além de que a maioria dos *loadings* se encontram localizados no lado direito do mapa. Com isso se pode inferir que baixas concentrações de NO (SNP) e o metal alumínio (AlCl_3) são elicitores capazes de estressar os calos de *D. macrophylla* para o melhoramento da produção dos seus metabólitos secundários e principalmente o iridoide.

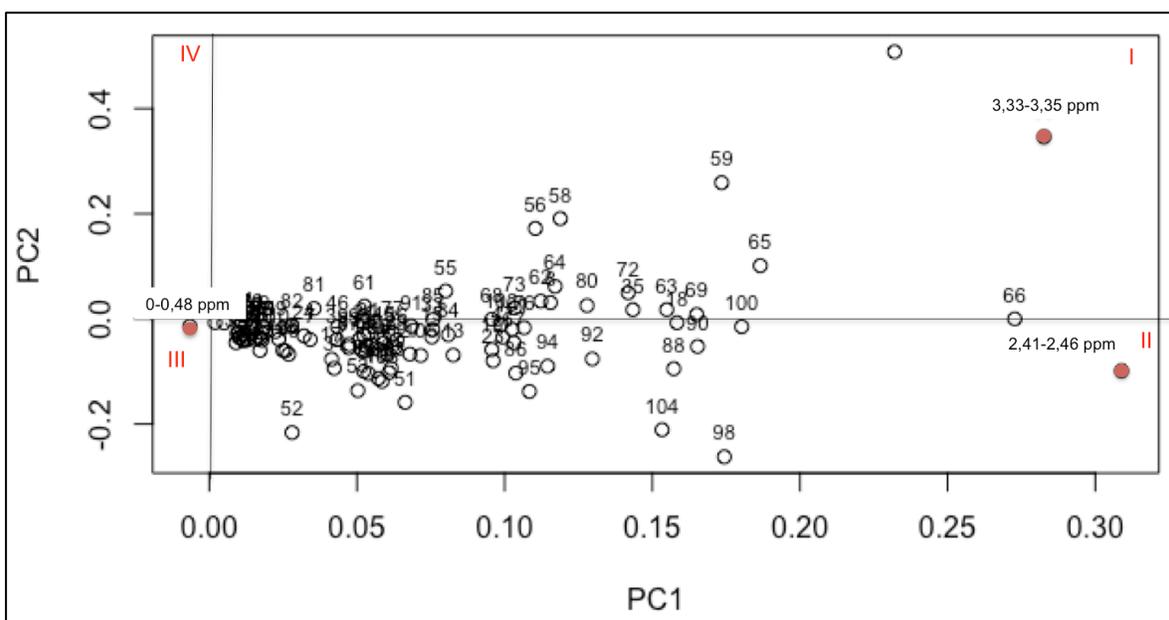


Figura 64. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos) dos espectros de RMN de ^1H sobre os *loadings* das amostras dos calos elicitados. Cada número representa uma região do espectro (ANEXO 4), os pontos em vermelho representam os deslocamentos dos sinais que afetam a localização das amostras no mapa.

Para maior especificidade na divisão de *clusters* entre os tratamentos, foi realizada uma análise hierárquica de clusters (HCA). No dendrograma da figura 65, pode ser observado todos os tratamentos classificados por similaridade no seu perfil químico.

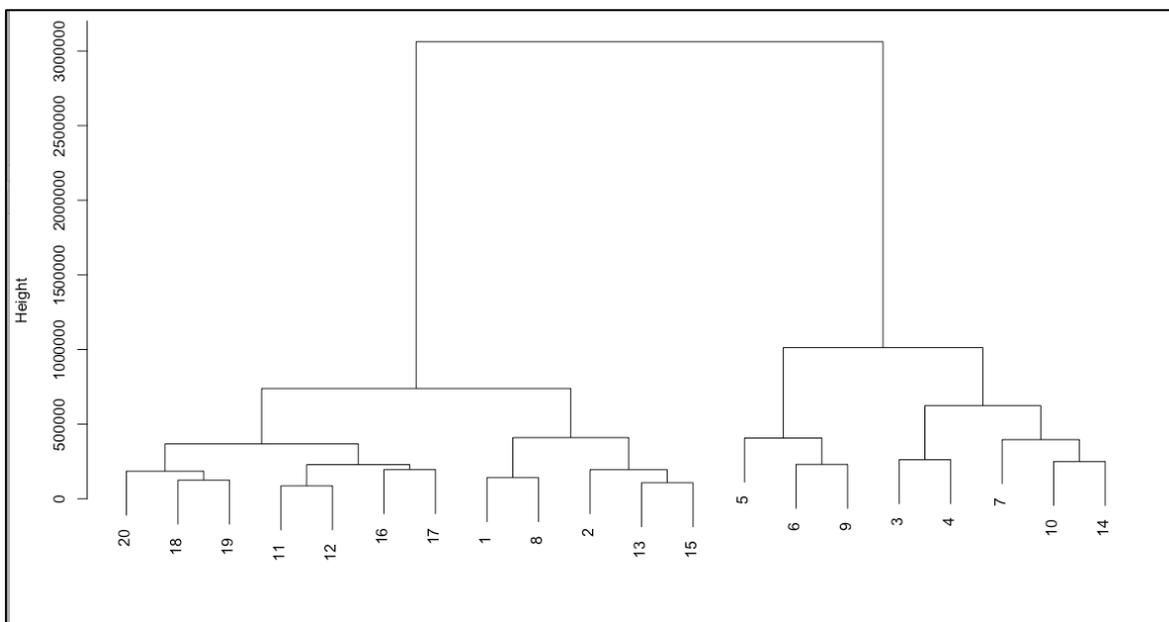


Figura 65. Gráfico de ordenação hierárquico de clusters HCA d dos espectros inteiros dos calos elicitados de *D. macrophylla*: 1. Dm-100 K, 2. Dm-100 Na, 3. Dm-10 Al, 4. Dm-15 Al, 5. Dm-200 K, 6. Dm-200Na, 7. Dm-25 Al, 8. Dm-50 K, 9. Dm-50 Na, 10. Dm-10 S, 11. Dm-20 S, 12. Dm-30 S, 13. Dm-3 A, 14. Dm-5 S, 15. Dm-6 A, 16. Dm-9 A, 17. Dm-10 UV, 18. Dm-25 UV, 19. Dm-45 UV, 20. Dm-Controle.

5.7.2.1 Análise da produção do iridoide nos calos elicitados

Os tratamentos de elicitação que foram analisados em relação aos sinais do iridoide (ANEXO 5) nos calos elicitados, apresentaram diferenças significativas entre eles. Os dados foram agrupados em 4 *clusters* e a PC1 e PC2 explicaram praticamente todos dados (98,6%) (Figura 66). O agrupamento desses dados em quatro *clusters* foi diferente do agrupamento obtido quando foram analisados todos os sinais do espectro, porém o comportamento foi diferente. Dois dos *clusters* foram localizados do lado esquerdo do mapa nos quadrantes II e IV. No primeiro *cluster* (vermelho) foram agrupados a maioria dos tratamentos com NaCl e KCl, os tratamentos com ABA, as concentrações maiores de SNP e os calos expostos por 10 e 25 min a luz UV₃₅₄. No *cluster* (azul escuro) seguinte foram agrupados os calos tratados com 25 mM de AlCl₃, 50 mM KCl, 50 mM NaCl e os calos expostos por 45 min a luz UV₃₅₄, os quais não tiveram diferença na produção do iridoide em relação ao controle que se encontra no mesmo *cluster*.

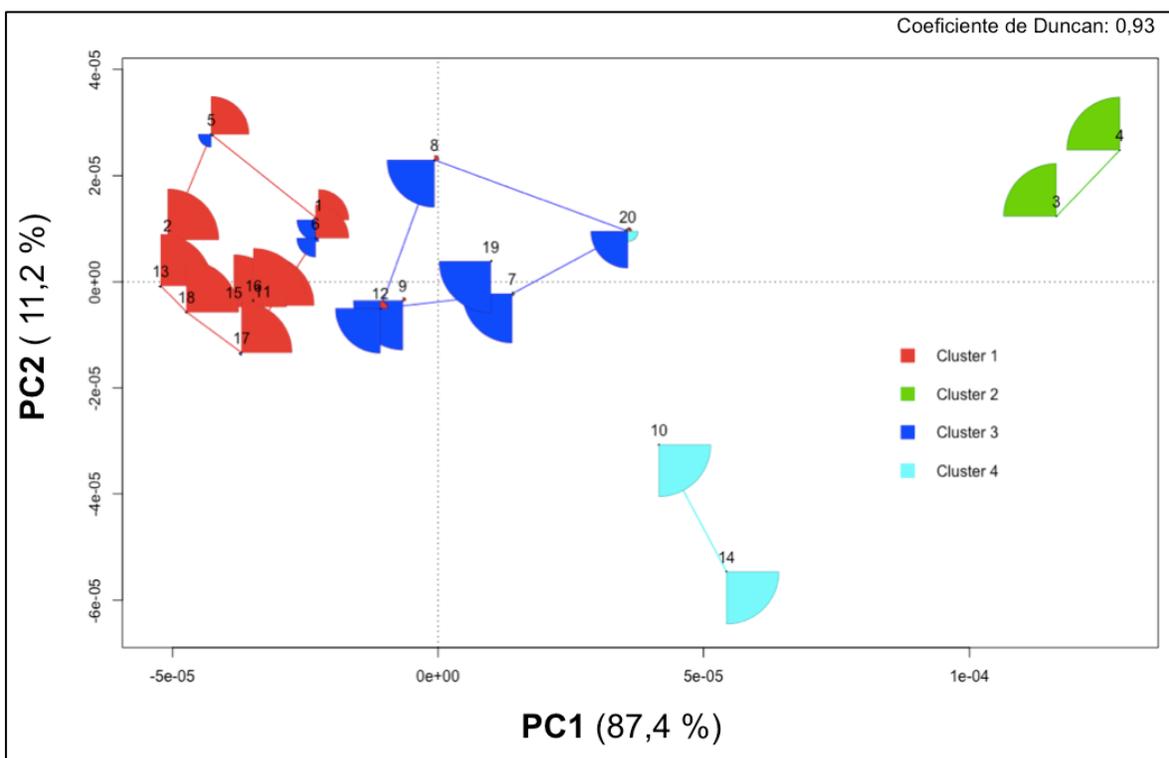


Figura 66. Gráfico de ordenação de *clusters* PCA/Fuzzy das regiões do espectro dos sinais de iridoide nos calos elicitados de *D. macrophylla*: 1. Dm-100 K, 2. Dm-100 Na, 3. Dm-10 Al, 4. Dm-15 Al, 5. Dm-200 K, 6. Dm-200Na, 7. Dm-25 Al, 8. Dm-50 K, 9. Dm-50 Na, 10. Dm-10 S, 11. Dm-20 S, 12. Dm-30 S, 13. Dm-3 A, 14. Dm-5 S, 15. Dm-6 A, 16. Dm-9 A, 17. Dm-10 UV, 18. Dm-25 UV, 19. Dm-45 UV, 20. Dm-Controle.

Os outros dois *clusters* foram localizados nos quadrantes I (verde) e II (azul claro). O fator indicativo da ordenação dessas amostras nesses quadrantes está relacionado à intensidade dos sinais que pertencem ao iridoide isolado conforme ao observado no mapa de *loadings*, em que todas as variáveis se encontram localizadas no lado direito do mapa (figura 67). Assim, é possível afirmar que os calos de *D. macrophylla* apresentaram uma diferença maior na produção do iridoide quando o $AlCl_3$ foi usado nas concentrações de 10 e 15 mM e em seguida quando o SNP (NO) foi usado nas concentrações de 5 e 10 mM. Enquanto aos tratamentos agrupados no *cluster* vermelho é possível inferir que inibem a produção desse iridoide já que se encontram mais à esquerda do mapa, mostrando uma menor produção em relação ao controle, o qual é considerado

também uma resposta ao estresse. É possível que esses tratamentos (com NaCl, KCl, ABA e concentrações altas de SNP) estejam elicitando a produção de outras substâncias não identificadas até o momento.

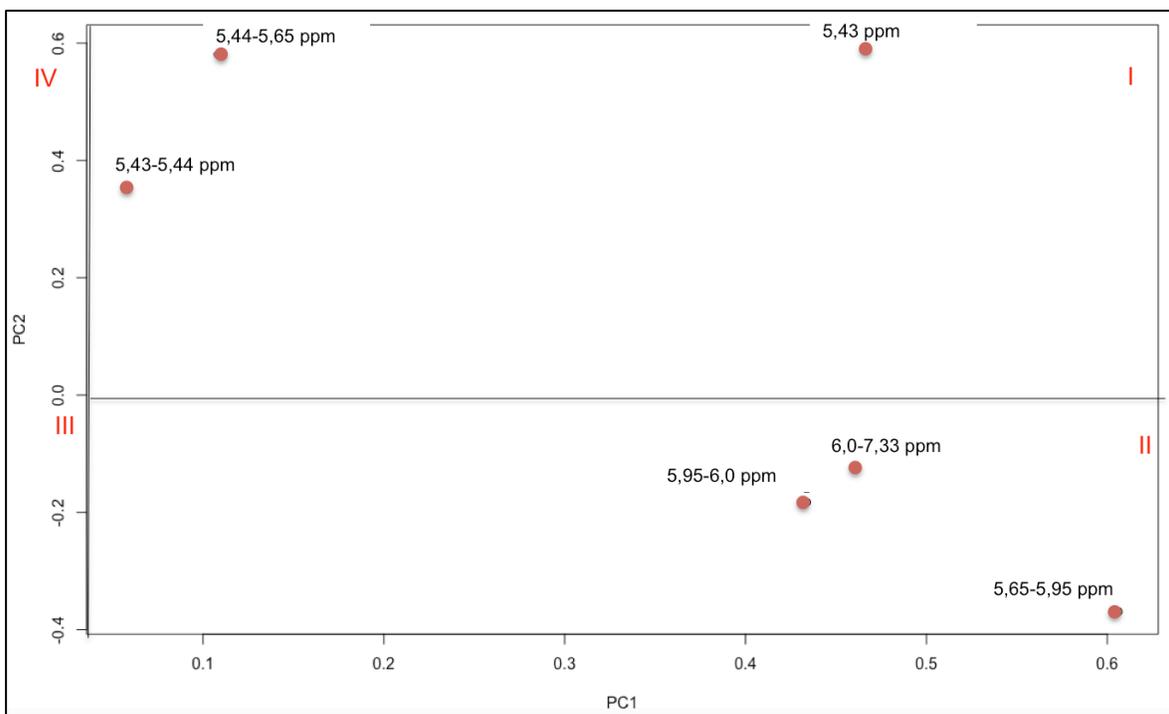


Figura 67. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos) dos sinais dos hidrogênios do iridoide sobre os *loadings* das amostras dos calos elicitados. Os pontos em vermelho representam os deslocamentos dos sinais que afeitam a localização das amostras no mapa.

Na figura 68 é possível observar a diferença na produção do iridoide em cada tratamento de elicitação apresentando a relação da integral do sinal em δ_H 5,98 ppm e a do solvente DMSO- d_6 , onde as maiores concentrações foram encontradas nos calos elicitados com 0,1 e 0,15 mM. O mesmo pode ser observado no dendrograma de HCA que localiza as concentrações 0,1 e 0,15 mM de AlCl₃ em um *cluster* separado de todos os outros tratamentos (Figura 69).

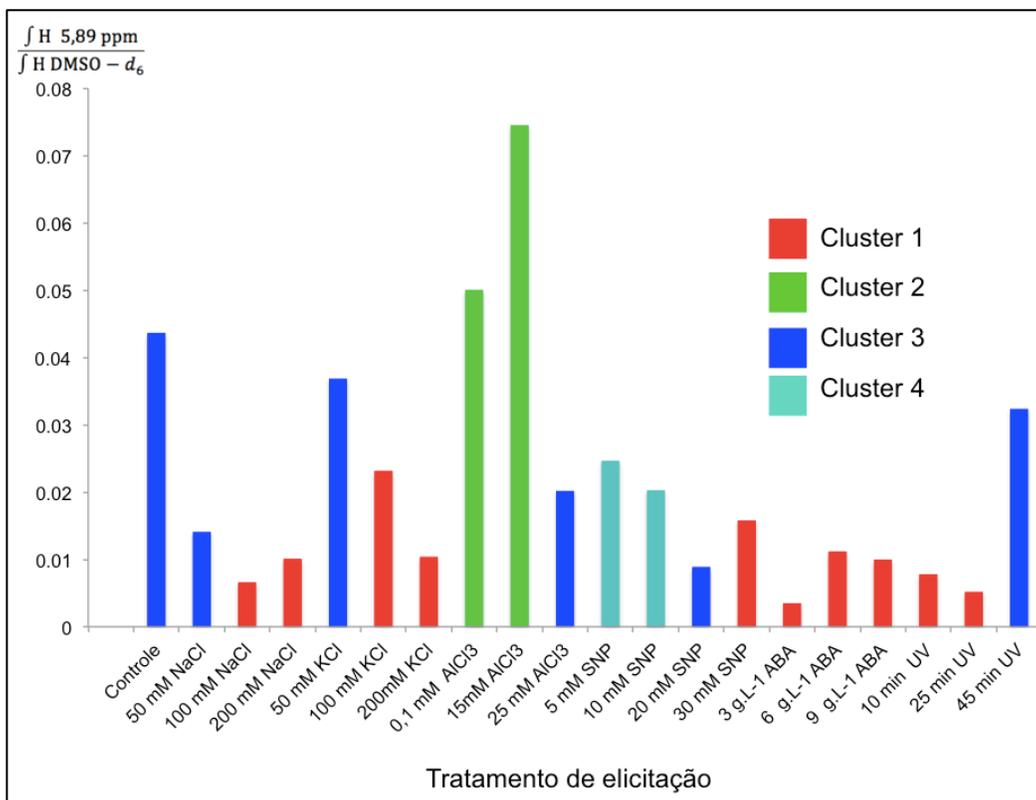


Figura 68. Proporção da produção do iridoide em relação ao sinal do hidrogênio em δ_H 5,98 ppm nos tratamentos de elicitação.

O alumínio é um metal tóxico que se encontra no solo e provoca estresse osmótico e oxidativo nas plantas (NASCIMENTO *et al.*, 2013), onde várias cascatas bioquímicas são desencadeadas por diferentes estresses bióticos e abióticos. Sabe-se que a cascata de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) é uma das principais vias de transdução de sinal para mediação de estímulos extracelulares de elicitores como: radiação UV, estresse de temperatura, ataque de patógenos, seca, sal, hormônios de sinalização, escassez de nutrientes e estresse por alumínio (Al) (MOSSOR-PIETRASZEWSKA, 2001). A ativação de MAPKs tem sido observada quando raízes do trigo (*Triticum aestivum*) foram expostas a alumínio, pelo que foi relatado essa proteína quinase pode estar envolvida na resposta fisiológica por exposição ao Al (OSAWA e MATSAMUTO, 2001). Um outro estudo, desenvolvido com a espécie *Catharantus roseus* demonstrou que a produção de alcaloides nas células elicidadas com SNP depende da ativação de uma proteína MAPK (XU e DONG, 2005). Essa ativação afeta

outras vias ou genes específicos (VASCONSUELO e BOLAND, 2007), onde as enzimas resultantes catalisam a biossíntese dos metabólitos secundários (WANG *et al.*, 2017).

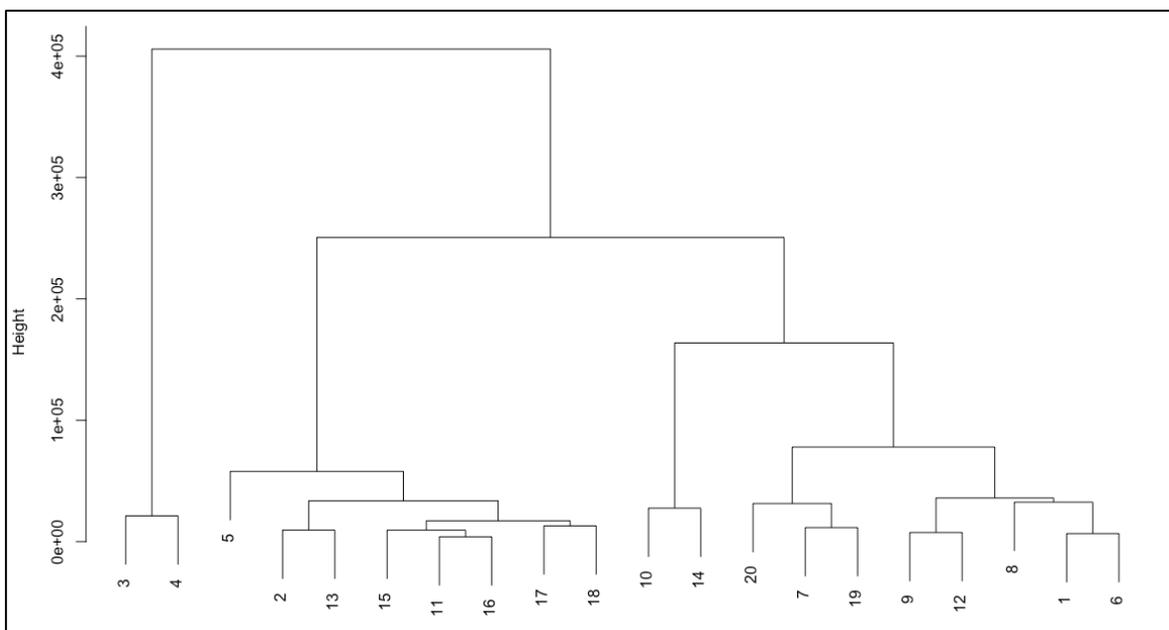


Figura x. Gráfico de ordenação hierárquico de clusters (HCA) das regiões do espectro dos sinais do iridoide nos calos elicitados de *D. macrophylla*: 1. Dm-100 K, 2. Dm-100 Na, 3. Dm-10 Al, 4. Dm-15 Al, 5. Dm-200 K, 6. Dm-200Na, 7. Dm-25 Al, 8. Dm-50 K, 9. Dm-50 Na, 10. Dm-10 S, 11. Dm-20 S, 12. Dm-30 S, 13. Dm-3 A, 14. Dm-5 S, 15. Dm-6 A, 16. Dm-9 A, 17. Dm-10 UV, 18. Dm-25 UV, 19. Dm-45 UV, 20. Dm-Controle.

Muitos estudos tem relatado o uso do $AlCl_3$ como elicitor de alcaloides em culturas *in vitro* das espécies *Brugmansia candida* (SPOLLANSKY; PITTA-ALVAREZ; GIULIETTI, 2000) *Rauvolfia serpentina* (ZAFAR *et al.*, 2017) e *Datura metel* (AJUNGLA *et al.*, 2009), assim como o uso de SNP como doador da molécula sinalizadora em *Catharantus roseus* (XU e DONG, 2005).

Os iridoídes são monoterpênos que junto com o triptofano, são precursores biossintéticos dos alcaloides indólicos (DEWICK, 2002). O fato de que culturas *in vitro* de calos de *D. macrophylla* produzam iridoídes, em conjunto com os estudo de Coelho (2019), no qual é descrito que calos da espécie possuem enzimas da rota biossintética dos alcaloides indólicos, é um resultado muito importante, já que

as culturas *in vitro* de células além de serem fontes inesgotáveis de material vegetal (LILA, 2005), permitem a continuação de estudos com a planta, sob condições controladas, visando a produção de alcaloides sem necessidade de coletar a planta selvagem.

Em relação a técnica de elicitação, uma outra alternativa seria usar o próprio iridoide como elicitor, já que aumentaria sua concentração na cultura provocando um estresse nas células. Esse último pode ser reforçado com os resultados observados nos microextratos das plântulas do viveiro, que mostraram que quando o teor do iridoide foi alto, foram encontrados hidrogênios que possivelmente pertencem a alcaloides. Estudos de elicitação têm demonstrado que o uso de iridoídes como precursores de origem terpenoide promove a formação de alcaloides indólicos em culturas de células em suspensão de *Catharantus roseus* (MORENO; HEIDJEN; VERPOORTE, 1993).

No entanto, um dos principais obstáculos para a produção de metabólitos secundários em cultura de tecidos vegetais utilizando elicitores é o pouco conhecimento das complexas rotas biossintéticas. É necessário conhecer como as culturas respondem a distintos estresses (elicitores) para poder desenhar estratégias para a otimização da produção dos metabólitos (RAMIREZ-ESTRADA, 2016).

Os resultados deste trabalho criam uma perspectiva geral do comportamento das células de calos de *D. macrophylla* quando são submetidos a distintos estresses. Foi observado que os calos sofrem maior estresse e, portanto, tem maior resposta à produção de metabólitos secundários quando são expostos a metais tóxicos como o alumínio e a moléculas sinalizadoras como o óxido nítrico. É importante realizar maiores estudos enquanto as condições de cultura, níveis de reguladores de crescimento, usar outro tipo de elicitores, alterar outras concentrações e tempo de exposição dos mesmos, para poder otimizar os resultados para a produção de metabólitos secundários.

O sistema de cultura de calos, tem sido utilizado com menor frequência nos estudos de metabólitos secundários em culturas de tecidos vegetais, apenas para avaliar o efeito de elicitores para a produção de metabólitos secundários (GIRI e

ZAHEER, 2016). As suspensões celulares de *D. macrophylla* demonstraram ser um bom sistema de obtenção de biomassa da espécie, porém, é necessário realizar estudos para fornecer as melhores condições para a produção de metabólitos secundários de interesse.

Uma das principais abordagens que poderiam ser realizadas com a espécie é a seleção de linhas celulares que elevem a acumulação de metabólitos secundários. A escolha dessas linhas celulares deve ocorrer desde a coleta da planta mãe de onde serão obtidos os explantes para o estabelecimento *in vitro*, já que tem sido comprovado que plantas com altos e baixos níveis de produção de metabólitos secundários conservam sua alta ou baixa produção até por quatro gerações (BIERE; MARAK; VAN DAMME, 2004). Após deverão ser selecionadas as linhas celulares de calos com melhor crescimento e produção de metabólitos secundários para estabelecer as suspensões celulares (ZHONG, 2001).

5 CONCLUSÕES

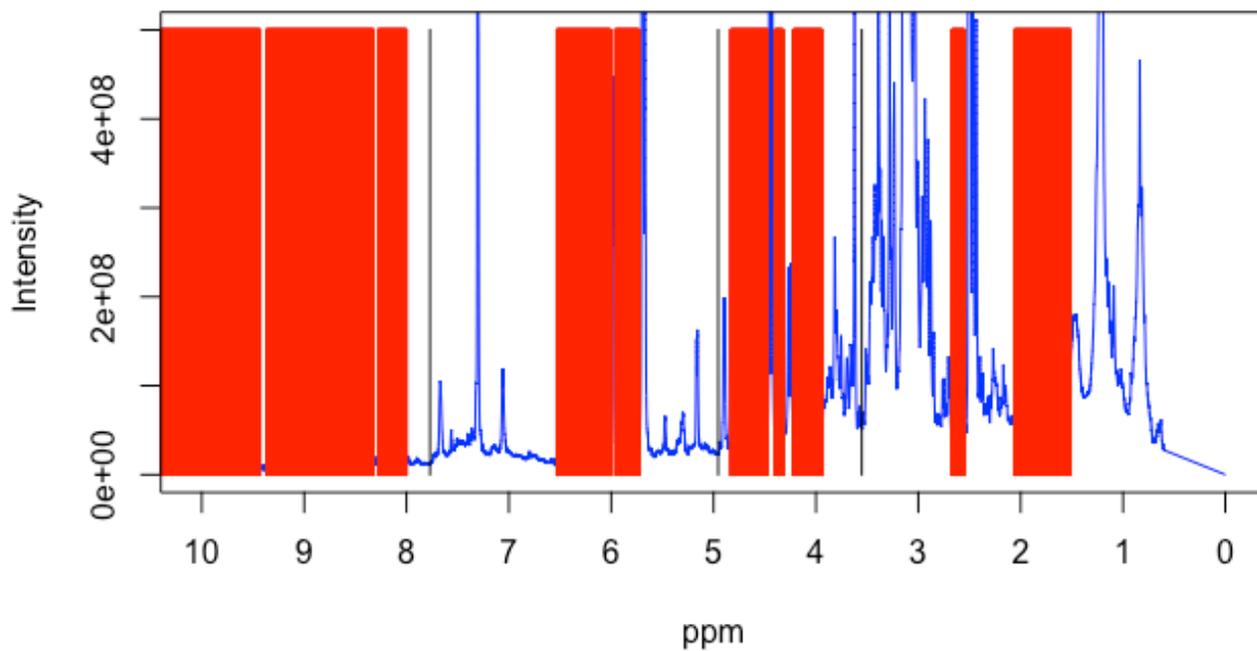
- As sementes e as plantas em estágio juvenil *in vitro* e *ex vitro* de *D. macrophylla* são produtoras de iridoides.
- As sementes de *D. macrophylla* são um bom explante para o estabelecimento *in vitro* da espécie.
- Concentrações baixas de ANA e BAP promovem a formação de calos semifriáveis de *D. macrophylla*.
- Os calos de *D. macrophylla* produzem substâncias de origem terpenoide, como iridoides e substâncias fenólicas.
- As suspensões celulares de *D. macrophylla* não são produtoras de iridoides.
- As suspensões celulares de *D. macrophylla* são uma fonte promissora de biomassa da espécie.
- O AlCl_3 e o NO promovem a produção de metabólitos secundários nos calos de *D. macrophylla*.

6 ANEXOS

ANEXO 1

Regiões dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos das plântulas germinadas tanto *in vitro* como *ex vitro*, sementes e tegumentos analisadas na PCA. As excluídas se apresentam em vermelho.

Área do espectro	Faixa (ppm)
1	0,6-1.51
2	2.06-2.55
3	2.67-3.94
4	4.22-4.32
5	4.4-4.47
6	4.83-5.73
7	5.96-6.01
8	6.53-8,0
9	8,28-8,32
10	9.37-9.43
11	10.44-10.51



ANEXO 2

Valores em ppm dos *loadings* dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos das plântulas germinadas tanto *in vitro* como *ex vitro*, sementes e tegumentos analisadas na PCA.

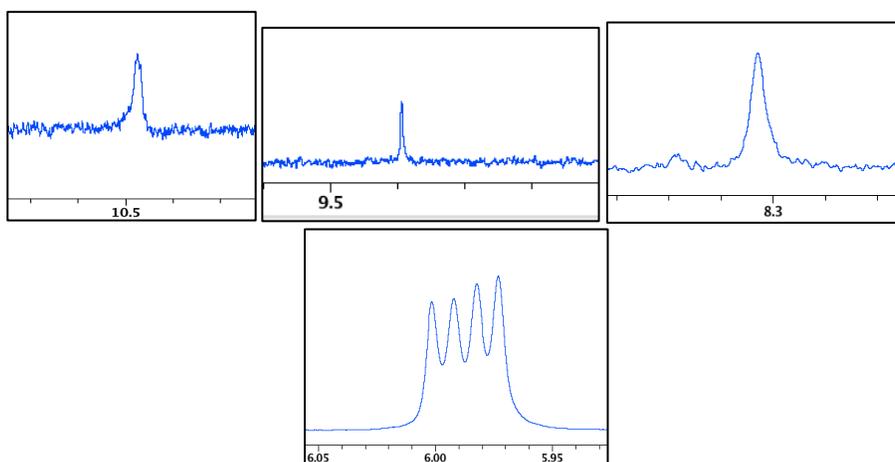
Loading	Região do espectro δ_{H} (ppm)	Loading	Região do espectro δ_{H} (ppm)	Loading	Região do espectro δ_{H} (ppm)
1	10,51-10,45	48	5,58-5,56	95	3,05-2,99
2	10,45-10,44	49	5,56-5,50	96	2,99-2,98
3	10,44-9,38	50	5,50-5,49	97	2,98-2,91
4	9,38-8,28	51	5,49-5,42	98	2,91-2,88
5	8,28-7,95	52	5,42-5,38	99	2,88-2,83
6	7,95-7,92	53	5,38-5,38	100	2,83-2,81
7	7,92-7,91	54	5,38-5,33	101	2,81-2,77
8	7,91-7,85	55	5,33-5,26	102	2,77-2,74
9	7,85-7,82	56	5,26-5,24	103	2,74-2,68
10	7,82-7,77	57	5,24-5,21	104	2,68-2,54
11	7,77-7,76	58	5,21-5,18	105	2,54-2,52
12	7,76-7,70	59	5,18-5,11	106	2,52-2,44
13	7,70-7,64	60	5,11-5,09	107	2,44-2,40
14	7,64-7,60	61	5,09-5,04	108	2,40-2,39
15	7,60-7,60	62	5,04-5,02	109	2,39-2,35
16	7,60-7,53	63	5,02-4,95	110	2,35-2,30
17	7,53-7,52	64	4,95-4,95	111	2,30-2,29
18	7,52-7,47	65	4,95-4,91	112	2,29-2,21
19	7,47-7,42	66	4,91-4,85	113	2,21-2,20
20	7,42-7,38	67	4,85-4,83	114	2,20-2,13
21	7,38-7,36	68	4,83-4,40	115	2,13-2,10
22	7,36-7,33	69	4,40-4,31	116	2,10-2,-06
23	7,33-7,25	70	4,31-4,28	117	2,06-1,50
24	7,25-7,21	71	4,28-3,93	118	1,50-1,43
25	7,21-7,21	72	3,93-3,92	119	1,43-1,39
26	7,21-7,17	73	3,92-3,87	120	1,39-1,37
27	7,17-7,11	74	3,87-3,84	121	1,37-1,35
28	7,11-7,09	75	3,84-3,77	122	1,35-1,31
29	7,09-7,02	76	3,77-3,73	123	1,31-1,27
30	7,02-6,98	77	3,73-3,72	124	1,27-1,23
31	6,98-6,94	78	3,72-3,67	125	1,23-1,16

32	6,94-6,94	79	3,67-3,64	126	1,16-1,12
33	6,94-6,88	80	3,64-3,59	127	1,12-1,10
34	6,88-6,84	81	3,59-3,55	128	1,10-1,04
35	6,84-6,82	82	3,55-3,53	129	1,04-1,00
36	6,82-6,78	83	3,53-3,48	130	1,00-0,97
37	6,78-6,71	84	3,48-3,45	131	0,97-0,94
38	6,71-6,69	85	3,45-3,41	132	0,94-0,92
39	6,69-6,66	86	3,41-3,34	133	0,92-0,88
40	6,66-6,60	87	3,34-3,31	134	0,88-0,82
41	6,60-6,57	88	3,31-3,30	135	0,82-0,77
42	6,57-6,53	89	3,30-3,25	136	0,77-0,73
43	6,53-5,96	90	3,25-3,20	137	0,73-0,70
44	5,96-5,72	91	3,20-3,18	138	0,70-0,68
45	5,72-5,65	92	3,18-3,14	139	0,69-0,00
46	5,65-5,62	93	2,14-3,10		
47	5,62-5,58	94	3,10-3,05		

ANEXO 3

Sinais do iridoide e dos hidrogênios ligados a nitrogênio dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos das plântulas germinadas tanto *in vitro* como *ex vitro*, sementes e tegumentos analisadas na PCA. As excluídas se apresentam em vermelho na imagem do espectro.

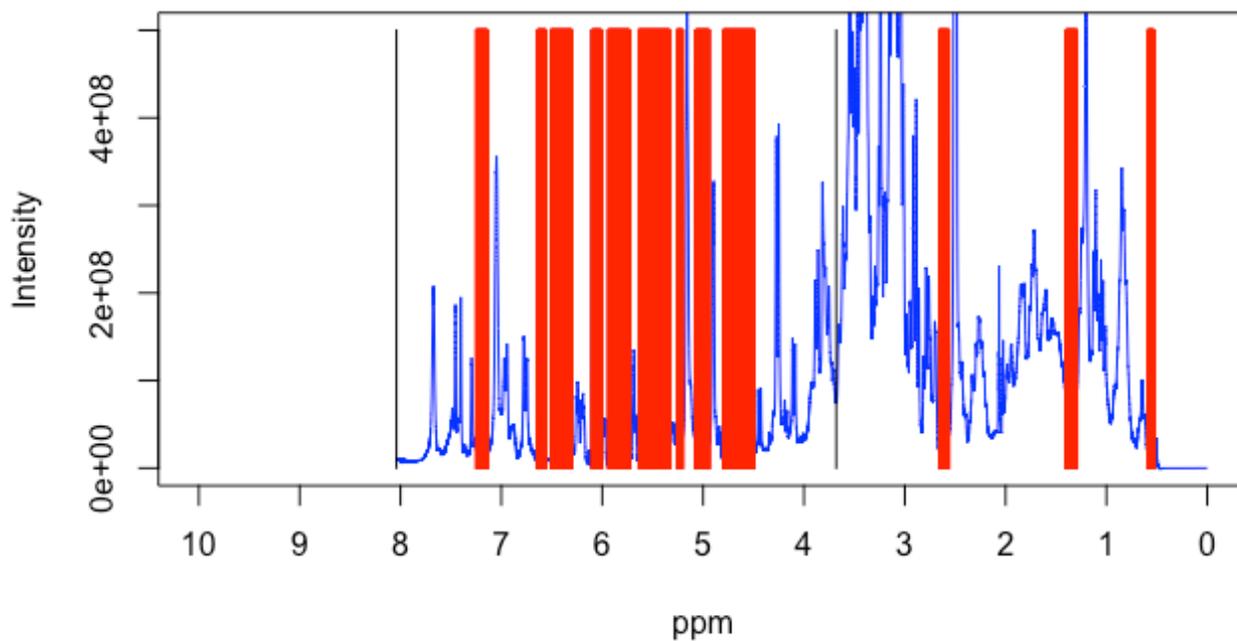
Área do espectro	Faixa (ppm)
1	5.96-6.01
2	9.37-9.42
3	8.28-8.32
4	10.44-10.56



ANEXO 4

Regiões dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos dos calos de *D. macrophylla* elicitados, analisadas na PCA. As regiões excluídas se apresentam em vermelho na imagem do espectro.

Área do espectro	Faixa (ppm)
1	0,45 - 0,53
2	0,59 - 1,29
3	1,40 - 2,56
4	2,66 - 4,49
5	4,8 - 4,94
6	5,07 - 5,2
7	5,26 - 5,33
8	5,64 - 5,73
9	5,94 - 6,01
10	6,10 - 6,30
11	6,51 - 6,56
12	6,64 - 7,14
13	7,25 - 8,04



ANEXO 5

Valores em ppm dos *loadings* dos sinais selecionados dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos dos calos elicitados, analisados na PCA.

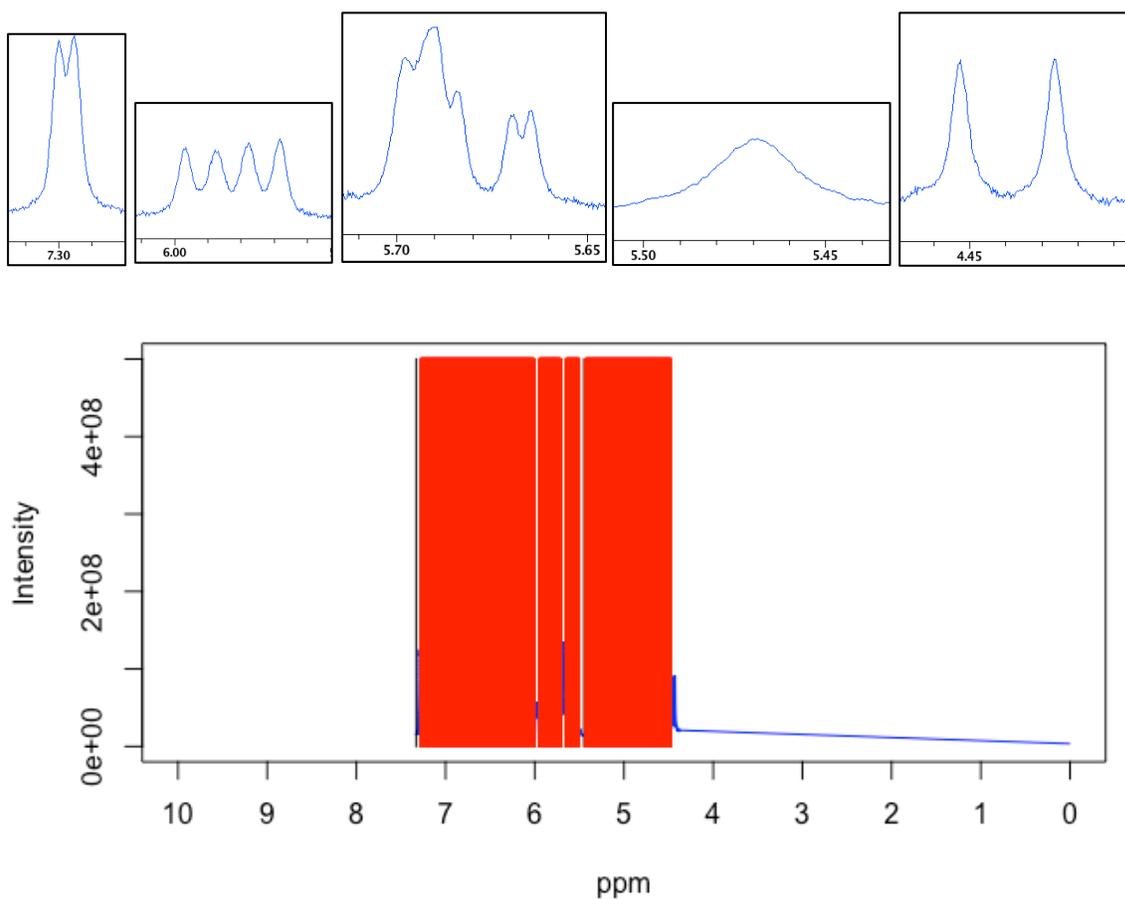
Loading	Região do espectro δ_{H} (ppm)	Loading	Região do espectro δ_{H} (ppm)	Loading	Região do espectro δ_{H} (ppm)
1	8,04-7,98	38	4,80-4,47	75	2,46-2,41
2	7,98-7,94	39	4,47-4,38	76	2,41-2,37
3	7,94-7,88	40	4,38-4,37	77	2,37-2,36
4	7,88-7,84	41	4,37-4,32	78	2,36-2,30
5	7,84-7,80	42	4,32-4,22	79	2,30-2,21
6	7,80-7,75	43	4,22-4,17	80	2,21-2,15
7	7,75-7,70	44	4,17-4,15	81	2,15-2,14
8	7,70-7,60	45	4,15-4,07	82	2,14-2,08
9	7,60-7,58	46	4,07-4,05	83	2,08-2,04
10	7,58-7,54	47	4,05-4,01	84	2,04-2,00
11	7,54-7,46	48	4,01-3,96	85	2,00-1,91
12	7,46-7,44	49	3,96-3,91	86	1,91-1,89
13	7,44-7,34	50	3,91-3,84	87	1,89-1,79
14	7,34-7,33	51	3,84-3,77	88	1,79-1,79
15	7,33-7,13	52	3,77-3,71	89	1,79-1,69
16	7,13-7,12	53	3,71-3,67	90	1,69-1,65
17	7,12-7,07	54	3,67-3,63	91	1,65-1,58
18	7,07-6,99	55	3,63-3,59	92	1,58-1,56
19	6,99-6,91	56	3,59-3,50	93	1,56-1,50
20	6,91-6,91	57	3,50-3,48	94	1,50-1,43
21	6,91-6,83	58	3,48-3,44	95	1,43-1,40
22	6,83-6,81	59	3,44-3,35	96	1,40-1,26
23	6,81-6,71	60	3,35-3,33	97	1,26-1,16
24	6,71-6,66	61	3,33-3,28	98	1,16-1,15
25	6,66-6,55	62	3,28-3,21	99	1,15-1,06
26	6,55-6,51	63	3,21-3,18	100	1,06-1,02
27	6,51-6,14	64	3,18-3,13	101	1,02-0,95
28	6,14-6,10	65	3,13-3,06	102	0,95-0,95
29	6,10-5,94	66	3,06-2,99	103	0,95-0,90
30	5,94-5,71	67	2,99-2,96	104	0,90-0,80
31	5,71-5,64	68	2,96-2,93	105	0,80-0,75
32	5,64-5,26	69	2,93-2,83	106	0,75-0,70
33	5,26-5,18	70	2,83-2,82	107	0,70-0,69

34	5,18-5,08	71	2,82-2,72	108	0,69-0,59
35	5,08-5,07	72	2,72-2,67	109	0,59-0,48
36	5,07-4,85	73	2,67-2,66	110	0,48-0,00
37	4,85-4,80	74	2,66-2,46		

ANEXO 6

Sinais do iridoide nos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos dos calos de *D. macrophylla* elicitados, analisadas na PCA . As regiões excluídas se apresentam em vermelho na imagem do espectro.

Área do espectro	Faixa (ppm)
1	4.37-4.47
2	5.43-5.5
3	5.65-5.71
4	5.95-6.01
5	7.28-7.33



7. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M. A. *et al.* Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 54, n. 3, p. 173–182, 1998.

AHMAD, S. *et al.* In vitro production of alkaloids: Factors, approaches, challenges and prospects. *Pharmacognosy Reviews*, v. 7, n. 1, p. 27, 2013.

AJUNGLA, L. *et al.* Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 3, p. 317–322, 2009.

AL-KHAYRI, J. M. Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v. 24, n. 5, p. 444–455, 2012.

ALMEIDA, J. A. S. *et al.* Improving hierarchical cluster analysis: A new method with outlier detection and automatic clustering. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 87, n. 2, p. 208–217, 2007.

ANDRADE, J. B.; NUNEZ, C. V. Isolamento e identificação de 5-hidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona, lupeol e β -sitosterol de *Duroia saccifera* (Rubiaceae). II SIMPÓSIO REGIONAL NORTE DE FARMACOGNOSIA. Anais...2018

ANJUSHA, S.; GANGAPRASAD, A. Callus culture and in vitro production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae). *Industrial Crops and Products*, v. 95, p. 608–614, 2017.

ANTOGNONI, F. *et al.* Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*, v. 78, n. 5, p. 345–352, 2007.

AQUINO, R. *et al.* New 3-Methoxyflavones, an Iridoid Lactone and a Flavonol from *Duroia hirsuta*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 560–562, 1999.

ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, v. 172, n. 5, p. 876–887, 2007.

ARMIJOS-GONZÁLEZ, R.; PÉREZ-RUIZ, C. *In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae). *Journal of Forestry Research*, v. 27, n. 6, p. 1229–1236, 2016.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BANERJEE, P. *et al.* Super Natural II-a database of natural products. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. D1, p. D935–D939, 2015.

BAQUE, M. A.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. *In Vitro*

- Cellular and Developmental Biology - Plant, v. 46, n. 1, p. 71–80, 2010.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*, v. 13, n. 1, p. 29–39, 1990.
- BARRUETO CID, L. P. El Cultivo de Tejidos: Antecedentes Históricos Del Cultivo De Tejidos Vegetales. In: PRIETO, H. et al. (Eds.). *Biotechnología Vegetal*. 1. ed. Santiago de Chile: [s.n.].
- BARRUETO CID, L. P.; BATISTA TEIXEIRA, J. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). *Cultivo in vitro de Plantas*. 3a edição ed. Brasília, D.F.: Embrapa, 2014. p. 17–45.
- BECKMAN, N. G. The Distribution of Fruit and Seed Toxicity during Development for Eleven Neotropical Trees and Vines in Central Panama. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, 2013.
- BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, v. 127, n. 4, p. 617–633, 1994.
- BERNARDES, L. S. C. et al. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). *Farmacognosia: do produto ao medicamento*. Porto Alegre: artmed, 2017. p. 107–128.
- BEZDEK, J. C.; EHRlich, R.; FULL, W. FCM: The Fuzzy C-Means Clustering Algorithm. *Computers and Geosciences*, v. 10, n. 2–3, p. 191–203, 1984.
- BIERE, A.; MARAK, H. B.; VAN DAMME, J. M. M. Plant chemical defense against herbivores and pathogens: Generalized defense or trade-offs. *Oecologia*, v. 140, n. 3, p. 430–441, 2004.
- BINDER, B. Y. K. et al. The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnology Progress*, v. 25, n. 3, p. 861–865, 2009.
- BORNMAN, C. H. et al. *Nicotiana tabacum* Callus Studies IV. Anatomy and Differentiation of Vascular Tissue. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v. 82, n. 5, p. 396–406, 1976.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science*, v. 161, p. 839–851, 2001.
- BRAGA, F. C.; RATES, S. M. K.; SIMÕES, C. M. O. Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). *Farmacognosia: do produto ao medicamento*. Porto Alegre: artmed, 2017. p. 53–68.
- BRERETON, R. G. *Applied chemometrics for Scientists*. 1. ed. England: John Wiley and Sons, Ltd, 2007.
- BRILHANTE, A. B. DE S. *Cultura De Calos E Suspensão Celular Da Espécie Duroia saccifera: Estudo Fitoquímico, Cinética De Crescimento E Avaliação Das Atividades Biológicas*. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2018.
- BUSTO, V. D. et al. Anthraquinones production in *Rubia tinctorum* cell suspension

- cultures: Down scale of shear effects. *Biochemical Engineering Journal*, v. 77, p. 119–128, 2013.
- CELEDÓN, P. A. F.; KOBAYASHI, A. K.; VIEIRA, L. G. E. Nutrient utilization by cotton cell suspension cultures. *Scientia Agricola*, v. 57, n. 3, p. 431–437, 2000.
- CETIN, E. S. Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. Öküzgözü callus cultures. *Biological Research*, v. 47, n. 1, 2014.
- CHAHAR, M. *et al.* Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews*, v. 5, n. 9, p. 1, 2011.
- CHAWLA, H. . Introduction to Plant biotechnology. 3. ed. [s.l.] Science Publishers, 2009.
- CHEN, Q. *et al.* Interaction between abscisic acid and nitric oxide in PB90-induced catharanthine biosynthesis of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Biotechnology Progress*, v. 29, n. 4, p. 994–1001, 2013.
- CHIAVEGATTO, R. B. *et al.* Cell Viability, Mitotic Index and Callus Morphology of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae). *Tropical Plant Biology*, v. 8, n. 3–4, p. 87–97, 2015.
- CHOI, Y. H. *et al.* Metabolic Discrimination of *Catharanthus roseus* Leaves Infected by *Phytoplasma* Using ¹H-NMR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *Plant Physiology*, v. 135, n. 4, p. 2398–2410, 2004.
- CHU, D.; BARNES, D. J. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Scientific Reports*, v. 6, n. December 2015, p. 1–15, 2016.
- COELHO, L. M. Análise Proteômica De Calos, Folhas E Galhos De *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2019.
- CONTRERAS-MEJÍA, J. A. Estudo Fitoquímico Do Extrato Hexânico Das Folhas De *Duroia saccifera* (Mart. ex Roem & Schult.) Hook. f. ex Schumann (RUBIACEAE). [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2017.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). . *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. [s.l.] American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 5–8.
- CRUZ, F. S. DA; ARAÚJO, M. G. P. DE; NUNEZ, C. V. Leaves of *Duroia longiflora*: Isolation of a Biflavanoid and Histochemical Analysis. *Natural Product Communications*, v. 14, n. 0, p. 1–2, 2019.
- DAMTOFT, S. *et al.* ¹³C and ¹H NMR spectroscopy as a tool in the configurational analysis of iridoid glucosides. *Phytochemistry*, v. 20, n. 12, p. 2717–2732, 1981.
- DAVEY, M. Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 3
- DEWIK, P. M. Medicinal Natrual Products: A Biosynthetic Approach. 2. ed. England: John Wiley and Sons, Ltd, 2002.

- DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant Cell And Tissue Culture: Alternatives For Metabolite Production. *Biotechnology Advances*, v. 13, n. 3, p. 425–453, 1995.
- DINDA, B.; CHOWDHURY, D. R.; MOHANTA, B. C. Naturally Occurring Iridoids, Secoiridoids and Their Bioactivity. An Updated Review, Part 3. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 57, n. 8, p. 765–796, 2009.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; BANIK, R. Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. An Updated Review, Part 4. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 59, n. 7, p. 803–833, 2011.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, v. 55, n. 2, p. 159–222, 2007a.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, v. 55, n. 5, p. 689–728, 2007b.
- DOMINGOS, P. et al. Nitric oxide: A multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant*, v. 8, n. 4, p. 506–520, 2015.
- DOWNS, G. M.; BARNARD, J. M. Clustering Methods and Their Uses in Computational Chemistry. In: LIPKOWITZ, K. B.; BOYD, D. B. (Eds.). *Reviews in Computational Chemistry, Volume 18*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002. v. 18.
- EL-NAGGAR, L. J.; BEAL, J. L. Iridoids. a review. *Journal of Natural Products*, v. 43, n. 6, p. 649–707, 1980.
- EVANS, W. C. *Trease and Evans Pharmacognosy*. 16. ed. [s.l.] Elsevier, 2009.
- FINKELSTEIN, R. R.; ROCK, C. D. Abscisic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, v. 1, n. Figure 2, p. e0058, 2002.
- FRANÇA, S. DE C. Bioprocessos inovadores para a produção de metabólitos ativos de plantas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). *Farmacognosia: do produto ao medicamento*. Porto Alegre: artmed, 2017. p. 39–52.
- FUMAGALI, E. et al. Revisão tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n. August, p. 627–641, 2008.
- FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, v. 44, n. 2, p. 153–159, 1981.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v. 50, n. 1, p. 151–158, 1968.
- GEISSMAN, T. A.; GRIFFIN, T. S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. *Phytochemistry*, v. 10, p. 2475–2485, 1971.
- GHISALBERTI, E. L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring

- iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, v. 5, n. 2, p. 147–163, 1998.
- GIRI, C. C.; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores De Influência No Conteúdo De Metabólitos Secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GOMEZ, Y. R. Química y Farmacología de Iridoides. n. July, 2016.
- GREGIANINI, T. S. et al. The Alkaloid Brachycerine is Induced by Ultraviolet Radiation and is a Singlet Oxygen Quencher. *Photochemistry and Photobiology*, v. 78, n. 5, p. 470–474, 2007.
- GROUT, B. General Principles of Tissue Culture. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 2
- GRYCOVA, L. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry Reviews*, v. 68, p. 150–175, 2007.
- HAMID, H. A.; RAMLI, A. N. M.; YUSOFF, M. M. Indole alkaloids from plants as potential leads for antidepressant drugs: A mini review. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, 2017.
- HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 80, n. 1, p. 177–188, 1996.
- HUSSAIN, A. et al. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A.; RINALDI, L. M. R. (Eds.). . *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. Pakistan: InTech, 2012. p. 0–28.
- IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, v. 25, n. 9, p. 3159–3173, 2013.
- INDU, S. et al. Production of Flavonoids in Callus Culture of *Anthocephalus indicus* A. Rich. *Asian Journal of Plant Sciences*, v. 12, n. 1, p. 40–45, 2013.
- JHA, S. et al. Production of emetine and cephaeline from cell suspension and excised root cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3999–4003, 1991.
- JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. New York: Mc.Graw-Hill, 1940.
- KHAN, J. A. et al. Effect of Light and Dark Culture Conditions on Callus Induction and Growth in Citrus (*Citrus reticulata* Blanco.). *Int. J. Biol. Biotech*, v. 3, n. 4, p. 669–672, 2006.
- KLEIN-JÚNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). . *Farmacognosia: do produto ao medicamento*. Porto Alegre: artmed, 2017. p. 305–316.
- KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, v. 15, n.

4, p. 281–307, 2005.

LACKMAN, P. *et al.* Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in Arabidopsis and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 14, p. 5891–5896, 2011.

LAW, K. H.; DAS, N. P. Production of (-)-epicatechin by *Uncaria elliptica* callus cultures. *Phytochemistry*, v. 28, n. 4, p. 1099–1100, 1989.

LEDÜC, C.; RUHNAU, P.; LEISTNER, E. Isochorismate hydroxymutase from Rubiaceae cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, v. 10, n. 6–7, p. 334–337, 1991.

LEE, T. K.; LEE, W. S. Diauxic Growth in Rice Suspension Cells Grown on Mixed Carbon Sources of Acetate and Glucose. *Plant Physiology*, v. 110, n. 2, p. 465–470, 1996.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 14, n. 2, p. 83–109, 1995.

LILA, M. A. Valuable Secondary Products from In Vitro Culture. In: TRIGIANO, R. N.; GTAY, D. J. (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*. 1. ed. New York: CRC Press, 2005. p. 358.

LINDEN, J. *et al.* Gas Concentration Effects on Secondary Metabolite Production by Plant Cell Culture. In: SCHEPER, T.; ZHONG, J.-J. (Eds.). *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: Plant Cells*. [s.l.] Springer, 2001.

LITZ, R. E.; JARRET, R. L. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. 1. ed. Cali: [s.n.]. p. 143–157.

LIU, S. *et al.* Beneficial behavior of nitric oxide in copper-treated medicinal plants. *Journal of Hazardous Materials*, v. 314, p. 140–154, 2016.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. *Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot-Tip Culture*. *Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society*, v. 30, p. 421–427, 1980.

LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, n. 2–3, p. 189–196, 2001.

LOYOLA-VARGAS, V. M. *et al.* Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Revista Sociedad Química Mexicana*, v. 48, p. 67–94, 2004.

MARTINS, D. *et al.* Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *BioMed Research International*, v. 2013, n. 605831, p. 7 pages, 2013.

MARTINS, D. Estudo Químico E Biológico DE *Duroia macrophylla* Huber(RUBIACEAE). [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2014.

- MARTINS, D. *et al.* Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). Journal of Pharmacy & Phamacognosy Research, v. 2, n. 6, p. 158–171, 2014.
- MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. Molecules, v. 20, p. 13422–13495, 2015.
- MENDOZA, H.; RAMÍREZ P, B. R.; JIMÉNEZ, L. C. Rubiaceae de Colombia: Guía ilustrada de géneros. stituto de Investigaci ón de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia: Ramos López Editorial, 2004.
- MIAO, G. PENG *et al.* Aggregate cell suspension cultures of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. for triptolide, wilforgine, and wilforine production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 112, n. 1, p. 109–116, 2013.
- MOON, S. H. *et al.* Antioxidant and anticancer potential of bioactive compounds following UV- C light-induced plant cambium meristematic cell cultures. Industrial Crops & Products, v. 109, n. September, p. 762–772, 2017.
- MORARD, P.; HENRY, M. Optimization of the mineral composition of in vitro culture media. Journal of Plant Nutrition, v. 21, n. 8, p. 1565–1576, 1998.
- MORENO, P. R. H.; HEIJDEN, R. VAN DER; VERPOORTE, R. Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of ... PlantCell Reports. Plant Cell Reports, v. 12, n. 12, p. 702–705, 1993.
- MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. Acta Biochimica Polonica, v. 48, n. 3, p. 673–686, 2001.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco tissue Cultures. Physiologia Plantarum, v. 15, p. 473–497, 1962.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 118, n. 1, p. 1–16, 2014.
- MUSTAFA, N. R. *et al.* Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nature Protocols, v. 6, n. 6, p. 715–742, 2011.
- NAGATOSHI, M. *et al.* Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*. Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 37, p. 32866–32874, 2011.
- NAMDEO, A. G. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites : A Review. Pharmacognosy reviews, v. 1, n. 1, p. 69–79, 2007.
- NASCIMENTO, N. C. DO *et al.* Accumulation of brachycerine, an antioxidant glucosidic indole alkaloid, is induced by abscisic acid, heavy metal, and osmotic stress inleaves of *Psychotria brachyceras*. Plant Physiology and Biochemistry, v. 73, p. 33–40, 2013.
- NUNEZ, C. *et al.* Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). Planta Medica, v. 75, n. 09, p. 15–16, 2009.

NUNEZ, C. V.; VASCONCELLOS, M. C. DE. Composição Farmacêutica Antitumoral Compreendendo Alcalóide, Processo Para Sua Obtenção, E Seu Uso Brasil, 2012.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. J. F. *et al.* Cell wall polysaccharides from cell suspension cultures of the Atlantic Forest tree *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae). *Trees*, v. 24, n. 4, p. 713–722, 2010.

OMAR, R. *et al.* Kinetics and modelling of cell growth and substrate uptake in *Centella asiatica* cell culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 11, n. 3, p. 223–229, 2006.

OSAWA, H.; MATSUMOTO, H. Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. *Plant Physiology*, v. 126, n. 1, p. 411–420, 2001.

PAGE, J. E.; MADRINAN, S.; TOWERS, G. H. N. Identification of a Plant-Growth Inhibiting Iridoid Lactone From *Duroia hirsuta*, the Allelopathic Tree of the Devils-Garden. *Experientia*, v. 50, n. 9, p. 840–842, 1994.

PATEL, H.; KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in Plant Tissue Culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 2, n. 2, p. 60–65, 2013.

PEREIRA, A. C. *et al.* Purification of an antibacterial compound from *Lantana lilacina*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n. 2, p. 204–208, 2008.

PÉREZ-ALONSO, N.; JIMÉNEZ, E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, v. 11, n. 4, p. 195–211, 2011.

PIĄTCZAK, E.; GRĄBKOWSKA, R.; WYSOKIŃSKA, H. Production of Iridoid and Phenylethanoid Glycosides by In Vitro Systems of Plants from the Buddlejaceae, Orobanchaceae, and Scrophulariaceae Families. *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*, p. 1–23, 2018.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 20, n. 2, p. 101–153, 2002.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

RAMANI, S.; CHELLIAH, J. UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *BMC plant biology*, v. 7, p. 61, 2007.

RAMIREZ-ESTRADA, K. *et al.* Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, v. 21, n. 2, 2016.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 5. ed. New

York: Worth Publishers, 1992.

REIS, A. J. *et al.* Evaluation of antifungal, antimycobacterial and larvicide activity of the *Duroia macrophylla* and *D. saccifera*. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 1, n. 1, p. 108–124, 2016.

RIBEIRO, J. E. L. DA S. *et al.* Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID, 1999.

SANADHYA, I. Enhanced Production of Alkaloid, a Bioactive Compound in *in vitro* Culture System of *Anthocephalus Indicus* a. Rich. *Journal of International Academic Research for Multidisciplinary*, v. 393, n. 4, 2014.

SCHELER, C.; DURNER, J.; ASTIER, J. Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 16, n. 4, p. 534–539, 2013.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D. Alcaloides indólicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Eds.). *Farmacognosia: do produto ao medicamento*. Porto Alegre: artmed, 2017. p. 367–388.

SENA, M. M. DE *et al.* Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Quimica Nova*, v. 23, n. 4, p. 547–556, 2000.

SEYDEL, P.; DÖRNENBURG, H. Establishment of *in vitro* plants, cell and tissue cultures from *Oldenlandia affinis* for the production of cyclic peptides. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 85, n. 3, p. 247–255, 2006.

SHILPA, K.; VARUN, K.; LAKSHIMI, B. S. An alternate Method of Natural Drug Production: Eliciting Secondary Metabolite Production Using Plant Cell Culture. *Journal of Plant Sciences*, v. 5, n. 3, p. 222–247, 2010.

SIDDIQUE, A. B.; ISLAM, S. S. Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bangladesh Journal of Botany*, v. 44, n. 4, p. 643–651, 2015.

SIEWEKE, H. J.; LEISTNER, E. O-succinylbenzoate: Coenzyme a ligase from anthraquinone producing cell suspension cultures of *Galium mollugo*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, p. 2329–2335, 1992.

SIMÕES, C. *et al.* Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 47, n. 10, p. 895–903, 2009.

SKOOG, F.; MILLER, C. . Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultured *in Vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, v. 11, p. 118–131, 1957.

SMITH, R. H. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3. ed. USA: Elsevier, 2013.

SOORNI, J.; KAHRIZI, D.; MOLSAGHI, M. The effects of Photoperiod and 2,4-D Concentrations on Callus Induction of *Cuminum cyminum* Leaf Explant: An

Important Medicinal Plant. Asian Journal of Botanical Sciences, v. 5, n. 7, p. 378–383, 2012.

SOUZA, J. C. DE. Obtenção De Calos De *Duroia Saccifera* Hook . F . Obtenção De Calos De *Duroia saccifera* Hook . F .(Rubiaceae), Estudo Químico E Avaliação Biológica Dos Seus Extratos. [s.l.] Universidade Federal Do Amazonas, 2016.

SOUZA, R. R. DE et al. Optimization of jenipapo in vitro seed germination process. Ciência e Agrotecnologia, v. 40, n. 6, p. 658–664, 2016.

SOLLANSKY, T. C.; PITTA-ALVAREZ, S. I.; GIULIETTI, A. M. Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Electronic Journal of Biotechnology, v. 3, n. 1, p. 31–32, 2000.

STELLA, A.; BRAGA, M. R. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 68, n. 3, p. 271–276, 2002.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. Phytochemistry, v. 62, n. 6, p. 817–836, 2003.

SZABADOS, L.; MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.). . Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. 1. ed. Cali: CIAT(Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991. p. 174–195.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. 5th. ed. [s.l.] artmed, 2010.

TANATA, F. . Estudo Químico Do Extrato Hexânico Das Folhas E Dos Extratos Dos Calos Cultivados In Vitro De *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2017.

TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil : Rubiaceae. Rodriguésia, v. 58, n. 3, p. 549–616, 2007.

THE PLANT LIST .Version 1.1. Publicado na internet; <http://www.theplantlist.org/>. 2019(acessado 18 Janeiro).

THORPE, T. A. History of Plant Cell Culture. In: SMITH, R. H. (Ed.). . Plant Tissue Culture. 3. ed. USA: Elsevier, 2012. p. 1–22.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Publicado na internet; <http://www.tropicos.org>. 2019(acesso em: 18 Janeiro).

TUNDIS, R. et al. Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 8, n. 4, p. 399–420, 2008.

TUTEJA, N.; SOPORY, S. K. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. Plant Signaling and Behavior, v. 3, n. 8, p. 525–536, 2008.

UEDA, S.; IWAHASHI, Y.; TOKUDA, H. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in genipa americana and its cell cultures. Journal of Natural Products, v. 54, n. 6, p. 1677–1680, 1991.

- VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, v. 172, n. 5, p. 861–875, 2007.
- VILJOEN, A.; MNCWANGI, N.; VEERMAK, I. Anti-Inflammatory Iridoids of Botanical Origin. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 14, p. 2104–2127, 2012.
- VILLEGAS, A. *et al.* First principle-based models in plant suspension cell cultures: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 37, n. 8, p. 1077–1089, 2017.
- WANG, J. *et al.* Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, v. 9, n. 2, p. 115–125, 2017.
- WANG, X.; HARRINGTON, P. D. B.; BAUGH, S. F. Comparative study of NMR spectral profiling for the characterization and authentication of cannabis. *Journal of AOAC International*, v. 100, n. 5, p. 1356–1364, 2017.
- WHITEHEAD, S. R.; TIRAMANI, J.; BOWERS, M. D. Iridoid glycosides from fruits reduce the growth of fungi associated with fruit rot. *Journal of Plant Ecology*, v. 9, n. 3, p. 357–366, 2016.
- WINK, M. Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 75, p. 225–233, 1988.
- WINK, M.; ROBERTS, M. F. Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. New York AND LONDON: PLENUM PRESS, 1998.
- WU, J. *et al.* Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR data for 10 phenylethanoid glycosides. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 42, n. 7, p. 659–662, 2004.
- WU, S. *et al.* Nitric Oxide Regulates Shikonin Formation in Suspension-Cultured *Onosma paniculatum* Cells. *Plant and Cell Physiology*, v. 50, n. 1, p. 118–128, 2009.
- XUE, Z.; YANG, B. Phenylethanoid glycosides: Research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics. *Molecules*, v. 21, n. 8, p. 1–25, 2016.
- YA-UT, P.; CHAREONSAP, P.; SUKRONG, S. Micropropagation and hairy root culture of *Ophiorrhiza alata* Craib for camptothecin production. *Biotechnology Letters*, v. 33, n. 12, p. 2519–2526, 2011.
- ZAFAR, N. *et al.* Aluminum chloride elicitation (amendment) improves callus biomass growth and reserpine yield in *Rauvolfia serpentina* leaf callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 130, n. 2, p. 357–368, 2017.
- ZANCA, S. S. Análise Fitoquímica Sazonal e Cultura De Tecidos *in vitro* De *Duroia macrophylla* Huber. [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2015.
- ZENK, M. H.; EL-SHAGI, H.; SCHULTE, U. Anthraquinone Production By Cell Suspension Cultures Of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica Suppl*, 1975.

ZGÓRKA, G. TLC of iridoids. In: WAKSMUNDZKA-JAHNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. (Eds.). . Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. [s.l.] CRC Press Taylor and Francis Group, 2008.

ZHANG, Q. *et al.* Medicinal uses , phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. Journal of Ethnopharmacology, v. 173, n. 9, p. 48–80, 2015.

ZHAO, J. *et al.* Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock. Biotechnology Letters, n. 22, p. 1227–1231, 2000.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, v. 23, n. 4, p. 283–333, 2005.

ZHAO, J.; VERPOORTE, R. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: From biochemical processing to metabolic engineering. Phytochemistry Reviews, v. 6, n. 2–3, p. 435–457, 2005.

ZHONG, J.-J. Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. In: SCHEPER, T.; ZHONG, J.-J. (Eds.). . Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: Plant Cells. [s.l.] Springer, 2001. v. 72p. XIX–XX.

ZULDIN, N. N. M. *et al.* Induction and analysis of the alkaloid mitragynine content of a *Mitragyna speciosa* suspension culture system upon elicitation and precursor feeding. The Scientific World Journal, v. 2013, 2013.