

TD



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E DO PERFIL METABÓLICO DE
EXTRATOS DE CALOS, CÉLULAS EM SUSPENSÃO E RAÍZES DE *Boerhavia*
paniculata POR MEIO DA TÉCNICA DE LIPIDÔMICA**

JOANNE MORAES DE MELO SOUZA

Biblioteca



23670019

**BELÉM - PA
2012**

7226
524
720
24.01

MC. 2364

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E DO PERFIL METABÓLICO DE
EXTRATOS DE CALOS, CÉLULAS EM SUSPENSÃO E RAÍZES DE *Boerhavia*
paniculata POR MEIO DA TÉCNICA DE LIPIDÔMICA**

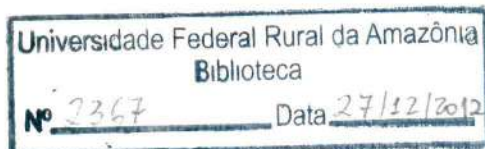
JOANNE MORAES DE MELO SOUZA

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Alberdan Silva Santos

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Química. Área de concentração:
Química Orgânica. Programa de Pós-
Graduação em Química. Universidade Federal
do Pará.

**BELÉM - PA
2012**



Souza, Joanne Moraes de Melo

Avaliação da atividade biológica e do perfil metabólico de extratos de calos, células em suspensão e raízes de *Boerhavia paniculata* por meio da técnica de lipidômica / (Joanne Moraes de Melo Souza); orientador, Alberdan Silva Santos. – 2012.

126 f. il. 28 cm

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Programa de Pós-Graduação em Química. Belém, 2012.

1. Química orgânica. 2. Biotecnologia. 3. Inflamação. I. Santos, Alberdan Silva, orient. II. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

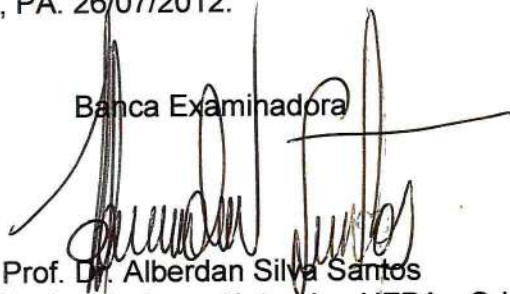
CDD 22. ed. 547

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E DO PERFIL METABÓLICO DE
EXTRATOS DE CALOS, CÉLULAS EM SUSPENSÃO E RAÍZES DE *Boerhavia
paniculata* POR MEIO DA TÉCNICA DE LIPIDÔMICA.**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Química. Área de concentração:
Química Orgânica. Programa de Pós-
Graduação em Química. Universidade Federal
do Pará.

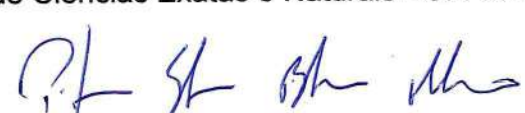
Data da Aprovação: Belém, PA. 26/07/2012.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Alberdan Silva Santos

Instituto de Ciências Exatas e Naturais - UFPA - Orientador



Profª. Drª. Patrícia Santana Barbosa Marinho

Instituto de Ciências Exatas e Naturais - UFPA - Membro



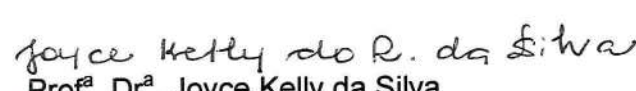
Dr. Oriel Filgueira Lemos

EMBRAPA Amazônia Oriental - Membro



Prof. Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli

Instituto Sócio Ambiental e de Recursos Hídricos - UFPA - Membro



Profª. Drª. Joyce Kelly da Silva

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA - Membro

DEDICO

Ao meu grande amor Rodrigo

Aos meus amados filhos Mariana e João Otávio (prestes a nascer)

Pelo apoio, incentivo, paciência e principalmente pelo amor em todos os momentos da minha vida.

OFEREÇO

Aos meus amados pais, João e Ana

Aos meus queridos irmãos Junior, Jamile e Jonathan

A vocês a minha eterna gratidão e amor!

MENSAGEM

***“A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva o homem a se curvar
diante da divindade”. (Voltaire)***

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o grande Arquiteto do Universo, pela minha existência e pelas oportunidades de evoluir todos os dias;

Aos **meus pais e irmãos** pelo modelo de caráter e respeito às pessoas, pelo incentivo e amor incondicional mesmo à distância;

Ao meu esposo **Rodrigo** pelo constante incentivo, companheirismo e paciência. Obrigada pelo seu amor sincero ontem, hoje e sempre. Amo-te!

Aos **meus filhos**, Mariana e João (prestes a nascer), presentes de Deus, por tornarem a minha vida tão especial. Amo vocês para sempre!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química** do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da UFPA pela oportunidade de realização do curso de doutorado;

Ao meu **Orientador Prof. Dr. Alberdan S. Santos** pela orientação, apoio e amizade;

À **FAPESPA** pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro ao projeto do Edital Universal: "Produção Biotecnológica de Moléculas com Atividades Biológicas";

Ao **personal do Horto de Plantas Medicinais** e do **Herbário IAN** da EMBRAPA Amazônia Oriental pela gentileza em ceder as plantas para coleta, e pela identificação das plantas coletadas;

Ao **Dr. Strahil Berkov** do AgroBioInstitute (Sofia, Bulgária) pelo auxílio nas análises de lipidômica;

A **Dr^a. Edna C. Santos Franco** pela colaboração nas análises de atividade antiinflamatória;

Aos **Membros da Banca** de doutorado pelas importantes sugestões e contribuições na melhoria do trabalho;

Aos **colegas do LABISISBIO/UFPA**: João Carneiro, José Luiz, Nelson Rosa, Antônio Sérgio, Marcia, Junior, Silvana, Débora, Rainiomar, Ronilson, Fábio, Mary Rose, Lorrany, Isabel Nery e Jeully pelo convívio e apoio;

Aos **colegas do LPDF/UFPA** pelo carinho e convívio;

Aos **professores, colegas e funcionários** do Curso de Pós-Graduação em Química que contribuíram para a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho;

À **Universidade Federal Rural da Amazônia**, e principalmente ao Diretor do Instituto Sócio Ambiental e de Recursos Hídricos (ISARH) Prof. **Dr. Marcel Botelho** pelo apoio e incentivo profissional;

A minha amiga **Mariana Müller** que muito me ensinou com sua alma tão especial. Obrigada amiga pelos momentos compartilhados, incentivo, apoio, auxílio na execução do trabalho, principalmente pelos desenhos das estruturas químicas e grande amizade. Valeu amiga!

Meus sinceros e carinhosos agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desta etapa tão importante na minha vida.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar as atividades antimicrobianas e antiinflamatórias da espécie *Boerhavia paniculata* e comparar o perfil químico dos extratos das raízes da planta silvestre com o extrato das culturas *in vitro*. Raízes foram coletadas e os concentrados metabólicos foram extraídos com os solventes hexano, acetato de etila e solução hidroalcolico (8:2; v/v). A atividade antiinflamatória dos extratos foi avaliada pelo teste do edema de pata de ratos induzida por carragenina e a atividade antimicrobiana foi investigada pelo método do disco de difusão em ágar. Um protocolo de indução de calos friáveis foi desenvolvido a partir de sementes sem tegumento em diferentes tratamentos em meio com metade das concentrações de nutrientes e vitaminas do MS ($\frac{1}{2}$ MS), diferentes concentrações de glicose (0,0; 1,5; 3,0 %; m/v) e de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (0,0; 2,265; 4,53 μ M; m/v) suplementado com água de coco (10%; v/v). Os calos friáveis foram utilizados para o estabelecimento de suspensão celular em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com glicose (1,5%; m/v) e 2,4-D (2,265 μ M; m/v) e as culturas de células foram eliciadas com *Aspergillus flavus* e *Candida albicans* (2%; m/v). A extração dos concentrados metabólicos de calos e suspensão celular foi realizada da mesma forma como foi realizado para as raízes. O perfil químico do extrato hexânico das raízes da planta silvestre, dos calos e das células da suspensão eliciada e não eliciada foram analisados por meio de técnica de lipidômica em CG/EM. Nenhum dos extratos das raízes apresentou atividade antimicrobiana, porém o extrato hexânico exibiu uma significativa atividade antiinflamatória. O perfil químico do extrato hexânico das raízes apresentou como substâncias majoritárias fitosteróis (β -sitosterol e estigmasterol) e ácidos graxos. Os melhores resultados para a indução de calos friáveis foi obtido no tratamento com meio $\frac{1}{2}$ MS contendo 2,265 μ M de 2,4-D, glicose (1,5%) e água de coco (10%). O estabelecimento da suspensão celular foi eficiente. O perfil químico das culturas *in vitro* foi semelhante ao perfil químico encontrado nas raízes da planta silvestre. Este trabalho contribui para aprofundar o conhecimento químico-farmacológico e de cultivo *in vitro* em *Boerhavia paniculata*.

PALAVRAS-CHAVE: atividades antiinflamatória, *Boerhavia paniculata*, cultivo *in vitro*, fitosteróis, metabólitos secundários.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Boerhavia paniculata* and it compare the chemical profile of extracts of the roots of wild plant with the extracts of *in vitro* cultures. Roots were collected and the concentrated metabolic were extracted with the solvents hexane, ethyl acetate and hydroalcoholic solution (8:2; v/v). The anti-inflammatory activity of extracts was evaluated by the rat paw edema induced by carrageenan and antimicrobial activity was investigated by the disk diffusion in agar method. An induction protocol was developed friable callus from seed without tegument with different treatments in medium with half strength of MS ($\frac{1}{2}$ MS) with different concentrations of glucose (0.0; 1.5; 3.0 %; w/v) and 2,4-diclorofenoxiacetic acid (0.0; 2.265; 4.53 μ M; w/v) supplemented with coconut water (10%; w/v). Friable calli were used to establish a protocol for the cell suspension in $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with glucose (1.5%, w/v) and 2,4-D (2.265 μ M; w/v) and cell cultures were elicited with *Candida albicans* and *Aspergillus flavus* (2%; w/v). The extraction of the concentrated metabolic of calli and cell suspension was performed using as solvents: hexane, ethyl acetate and hydroalcoholic solution (8:2; v/v). The chemical profile of the hexane extracts of the wild plant roots, calli and cell suspension elicited and non-elicited was performed by lipidomic in GC/MS. Neither of the root extracts showed antimicrobial activity, but the hexane extract of the roots exhibited an expressive anti-inflammatory activity. The chemical profile of the roots had as substances majority the phytosterols (β -sitosterol and stigmasterol) and fatty acids. The best result for friable calli induction was in $\frac{1}{2}$ MS medium containing 2.265 μ M of 2,4-D, glucose (1.5%) and coconut milk (10%). The establishment of cell cultures was effective. The chemical profile of *in vitro* cultures was similar to chemical profile found in the roots of the wild plant. This work contributes to increase the chemical-pharmacological knowledge and develop studies *in vitro* cultivation in specie *Boerhavia paniculata*.

KEYWORDS: Anti-inflammatory activities, *Boerhavia paniculata*, culture *in vitro*, phytosterols, secondary metabolites

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Ilustração da espécie <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. Detalhes das folhas (A), flor (B), sementes (C), inflorescências (D) e planta (E).....	21
Figura 2 - Metabólitos secundários produzidos a partir de espécies pertencentes ao gênero <i>Boerhavia</i>	23
Figura 3 - Comparação da estrutura química dos esteróis (A) β -sitosterol (vegetais) com o (B) colesterol (animais).....	37
Figura 4 - <i>Boerhavia paniculata</i> Rich.: (A) planta coletada no Horto de Plantas Medicinais, (B) exsicata registrada e identificada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental, (C) detalhes da raiz, (D) flores, (E) folhas e (F) planta coletada no campo.....	45
Figura 5 - Gráfico da atividade antiinflamatória dos extratos das raízes de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. sobre o número de células inflamadas no edema de pata de ratos induzido por carragenina no modelo de bolsão de ar	50
Figura 6 - Cromatograma das análises do extrato hexânico de raízes de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. por CG/EM.....	52
Figura 7 - Fitosteróis identificados por CG/EM nos extratos hexânicos das raízes da planta silvestre de <i>Boerhavia paniculata</i> : (A) β -sitosterol, (B) estigmasterol e (C) campesterol	55
Figura 8 - Esquema da biossíntese de prostaglandinas e ação dos esteróis e AINEs na inflamação	57
Figura 9 - Testes preliminares de indução de calos em <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. após 30 dias de subcultivo. (A) Segmento de folha e hipocótilo em meio MS com sacarose (3%) sem regulador de crescimento mantidos no claro a 32°C; (B) Folha em meio MS sacarose (3%) e 1,0 mgL ⁻¹ de 2,4-D mantidos no claro a 32°C; (C) Segmento de hipocótilo em meio MS sacarose (3%) e 1,0 mgL ⁻¹ de 2,4-D mantidos no claro a 32°C; (D) Calo nodular induzido em segmento de hipocótilo em meio MS com sacarose (3%), 1,0 mgL ⁻¹ de BAP, 1,0 mgL ⁻¹ de 2,4-D mantido no escuro a 26°C	70

- Figura 10 - Calos de *Boerhavia paniculata* Rich. a partir de sementes sem o tegumento em $\frac{1}{2}$ MS suplementado com água de coco (10%; v/v) e diferentes concentrações de 2,4-D e glicose. (A) Indução de calos em tratamento 5 ($\frac{1}{2}$ MS + glicose 1,5% + 2,265 μ M 2,4-D) com 30 dias. (B) Biomassa de calos friáveis obtidos do tratamento 5 de indução de calos após 60 dias..... 72
- Figura 11 - Calos de *Boerhavia paniculata* Rich. em meio de aumento de biomassa contendo $\frac{1}{2}$ MS com de glicose (1,5%), 2,265 μ M de 2,4-D e água de coco (10%) com 20 dias de subcultivo..... 76
- Figura 12 - Gráfico da curva de progressão do crescimento de calos de *Boerhavia paniculata* Rich. mensurada durante 30 dias em meio de aumento de biomassa com $\frac{1}{2}$ MS, glicose (1,5%; m/v), 2,265 μ M de 2,4-D e água de coco (10%; v/v)..... 78
- Figura 13 - Gráfico da curva de progressão do crescimento da suspensão celular de *Boerhavia paniculata* Rich. mensurada durante 35 dias..... 91
- Figura 14 - Células de *Boerhavia paniculata* Rich. obtidas de suspensão celular com 25 dias (A) e com 36 dias (B) levando ao escurecimento das células. Barra = 1 cm..... 92
- Figura 15 - Eliciação de células de *Boerhavia paniculata* Rich. em suspensão celular. (A) Suspensão celular sem eliciação. (B) Células sem eliciação. (C) Suspensão celular com 96h de eliciação. (D) Células com 96h de eliciação com *Candida albicans*. Barra = 3,3 cm..... 93

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de extratos das raízes de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. contra leveduras do gênero <i>Candida</i>	49
Tabela 2 - Lipidoma do extrato hexânico de raízes da planta silvestre de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. analisado por meio de lipidômica em CG/EM.....	54
Tabela 3 - Indução de calos <i>in vitro</i> de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. em meio ½ MS suplementado com 10% de água de coco (v/v) e diferentes concentrações de 2,4-D e glicose após 30 dias em cultura.....	71
Tabela 4 - Crescimento da biomassa de calos monitorado durante 30 dias.....	78
Tabela 5 - Lipidoma do extrato hexânico de calos de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. obtida por meio de lipidômica em CG/EM.....	80
Tabela 6 - Comparação dos compostos encontrados no lipidoma de raízes e calos de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. analisados por meio de lipidômica em CG/EM	81
Tabela 7 - Crescimento da biomassa de células em suspensão e índices de crescimento das células monitoradas durante 35 dias.....	90
Tabela 8 - Lipidoma comparativo do extrato hexânico de células eliciadas e não eliciadas de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. obtida por meio de lipidômica em CG/EM.....	95
Tabela 9 - Análise comparativa do lipidoma do extrato hexânico de raiz, calos, células eliciadas e não eliciadas de <i>Boerhavia paniculata</i> Rich. obtida por CG/EM	98

UFC	Unidades Formadoras de Colônia
µL	Microlitro

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES.....	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos	17
1.2.3 Hipóteses	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>Boerhavia paniculata</i> (NYCTAGINACEAE)	19
2.2 BIOTECNOLOGIA VEGETAL.....	24
2.2.1 Cultivo de Calos <i>In Vitro</i>	27
2.2.2 Suspensão Celular.....	28
2.2.3 Eliciação.....	29
2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VEGETAIS.....	31
2.4 LIPIDÔMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	35
3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS DE RAÍZES DE <i>Boerhavia paniculata</i>	41
Resumo.....	41
Abstract.....	42
3.1 INTRODUÇÃO.....	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.2.1 Material Vegetal.....	44
3.2.2 Obtenção dos Concentrados Metabólicos das Raízes	46
3.2.3 Avaliação do Perfil Metabólico do Extrato Hexânico das Raízes	46
3.2.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Raízes	47
3.2.5 Avaliação da Atividade Antiinflamatória das Raízes	47
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.3.1 Atividade Antimicrobiana das Raízes.....	48
3.3.2 Atividade Antiinflamatória das Raízes	49
3.3.3 Perfil Metabólico do Extrato Hexânico das Raízes	51
3.4 CONCLUSÕES.....	60
4 INDUÇÃO E PERFIL QUÍMICO DA CULTURA DE CALOS DE <i>Boerhavia paniculata</i>.....	61
Resumo.....	61
Abstract	62
4.1 INTRODUÇÃO.....	63
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.2.1 Material Vegetal	64
4.2.2 Preparação do Explante para Uso como Inóculo	64

4.2.3 Indução de Calos Friáveis a partir de Sementes sem Tegumento	65
4.2.4 Produção de Biomassa de Calos	65
4.2.5 Curva de Progressão da Biomassa de Calos	65
4.2.6 Obtenção de Concentrados Metabólicos dos Calos	66
4.2.7 Avaliação do Perfil Metabólico dos Extratos Hexânicos dos Calos	66
4.2.8 Delineamento Experimental e Análise Estatística	67
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.3.1 Preparação do Explante.....	68
4.3.2 Indução de Calos Friáveis a partir de Sementes sem Tegumento	69
4.3.3 Obtenção de Biomassa de Calos	75
4.3.4 Curva de Progressão da Biomassa de Calos	77
4.3.5 Perfil Metabólico do Extrato Hexânico dos Calos	79
4.4 CONCLUSÕES.....	83
5 CULTIVO IN VITRO E PERFIL QUÍMICO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	
DE <i>Boerhavia paniculata</i>.....	84
Resumo.....	84
Abstract.....	85
5.1 INTRODUÇÃO.....	86
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	87
5.2.1 Produção de Suspensão Celular a partir de Calos Friáveis	87
5.2.2 Curva de Progressão da Biomassa Celular	87
5.2.3 Preparo do Elicidor Biótico	88
5.2.4 Eliciação de Cultura de Células em Suspensão	88
5.2.5 Obtenção de Concentrados Metabólicos das Células em Suspensão	88
5.2.6 Avaliação do Perfil Metabólico dos Extratos Hexânicos da Suspensão	
Eliciada e não Eliciada.....	89
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
5.3.1 Progressão da Biomassa Celular	90
5.3.2 Eliciação de Cultura de Células em Suspensão	92
5.3.3 Perfil Metabólico dos Extratos Hexânicos da Suspensão Eliciada e Não	
Eliciada	94
5.4 CONCLUSÕES.....	100
6 CONCLUSÕES FINAIS.....	102
REFERÊNCIAS.....	104

1 INTRODUÇÃO GERAL

As plantas produzem uma grande variedade de diferentes classes de metabólitos importantes. Muitos destes são comercializados e se destacam economicamente como: fármacos, perfumes, condimentos, corantes, óleos, resinas, taninos, borrachas, gomas, ceras, pesticidas e produtos diversos. Estas substâncias naturais são utilizadas diretamente ou indiretamente pelas indústrias, ou podem servir como modelo para a síntese de substâncias com as mais diversas propriedades (BALANDRIN et al., 1985; BALANDRIN; KLOCKE, 1988).

A espécie *Boerhavia paniculata* Rich. é uma planta medicinal utilizada popularmente nos tratamentos da desobstrução do fígado, rins e bexiga, asma, bronquite, febres biliares, impaludismo, icterícia, congestão do fígado e do baço, hidropisia, anti-hemorrágico e principalmente na inflamação das vias urinárias e uterinas (KUMAR et al., 2011). Esta espécie pertence à família Nyctaginaceae e vem sendo estudada intensivamente devido às diferentes propriedades atribuídas na medicina popular, sendo que diversos estudos realizados em plantas do gênero *Boerhavia* spp, principalmente com as espécies *B. erecta* e *B. diffusa* detectaram propriedades farmacológicas como: atividades antimicrobianas, antiinflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antifibrinolítica, anticonvulsiva entre outros (APU et al., 2012; MÉNDEZ et al., 2001; OLALEYE et al., 2010).

Na busca por alternativas para produção de compostos vegetais de interesse econômico, o uso da biotecnologia, principalmente, as técnicas de cultura de tecidos de plantas, constitui uma fonte potencial para a produção de metabólitos vegetais bioativos (RAMANCHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002). As culturas de células e tecidos vegetais *in vitro* podem ser utilizadas para minimizar as limitações encontradas na obtenção de metabólitos em plantas, tais como: síntese em concentrações muito pequenas ou em condições específicas (estação do ano, fase de desenvolvimento vegetal ou condições de estresse) e alterações na produção devido à variabilidade genética encontrada em algumas espécies. Desta forma, as técnicas de cultura de células *in vitro* podem ser viáveis para a produção de compostos de interesse farmacológico e industrial ou para a produção de plantas elites pela técnica de micropropagação, pois não dependem da sazonalidade e são

desenvolvidas em ambiente controlado (KARUPPUSAMY, 2009; VERPOORTE; MEMELINK, 2002; VIJAYA SREE et al., 2010).

Em seguida, apresenta-se uma revisão bibliográfica (Item 2 do sumário) relacionada aos parâmetros estudados nesta tese. Posteriormente, apresentam-se três capítulos redigidos em forma de trabalhos científicos.

No primeiro capítulo (Item 3 do sumário) o potencial antiinflamatório e antimicrobiano dos extratos obtidos das raízes da planta silvestre de *B. paniculata* foram investigados e o perfil químico do extrato com maior atividade biológica foi identificado através da técnica de lipidômica em CG/EM. No segundo capítulo (Item 4 do sumário) foi desenvolvido um protocolo de indução de calos friáveis e o perfil químico do extrato hexânico dos calos foi analisado. No terceiro capítulo (Item 5 do sumário) foi desenvolvido um protocolo de suspensão celular, as células em suspensão foram eliciadas com micro-organismos (*Aspergillus flavus* e *Candida albicans*) e o perfil químico do extrato hexânico das células em suspensão eliciadas e não eliciadas foi estudado. Por fim, apresentam-se as conclusões gerais (Item 6 do sumário) dos trabalhos desenvolvidos nesta tese.

1. 2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biológico dos extratos brutos obtidos das raízes e comparar o perfil metabólico dos extratos obtidos das raízes da planta silvestre com os extratos obtidos em culturas de células *in vitro* da espécie *Boerhavia paniculata* Rich.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver cultivo *in vitro* de células (calos e suspensão celular);
- Induzir a produção e o acúmulo de metabólitos secundários na cultura *in vitro*;

- Avaliar o potencial antimicrobiano e antiinflamatório dos extratos das raízes da planta silvestre;
- Avaliar o perfil químico lipídico nos sistemas de cultivo *in vitro*;

1.2.3 Hipóteses

- A espécie *B. paniculata* produz metabólitos que apresentam atividade antimicrobiana e antiinflamatória;
- As células cultivadas *in vitro* e as raízes da planta silvestre apresentam perfil metabólico semelhante;
- O uso de eliciadores nas células vegetais cultivadas *in vitro* estimula a produção de metabólitos que apresentam atividade biológica específica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Boerhavia paniculata* (NYCTAGINACEAE)

A ordem Caryophyllales possui quinze famílias, das quais as mais importantes e com grande ocorrência no Brasil são: Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae, Cactaceae e Nyctaginaceae (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A família Nyctaginaceae possui 390 espécies distribuídas em 30 gêneros, formada por árvores, arbustos e ervas, localizada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Dos gêneros citados, destacamos aqueles que possuem espécies de valor medicinal: *Boerhavia*, *Mirabilis* e *Bougainvillea* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; FLORA OF ZIMBABWE, 2011; TROPICOS, 2011).

Esta família tem sido muito estudada nos últimos anos, devido as suas diferentes propriedades medicinais atribuídas popularmente. Desta forma, vários estudos quimiotaxonômicos vêm sendo realizados em diferentes espécies desta família: *Boerhavia diffusa*, *Boerhavia erecta*, *Boerhavia spectabilis*, *Boerhavia scandens*, *Bougainvillea glabra*, *Mirabilis jalapa* e *Pisonia grandis*. Todas elas têm sido estudadas na medicina tradicional como antiespasmódico, contra os acidentes epiléticos para o histerismo, como expectorantes, e secreções biliares, congestões do fígado e outros (IQBAL et al., 2011; MÉNDEZ et al., 2001).

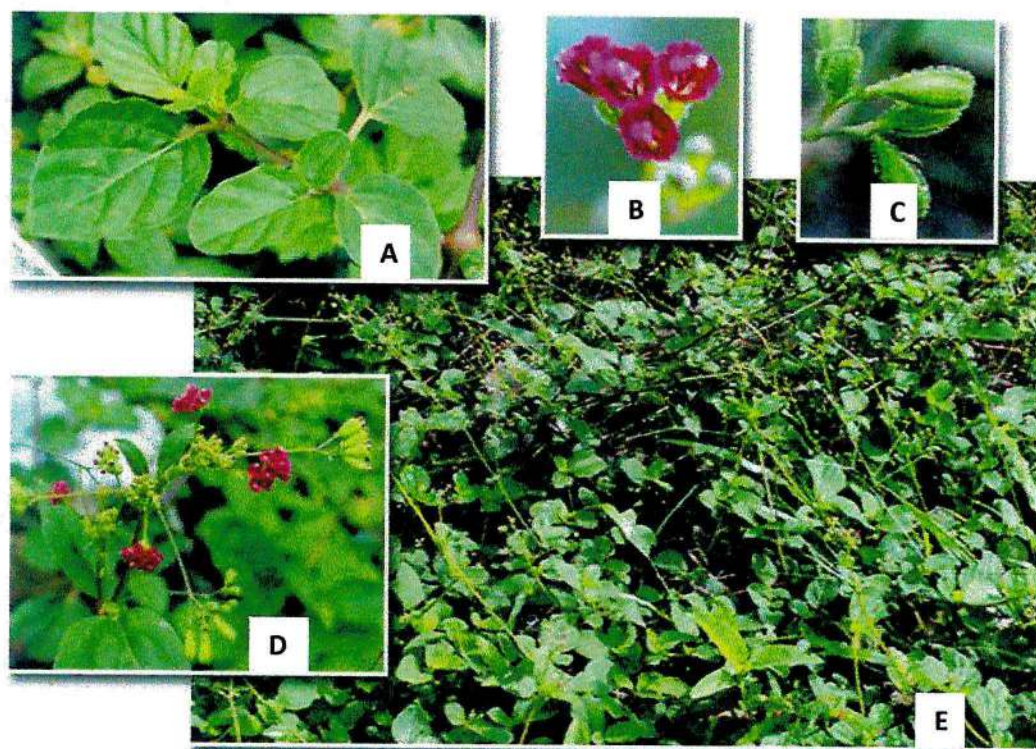
Segundo Severi (2007) uma ampla variedade de classes de metabólitos está presente nas espécies desta família. Desde substâncias comumente encontradas em plantas como, ácidos graxos, esteroides, triterpenos, flavonoides, até mesmo substâncias de ocorrência menos comum como, alcalóides, saponinas, rotenoides, xantonas, lignanas e lactonas. Destacando desta forma a importância de estudos com espécies de Nyctaginaceae.

O gênero *Boerhavia* descrito por Carl Linnaeus, pertencente à família Nyctaginaceae, possui cerca de 20 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. O nome do gênero foi dado em homenagem ao médico, químico e botânico alemão Hermann Boerhaave. As plantas deste gênero são consideradas invasoras, embora não sejam muito agressivas, ocorrendo principalmente em locais frequentemente arenosos, jardins, pomares e terrenos baldios (DEQUAN; GILBERT, 2003; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

Este gênero apresenta o maior número de espécies usadas na medicina tradicional de diversos países e regiões do mundo, principalmente na fitoterapia Ayurvedica na Índia (CHAUDHARY; DANTU, 2011; KUMAR et al., 2011), no Paquistão (IQBAL et al., 2011) e no Brasil (HIRUMA-LIMA et al., 2000; RAIN-TREE, 2011), sendo intensamente estudado quanto às propriedades químicas e farmacológicas dos seus extratos e metabólitos. As espécies mais estudadas quanto à composição química e atividades biológicas de seus extratos são: *Boerhavia diffusa*, *Boerhavia erecta*, *Boerhavia repens* e *Boerhavia coccinea*.

A espécie *Boerhavia paniculata* Rich., investigada neste trabalho, é uma planta herbácea bianual ou perene, com muitos ramos vegetativos rasteiros, prostrada que cresce em regiões tropicais tais como Antilhas, América do Sul, Índia e África. A planta possui caule ramificado, glanduloso, pubescente alcançando até 160 cm de altura e raiz axial pouco ramificada. As folhas são pecioladas, opostas e lisas, com flores pequenas e lilases, formando inflorescências terminais ou axilares. O fruto é um aquênio pequeno (2,5-3,5 mm) com pelos glandulares que se aderem prontamente aos tecidos e à pele (Figura 1) (BALBACH, 1991; LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 1 – Ilustração da espécie *Boerhavia paniculata* Rich. Detalhes das folhas (A), flor (B), sementes (C), inflorescências (D) e planta (E).



Fonte: CIRAD, 2007.

B. paniculata é conhecida popularmente como: “mata-pavo” e “tostón” em Cuba; “yerba de puerco” em Porto Rico; “spreading hogweed” nas Antilhas Inglesas; erva tostão, pega-pinto, batata-de-porco e solidônia no Brasil (MÉNDEZ et al., 2001). Esta espécie também possui várias sinonímias botânicas como *Boerhavia coccínea*, *Boerhavia diffusa*, *Boerhavia adscendens*, *Boerhavia repens* (FLORA OF ZIMBABWE, 2011; LORENZI; MATOS, 2002; SÁ, 2010; TROPICOS, 2011).

A espécie *B. diffusa* é utilizada na Nigéria como laxante, antipirética e usadas no tratamento de convulsões. Fadeyi et al. (1989) em estudos fitoquímicos detectou em *B. diffusa*, *B. erecta* e *B. repens* substâncias fenólicas ou flavonoides, e traços de alcalóides. Além disso, *B. diffusa* possui muitas propriedades farmacológicas. Estudos demonstraram que *B. diffusa* possui propriedades diuréticas (GAITONDE et al., 1974), antiinflamatória (BHALLA et al., 1968), antifibrinolítica (JAIN; KHANNA, 1989), anticonvulsiva (ADESINA, 1979) e antibactericida (OLUKOYA et al., 1993). Verma e Awasthi (1979) observaram que os extratos das raízes desta planta também são ricos em uma proteína conhecida como “Systemic Resistance Inducing

Protein (BD-SRIP)” que possui potencial antimicrobiano contra vírus fitopatogênicos de plantas.

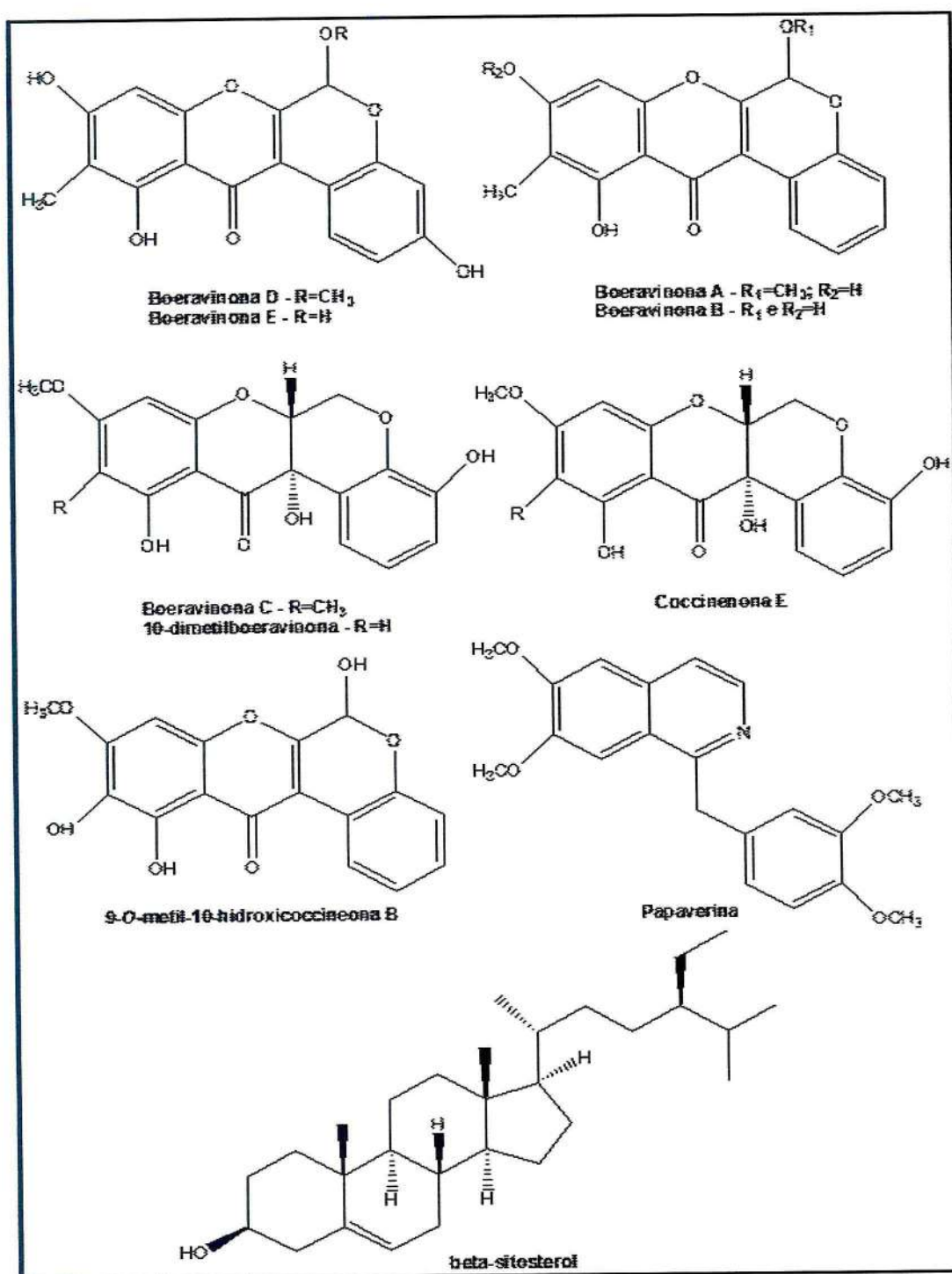
Diferentes partes de *B. diffusa* são utilizadas. As sementes são utilizadas como tônico, expectorante, purificador do sangue, e útil na dor muscular. As raízes são utilizadas no tratamento de icterícia, inflamação, analgesia, convulsão, asma e hemorróidas. Sua ação diurética é atribuída à presença de xantonas (GAITONDE et al., 1974; GUPTA et al., 1962; JAIN; KHANNA, 1989; KHARE, 2007; NADKARNI, 1976; SHAH et al., 1983; SINGH; DEY, 2005).

No Brasil as plantas do gênero *Boerhavia* como um todo ou os seus extratos são usados para beri-beri, insuficiência biliar, cistite, cálculo biliar, edema, gonorréia, hepatite, hipertensão, icterícia, distúrbios renais, pedras nos rins, distúrbios urinários e problemas da vesícula biliar (CRUZ, 1995).

O gênero *Boerhavia* apresenta um amplo espectro de compostos químicos, os quais estão em concordância com a diversidade de ações farmacológicas atribuídas a este gênero (Figura 2). Entre os compostos encontrados, destacam-se os alcalóides, presentes nos extratos aquosos liofilizados, e extratos etanólicos das raízes de *Boerhavia diffusa* (MUNTGANTIWAR et al., 1997). Nas sementes foram encontrados ácidos graxos, boerhavina e ácidos boerhavicos (HIRUMA-LIMA et al., 2000; ROIG, 1988). Um dos compostos mais encontrados são os rotenóides e os flavonoides. Os primeiros metabólitos identificados foram as boeravinonas A, B, D, E e F, a partir das raízes, além de vários esteroides e uma C – metilflavona (GRUPTA, 1984; LAMI et al., 1991; MESSANA et al., 1986).

Em *B. coccinea* trabalhos iniciais levaram ao isolamento de dois 12a-hidroxirotenóides a partir de raízes denominados de coccineona A (4,11,12a-triidroxi-9-metoxirotenóide) e coccineona B (4,9,11,12a-tetraidroxirotenóide) (MESSANA et al., 1986). Posteriormente, foram isolados dois novos rotenóides do extrato metanólico das raízes de *B. coccinea*, denominados de coccineona C (5,7,3'-triidroxicoumaronacroma) e coccineona D (6,9,11-triidroxi-6a,12a-desidrorotenóide) (FERRARI et al., 1991). Santos et al. (1998) isolaram um novo rotenóide de extratos clorofórmicos das raízes de *B. coccinea* chamado de coccineona E (9,10-dimetoxi-11,12a-hidroxirotenóide).

Figura 2 - Metabólitos secundários produzidos a partir de espécies pertencentes ao gênero *Boerhavia*.



Fonte: Müller, 2010

Existe uma ampla variedade de metabólitos secundários presentes nas raízes das espécies pertencentes ao gênero *Boerhavia*. As classes químicas encontradas são comuns na maioria das plantas, como: esteroides (KADOTA et al., 1989; MISRA; TIWARI, 1971), flavonoides e rotenoides (BORRELLI et al., 2006; KADOTA et al., 1989; 1988; LAMI et al., 1990, 1991; SANTOS et al., 1998), lignanas (LAMI et al., 1991) e proteínas (VERMA; AWASTHI, 1979). Assim, esses dados salientam a importância de estudos com espécies do gênero *Boerhavia* (MÉNDEZ et al., 2001).

Apesar dos estudos relatados, a química dos compostos bioativos de *Boerhavia* e de suas propriedades farmacológicas ainda é pouco estudada, e a maioria das pesquisas tem se concentrado apenas em extratos. Os diversos extratos investigados e os compostos purificados mostram uma ampla propriedade farmacológica como atividades diurética, antiinflamatória, antimicrobiana e hepatoprotetora. Mas poucos dados clínicos estão disponíveis e isto merece mais pesquisas a fim de avaliar completamente o seu potencial para uso medicinal futuro (MUZILA, 2011). Além disso, ainda são escassos os estudos sobre a propagação e cultivo *in vitro* deste gênero.

2.2 BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Uma enorme variedade de plantas medicinais é utilizada mundialmente por cerca de 80% da população mundial, contudo não há estudos científicos que provem a eficácia da maioria destas plantas. A maioria dos medicamentos ocidentais é baseada nas medicinas tradicionais de origem europeia, mediterrânea e árabe. Deste modo, a variedade de plantas em uso ao redor do mundo pode representar um tesouro enorme para o desenvolvimento de medicamentos (VERPOORTE et al., 2006).

De acordo com Newman et al. (2003), dos 877 novos medicamentos que foram desenvolvidos no período de 1981-2002, 6% eram produtos naturais, 27% foram derivados de produtos naturais, e 16% eram sintéticos desenvolvidos sobre o modelo de um produto natural, demonstrando que a natureza é uma importante fonte para o desenvolvimento de novas pistas para medicamentos. Estima-se que apenas cerca de 15% de todas as espécies de plantas já foram estudadas quanto ao seu perfil químico, e apenas 5% para uma ou mais atividades biológicas. E apesar de uma extensa pesquisa sobre plantas medicinais ser publicada a cada ano,

apenas algumas plantas têm sido amplamente estudada para atividade farmacológica (VERPOORTE et al., 2006). Neste mesmo sentido, o Ministério do Meio Ambiente (2011) ressalta que o Brasil está entre as nações com maior diversidade biológica do planeta, apresentando a maior diversidade de flora do mundo com 22% do total mundial. A biodiversidade é à base das atividades agrícolas, pecuárias, pesqueiras, florestais e, também, para o uso estratégico na indústria da biotecnologia. Segundo Cordell (2000), o mercado de fitoterápicos representa 25% do mercado mundial, o que implica em uma movimentação financeira, para produtos derivados de recursos genéticos, situada entre US\$500 e 800 bilhões anuais. Com esta perspectiva, muitas empresas nacionais e multinacionais conhecendo estas potencialidades estão promovendo pesquisas na área de desenvolvimento de novos medicamentos e cosméticos.

Apesar da grande importância que as plantas possuem, muitas espécies nunca foram estudadas, e conseqüentemente os seus constituintes biologicamente ativos nunca foram avaliados e substâncias que poderiam ser importantes comercialmente permanecem desconhecidas (BALANDRIN et al., 1985; VERPOORTE et al., 2006). Além disso, os habitats naturais das plantas medicinais estão desaparecendo rapidamente junto com as instabilidades ambiental e geopolítica, dificultando cada vez mais a aquisição dos compostos derivados de plantas. Isto tem impulsionado indústrias, bem como cientistas, a investigar a cultura de células vegetais como fonte alternativa para a produção de fármacos de plantas (MULABAGAL; TSAY, 2004). Na busca por alternativas para produção de compostos vegetais de interesse, o uso da biotecnologia, principalmente, as técnicas de cultura de tecidos de plantas, constitui uma fonte potencial para a produção de metabólitos vegetais bioativos (RAMANCHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

A biotecnologia no seu sentido mais amplo compreende a manipulação de micro-organismos, plantas e/ou animais, objetivando a obtenção de processos e produtos de interesse. E o domínio das técnicas de cultura de tecidos (ou cultura *in vitro*) de plantas tem importância crucial na biotecnologia vegetal. A cultura de tecidos de plantas é definida como o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos, em meio nutritivo e sob condições assépticas (OLIVEIRA, 2000; PIERIK, 1997).

A totipotência das células é a base fundamental da cultura de tecidos de plantas. O botânico alemão Gottlieb Haberlandt, em 1902, foi o primeiro a propor a teoria da totipotência, ou seja, a capacidade de uma única célula regenerar um

organismo inteiro. Haberlandt baseado nesta teoria foi o primeiro a cultivar células de tecidos somáticos de várias espécies de plantas em solução nutritiva (COLLIN; EDWARDS, 1998; TORRES et al., 1998).

A biotecnologia vegetal tem reflexo sobre os agricultores, na indústria alimentar, os consumidores e, sobretudo sobre o meio ambiente (OLIVEIRA, 2000). Mas além da importância prática, as técnicas de cultura de tecidos de plantas possuem importância também nas ciências básicas auxiliando o avanço dos conhecimentos nas áreas de genética, fisiologia e bioquímica de plantas. Além disto, a cultura de tecidos dá suporte a estudos de transformação genética e biologia celular e molecular de plantas (BARRUETO CID, 1998; COLLIN; EDWARDS, 1998).

Uma das principais contribuições da cultura de tecidos de plantas é na área bioquímica. O cultivo em larga escala de células de plantas em meio líquido é uma fonte potencialmente mais conveniente e rentável de produção de metabólitos secundários do que plantas inteiras. Além disso, as técnicas de cultura de tecido podem auxiliar o estudo e a elucidação de rotas metabólicas (COLLIN; EDWARDS, 1998).

A utilização da cultura de células e tecidos vegetais na produção de metabólitos secundários tem sido assunto de muitas pesquisas. O aumento da produção de metabólitos secundários bioativos é um fator determinante para a aplicação prática da cultura de tecidos e células vegetais, por isso a necessidade de alternativas para intensificar a produção *in vitro* destes metabólitos (DICOSMO; MISAWA, 1995; LOURENÇO, 2003).

Segundo Vijaya Sree et al. (2010) a cultura de células vegetais representam uma fonte potencial de produção de substâncias medicinais, aromas e corantes que não podem ser produzidos por micro-organismos ou síntese química. A principal vantagem desta tecnologia é que ela pode produzir continuamente e de forma controlada, compostos vegetais de interesse como fármacos, em larga escala.

Entretanto, em Nyctaginaceae poucos trabalhos na área de biotecnologia são encontrados na literatura. Zaccai et al. (2007) desenvolveram um protocolo para regeneração *in vitro* a partir de segmentos nodais e um sistema de transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* em *Mirabilis jalapa*. Kalita et al. (2007) estudaram o cultivo *in vitro* e a propagação clonal de três ervas medicinais do Nordeste da Índia, incluindo *B. diffusa*. Roy (2008) desenvolveu um protocolo rápido

de multiplicação *in vitro* em *B. diffusa* utilizando como explantes gemas apicais e segmentos nodais.

2.2.1 Cultivo de Calos *In Vitro*

O calo é uma massa de células desorganizadas e indiferenciadas que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos vegetais, denominados de explantes, cultivados *in vitro* (BROWNLEADER; DEY, 1997).

Quando um explante é inoculado *in vitro*, diversas respostas são esperadas e a determinação de fatores químicos, morfológicos e fisiológicos dos tecidos de plantas doadoras tem sido fundamental (GEORGE, 1993; GLOCKE et al., 2006; NEHRA et al., 2005; TREVIZAM et al. 2011). A partir da desdiferenciação dos explantes ocorre a formação de calos com células ou grupos de células competentes (KERBAUY, 1999; LITZ; GRAY, 1992). Esta competência celular está relacionada com a capacidade das células reagirem a estímulos ou sinais específicos de desenvolvimento em cultura (CHRISTIANSON, 1988).

A produção de calos é dependente do meio de cultura e das características fisiológicas do explante e, é seguida por várias mudanças no metabolismo e na estrutura da célula (COLLIN; EDWARDS, 1998; LINDSEY; JONES, 1992). Desta forma, a indução de calos requer a seleção do explante, fornecimento apropriado de nutrientes no meio e condições ambientais adequadas (CONSTABEL, 1984).

A cultura *in vitro* de células de plantas pode acumular grande variedade de metabólitos secundários como polifenóis, alcalóides, esteroides e antocianinas (GEORGE, 1993; NEHRA et al., 2005). Assim, o cultivo de calos é utilizado para estudos do crescimento e desenvolvimento, propagação e produção de metabólitos de plantas (CONSTABEL, 1984).

A regeneração de plantas a partir de calos já foi relatada em muitas espécies vegetais como arroz, trigo, alho, mamão, coco e outros (ADKINGS et al., 1993; BARANDIARAN et al., 1999; MONDAL et al., 1994; O'HARA; STREET, 1978; PERERA et al., 2007). E diversos estudos têm sido realizados a partir de cultura de calos. Child e Larue (1974) estudaram o estabelecimento de nitrogenase em cultura de calos de soja. Adkins et al. (1993) estudaram o efeito de etileno e das condições ambientais em cultura de calos de arroz. Antognoni et al. (2007) investigaram a

produção de glicosil flavonoides em cultura de calos de *Passiflora quadrangularis* expostas a radiação UV-B e eliciadas com metil jasmonato.

Em Nyctaginaceae, Santos et al. (2007) relataram a produção de um desidro-rotenóide a partir de calos e por raízes de plantas silvestres de *B. coccinea*. Sudarshana et al. (2008) a partir de calos de *B. difusa* induziram o florescimento *in vitro*, a embriogênese somática e a regeneração de plantas. Müller (2010) desenvolveu um protocolo de indução de calos e avaliou atividade antimicrobiana dos extratos obtidos dos calos e das raízes de plantas silvestres em *B. paniculata*. Rownaq e Hossain (2010) desenvolveram um protocolo de regeneração *in vitro* direta e indireta a partir de segmentos nodais de *B. repens*.

2.2.2 Suspensão Celular

A cultura de células em meio líquido ou suspensão celular é também uma técnica muito utilizada em biotecnologia vegetal. A suspensão celular é um tipo de cultura em que células individuais ou em agregados celulares crescem e se multiplicam em meio líquido, sob contínua agitação para evitar gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura. Independente da espécie é essencial que as células da suspensão se dividam e se multipliquem ativamente (BARRUETO CID, 1998; BROWNLEADER; DEY, 1997; PIERIK, 1997).

A suspensão celular possui grande importância e aplicabilidade nas áreas de Bioquímica, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia e Genética de plantas. Na área de bioquímica tem facilitado o estudo e o isolamento de enzimas, biotransformação (CAO et al., 1992; FORREITER et al., 1997; TRICK; FINER, 1998) e na produção de metabólitos secundários (EDAHIRO; SEKI, 2006; SAIMARU et al., 2007).

Na Fisiologia vegetal, a suspensão celular tem sido utilizada no estudo de fatores de crescimento, resistência ao frio, senescência celular, sincronismo da divisão celular, embriogênese somática e clonagem de plantas em larga escala e efeito de metais pesados (NAYAK; SEN, 1989; SENGUPTA; RAGHAVAN, 1980; TAYLOR et al., 1996). Na área de Fitopatologia, a suspensão celular tem sido útil no estudo de resistência a fungos, por meio de eliciadores ou toxinas. E na genética de plantas, a suspensão celular tem sido utilizada no estudo de poliploidia celular,

isolamento e caracterização de mutantes e transformação genética de plantas (BARRUETO CID, 1998).

Além disso, a cultura de células de plantas vem sendo estudada ativamente como uma fonte potencial de obtenção de produtos biológico de alto valor. Células de plantas em suspensão tendem a formar grandes agregados celulares induzindo a maior produção de metabólitos secundários (EDAHIRO; SEKI, 2006). Saimuaru et al. (2007) produziram ácidos triterpênicos em suspensão celular de oliva (*Olea europaea*). Lopes et al. (2000) estabeleceram suspensão celular de *Psychotria carthagenensis* e a caracterizaram quimicamente, encontrando dois importantes compostos: o esteroide β -sitosterol e o ácido ursólico. Todavia, em Nyctaginaceae, nenhum trabalho com suspensão celular foi encontrado na literatura.

2.2.3 Eliciação

Além dos nutrientes básicos como proteínas e carboidratos, as plantas são uma fonte de metabólitos comercialmente importantes, como pigmentos, inseticidas, aromatizantes, produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentares, celulose e agroquímicos. E a íntima relação entre o metabolismo secundário de plantas e resposta de defesa é amplamente reconhecida (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

As plantas produzem metabólitos secundários na natureza como um mecanismo de defesa contra o ataque por patógenos, insetos, herbívoros, ou estresse biótico ou abiótico utilizando sistemas específicos de reconhecimento e sinalização que permitem a rápida detecção do patógeno e o início de uma resposta de defesa (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

Os eliciadores são moléculas, bem como fatores físicos capazes de estimular qualquer mecanismo de defesa em plantas desencadeando a formação de metabólitos secundários (CÔTE et al. 1995; NÜRNBERGER, 1999; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002). De acordo com Vasconsuelo e Boland (2007), os eliciadores podem ser classificados com base na sua origem e estrutura molecular. Os eliciadores bióticos são de origem biológica como fragmentos de polissacarídeos de parede celular vegetal, quitosanas, homogeneizado de fungo, extrato de levedura etc. Os eliciadores abióticos são de

origem não biológica e são agrupados como físicos (estresse osmótico, térmico e luz ultravioleta) e químicos (metais pesados, sulfato de vanadil, ortovanadato de sódio). Cada tipo de eliciador característico pode induzir respostas específicas que dependem da interação planta-eliciador.

Estes eliciadores são reconhecidos por receptores proteicos, codificados por genes *R*, que podem estar localizados fora da membrana plasmática ou dentro do citoplasma da célula vegetal. A ligação dos receptores proteicos com os eliciadores funciona como um alerta para a planta sobre a presença do patógeno, induzindo uma cascata de sinais que ativam várias formas de defesa na planta (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os eliciadores derivados de patógenos incluem proteínas, peptídeos, esteróis e fragmentos de polissacarídeos provenientes da parede celular do patógeno. Moléculas liberadas de micro-organismos ou da própria planta, ou ainda substâncias de natureza abiótica, denominadas de eliciadores vêm sendo utilizadas para induzir rotas de biossíntese de metabólitos secundários em suspensões celulares, visando elucidar sua síntese, distribuição e acúmulo (CHONG et al., 2005; ZHAO et al., 2005).

Segundo McCall e Karban (2006), os eliciadores ativam um conjunto de mecanismos de defesa incluindo a indução da biossíntese de metabólitos secundários tais como fitoalexinas, resposta de hipersensibilidade e barreiras estruturais de defesa. As fitoalexinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular com propriedades antimicrobianas, sintetizados através da rota do ácido chiquímico e acumuladas nas plantas após exposição aos micro-organismos. Apesar de não se conhecer o seu exato mecanismo, são compostos importantes na defesa da planta contra ataques de bactérias, fungos, nematoides e insetos (PAXTON, 2000; SIMÕES et al., 2005).

A cultura de células e tecidos vegetais tem sido utilizada como alternativa ao uso da planta intacta para o estudo e a produção de diversos metabólitos secundários (CHONG et al., 2005; SEYDEL; DÖRNENBURG, 2006). A eliciação de cultura de células vegetais é uma ferramenta biotecnológica útil para melhorar a produção de metabólitos valiosos (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

Kessmann et al. (1990) relataram o acúmulo de isoflavonóides conjugados em células em suspensão de alfafa induzidas por eliciador fúngico. Hoshino et al. (1994) induziram a síntese de fitoalexina em células em suspensão de pimenta verde eliciadas com ácido araquidônico. Shein et al. (2001) demonstraram a

atividade de dois eliciadores fúngico no acúmulo de compostos fenólicos em calos de coníferas. Su et al. (2002) estudaram a produção de paclitaxel a partir de variante antifúngico de calos de *Taxus* utilizando um eliciador fúngico. Simões et al. (2005) purificaram e caracterizaram fragmentos de um polissacarídeo e ácidos urônicos de esporos do fungo sapróbio *Mucor ramosissimus* que agem como um eliciador capaz de induzir a produção de fitoalexinas em soja. Oliveira et al. (2009) analisaram a presença de compostos antifúngicos produzidos por folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* utilizando eliciadores de fungos e plantas.

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VEGETAIS

A maioria dos compostos presentes nas plantas faz parte do metabolismo primário. Esses compostos são polissacarídeos, lipídeos e proteínas, substâncias essenciais à sobrevivência e desenvolvimento das plantas (VERPOORTE; MEMELINK, 2002). Entretanto, além destes compostos, as plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários. Esses compostos, não necessariamente essenciais ao organismo produtor, desempenham um papel importante na sobrevivência da planta em seu ecossistema (SANTOS, 2000). Os metabólitos secundários estão desse modo, envolvidos na resistência a praga e doenças, na atração de polinizadores, na interação com micro-organismos simbióticos e na adaptação as condições ambientais (VERPOORTE et al., 2000). Alguns metabólitos secundários possuem função bem caracterizada no crescimento ou no desenvolvimento vegetal, podendo ser considerados como metabólitos primários em vez de secundários. É o caso de alguns terpenos como giberelinas e brassinosteróides (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Apesar dos metabólitos secundários estarem presentes nas plantas em concentrações muito baixas, a maioria deles, tais como terpenoides, alcaloides, antocianinas, esteroides, quinonas, ligninas e flavonoides, têm sido muito utilizados comercialmente como fármacos, corantes, aromatizantes, inseticidas etc. (BALANDRIN et al., 1985; VERPOORTE et al., 2002).

Mais de 100.000 metabólitos secundários já foram isolados e identificados, e a cada ano centenas de novas descobertas tem aumentado este número (VERPOORTE et al., 1998). Um exemplo de metabólitos secundários utilizados

comercialmente são a nicotina, as piretrinas e as rotenonas usadas em quantidade limitadas como pesticidas. Alcaloides da beladona (como atropina e escopolamina), alcaloides do ópio (codeína e morfina) alcaloides anticancerígenos do *Catharanthus*, glicosídeos cardiotônicos como o *Digitallis*, pilocarpinas, quinonas, óleos essenciais, antraquinonas, flavonoides, saponinas e taninos entre outros são também muito utilizados na indústria de medicamentos e cosméticos (BALANDRIN et al., 1985). Os flavonoides e os terpenoides, por exemplo, são utilizados como promotores de saúde, ingredientes alimentícios e diversos alcaloides possuem atividades farmacológicas (VOM ENDT et al., 2002).

Geralmente, os metabólitos secundários bioativos possuem alto valor comercial com elevado preço de mercado (BALANDRIN et al., 1985; VERPOORTE et al., 2002). Porém, são sintetizados pelas plantas em pequenas quantidades quando comparados com os metabólitos primários, que são obtidos de plantas em grandes quantidades. Para a obtenção destes metabólitos secundários muitas destas espécies de plantas aromáticas ou medicinais estão sendo domesticadas, e cultivares estão sendo desenvolvidos (BALANDRIN; KLOCKE, 1988; GOOSSENS et al., 2003; KHANUJA et al., 1999).

A capacidade de sintetizar compostos secundários tem sido selecionada ao longo do curso da evolução em diferentes espécies de plantas de acordo com a necessidade específica de cada uma. Por exemplo, a capacidade de algumas plantas sintetizarem substâncias químicas tóxicas está envolvida com a necessidade de repelir patógenos e herbívoros ou reprimir o crescimento de plantas vizinhas. Outros compostos químicos possuem funções celulares que são únicas para as plantas em que ocorrem, como por exemplo, resistência à salinidade ou a seca (PICHERSKY; GANG, 2000).

Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os terpenos ou terpenoides constituem a maior classe de produtos secundários e muitos deles agem na defesa de plantas contra herbívoros. Os compostos fenólicos constituem um grupo quimicamente heterogêneo, e por isso apresentam uma variedade de funções nos vegetais incluindo pigmentação e defesa, esta última através das fitoalexinas. Já os compostos nitrogenados são metabólitos secundários que possuem nitrogênio em sua estrutura e alguns deles agem na defesa da planta contra herbívoros (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A maioria das plantas possui diferentes metabólitos secundários com atividades biológicas diversas como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica, cardiovasculares, antitumorais entre outras. Alguns compostos que possuem atividade antimicrobiana são constitutivos, existindo em plantas saudáveis, na sua forma biologicamente ativa. Outros ocorrem como precursores inativos que são convertidos para formas ativas, por muitas enzimas, em resposta ao ataque de patógenos ou a tecidos danificados. De forma geral, estes precursores ficam sequestrados em vacúolos de células do tecido de plantas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

As fitoalexinas são um exemplo de metabólitos secundários com forte atividade antimicrobiana que se acumulam em torno do local de infecção, em resposta de defesa ao ataque de patógenos. A maioria das fitoalexinas são moléculas lipofílicas. Esta propriedade permite a elas atravessarem a membrana plasmática até um sítio interno de ação no patógeno (SMITH, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Triterpenos, esteroides, lactonas, sesquiterpenos, flavonoides, cumarinas e alcaloides têm demonstrado atividade antiinflamatória em vários modelos de inflamação, atuando sobre distintos mediadores deste processo (LYSS et al., 1997; PELZER et al., 1998; RECIO et al., 1995).

Os flavonoides e isoflavonoides constituem a maior classe de fenólicos de plantas. Estes compostos possuem importante papel em muitos processos fisiológicos essenciais. Além disso, os flavonóides e os isoflavonóides têm efeitos diretos na saúde humana. Por exemplo, os isoflavonóides produzidos pela soja (*Glycine max*) podem prevenir muitos cânceres hormônio-dependente e aumentar a saúde das mulheres (BEECHER, 2003).

Os isoflavonoides são metabólitos secundários produzidos principalmente por plantas leguminosas, possuindo importante função na relação com as bactérias simbióticas do gênero *Rhizobium*, nas respostas de defesa das plantas e possível regulação do transporte de auxina (GRAHAM, 1991; YU et al., 2000). É também evidente o papel dos isoflavonoides na saúde humana como componente da dieta alimentar, por esta razão o controle da síntese dos isoflavonoides possui muitas aplicações importantes (DAVIS et al., 1999).

Os isoflavonoides são sintetizados como parte da via metabólica dos fenilpropanoides. A via dos fenilpropanoides possui múltiplos ramos comuns nas

plantas, que produzem numerosos compostos incluindo ligninas, antocianinas e certas classes de fitoalexinas que possuem função no desenvolvimento normal, e também possuem função de proteção em muitos estresses ambientais (DIXON et al., 1995).

Kessmann et al. (1990) caracterizaram três compostos fenólicos e identificaram um conjugado glicosídico de isoflavonoide que é constitutivo em raízes e cultura de células de alfafa. A distribuição de flavonóides, isoflavonóides e seus conjugados em plântulas, raízes e sementes foram estudados em soja (GRAHAM, 1991). Jung et al. (2000) transformaram plantas de *Arabidopsis* com o gene de soja Isoflavona Sintase (IFS), conseguindo com que estas plantas sintetizassem genisteína, um isoflavonoide com atividade antifúngica.

Os rotenoides são metabólitos secundários conhecidos como componentes ativos de inseticidas utilizados no controle de pragas e no preparo de venenos de caça ou pesca. Além disso, os rotenóides também estão sendo estudados como agentes anticancerígenos em ratos e camundongos (FANG; CASIDA, 1998).

Os rotenoides são originados a partir da estrutura dos isoflavonoides e estão presentes em um pequeno número de plantas. Eles são geralmente localizados em alta concentração nas partes superficiais de órgãos subterrâneos de plantas. O mais comum dos rotenoides é a rotenona, ela foi isolada pela primeira vez em raízes de *Robinia nicou* Aublet, conhecida comumente por 'roten' em Taiwan (RAVANEL et al., 1984).

Ito et al. (2004) estudaram os constituintes químicos em caule de *Derris trifoliata* e identificaram um rotenóide com atividade anticancerígena. Mathias et al. (2005) isolaram uma família de rotenoides em sementes de *Clitoria fairchildiana*. Wangenstein et al. (2005) identificaram rotenoides e isoflavonoides de extratos de *Sarcolobus globosus*. Yenesew et al. (2006) isolaram e caracterizaram rotenóides em sementes de *Derris trifoliata* com atividade larvívica.

Os avanços em cultura de células e tecidos vegetais e em manipulações genéticas podem prover novos meios para a produção econômica de plantas e dos produtos químicos que elas produzem (BALANDRIN et al., 1985).

A cultura de tecidos de plantas tem sido utilizada ativamente como uma fonte potencial de produtos de alto valor biológico. Nagamori et al. (2001) relataram o aumento da produção de antocianinas em calos de uva. Edahiro e Seki (2006) investigaram a correlação entre os metabólitos secundários sintetizados a partir da

via dos fenilpropanóides e o tamanho dos agregados celulares em cultura de células de morango que produzem antocianina constitutivamente. Saimaru et al. (2007) relataram à indução de cultura de células, o isolamento e a identificação de metabólitos terpenóides, e a clonagem de cDNA de "Oxidosqualene Cyclase (OSCs)" a partir de oliveira.

Entretanto, a produtividade de metabólitos secundários bioativos a partir da cultura de células *in vitro* é um fator crítico para a sua aplicação prática. Por isso, existe a necessidade de alternativas como seleção de linhagens de células mais produtoras, alterações no meio nutritivo e uso de eliciadores para intensificar a produção destes metabólitos em cultura de células (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

2.4 LIPIDÔMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os lipídeos são metabólitos formados por um grupo de compostos diversos que possuem importantes funções biológicas como componentes estruturais das membranas celulares, fontes de armazenamento de energia e sinalizadores que permitem a comunicação celular (HUWILER; PFEILSCHIFTER, 2009).

A diversidade de funções dos lipídeos é um reflexo de sua enorme variação estrutural. Ao contrário dos genes e proteínas que são arranjados por combinações lineares de 4 ácidos nucleicos e 20 aminoácidos, respectivamente, as estruturas lipídicas são muito mais complexas (FAHY et al. 2011).

Segundo Smith (2000), o termo lipídeo foi definido de modo vago como um grupo de compostos orgânicos que são insolúveis em água, mas solúveis em compostos orgânicos. Porém, essas características químicas estão presentes em uma ampla gama de moléculas heterogêneas do ponto de vista funcional e estrutural, gerando diferenças significativas com relação à extensão e classificação dos lipídeos (FAHY et al. 2011). O sistema de classificação desenvolvido em 2005 pelo consórcio LIPID MAPS classifica os lipídeos de acordo com a sua biossíntese em dois blocos de construção: cetoacil e isopreno. Consequentemente, os mesmos são definidos como pequenas moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas que podem ter a sua origem na totalidade ou em parte, pela condensação de cetoacil e/ou por condensações de unidades de isopreno, sendo divididos em oito categorias: ácidos

graxos, glicerolípídeos, glicerolfosfolípídeos, esfingolípídeos, sacarolípídeos, policetídeos, lipídeos esterois, lipídeos prenol (FAHY et al. 2005; 2009).

Assim, de acordo com Wenk (2010) estima-se que existem dentro da classe dos lipídeos cerca de 10.000 a 100.000 substâncias químicas. Embora ainda não esteja claro como e por que a natureza gera essa diversidade de lipídeos, há um aumento da importância dos mesmos em todos os aspectos da vida.

Neste sentido, a biologia dos lipídeos vem se tornando alvo de muitas pesquisas. Após a revolução pós-genômica e da biologia dos sistemas, a investigação detalhada das moléculas de lipídeos e suas funções biológicas em células e tecidos, chamada de lipidômica, é uma área que está em rápida expansão e tem se tornado crucial para a compreensão da fisiologia e patologias celulares. A lipidômica é a resposta genética que um organismo apresenta a fatores diversos, através da biossíntese de lipídeos, e que pode ser caracterizada através da identificação desses lipídeos por técnicas avançadas (FAHY et al., 2011; ORESIC et al., 2008; WATSON, 2006; WENK, 2010).

Portanto, a lipidômica é uma área de pesquisa relativamente recente que tem sido impelida pelos rápidos avanços em diversas técnicas analíticas, em especial a espectrometria de massas, e métodos computacionais, juntamente com o reconhecimento do papel dos lipídeos em muitas doenças metabólicas, tais como obesidade, arteriosclerose, acidente vascular cerebral e diabetes. Assim, muitas drogas hoje possuem como alvo lipídeos e suas vias de sinalização (FAHY et al., 2011; WENK, 2010).

Segundo Harwood (1997), os lipídeos utilizados como armazenamento de energia na célula (óleos e gorduras) nos organismos vivos são derivados de ácidos graxos, sendo os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (ácido α -linolênico) e ômega-6 (ácido linoleico) considerados essenciais à nutrição humana, pois não são sintetizados pelo corpo humano, e obtidos somente a partir da dieta.

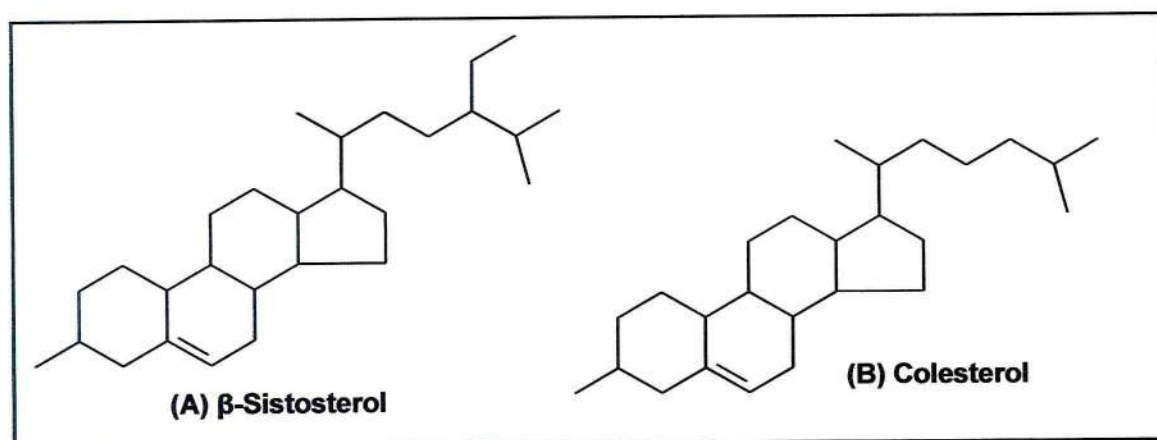
Além disso, esses ácidos graxos poliinsaturados são precursores da síntese de ácidos graxos poliinsaturados maiores como: ácido araquidônico derivado do ácido linoleico, eicosapentanoico e docosahexanoico a partir do ácido α -linolênico, e estão relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares (HUWILER; PFEILSCHIFTER, 2009).

De acordo com Harwood (1997), o ácido hexadecanoico (palmítico) e o ácido octadecanoico (oleico) são os ácidos graxos saturados e monoinsaturados, respectivamente, mais comuns encontrados em plantas.

Já os esteróis são lipídeos estruturais de membrana presentes na maioria das células eucarióticas. Em animais o principal esterol é o colesterol. Em vegetais os esteróis encontrados exclusivamente em plantas são os fitosteróis, membros dos isoprenoides triterpenoides, caracterizados pelo anel 3β -monohidroxiperhidro-1,2-ciclopentanofenantreno (BRAMLEY, 1997; OSTLUND, 2002). Segundo Bramley (1997), o colesterol raramente excede uma pequena porcentagem de uma mistura de fitosteróis. Os fitosteróis possuem estrutura semelhante ao colesterol (colest-5-en- 3β -ol) de células animais, apresentam em sua estrutura uma dupla ligação no carbono 5 (C-5) e diferem do colesterol principalmente pela presença de um grupo metila ou etila no carbono 24 (C-24) da cadeia lateral (AWAD; FINK, 2000; ZHOU et al., 2008) (Figura 3).

Os fitosteróis mais comuns são o sitosterol, campesterol e o estigmasterol (AWAD; FINK, 2000). Destes, cerca de 80% do total de fitosteróis são β -sistosterol (AWAD et al., 2008; BOUIC et al., 1996).

Figura 3 - Comparação da estrutura química do esteróis (A) β -sitosterol (vegetais) com o (B) colesterol (animais).



Os fitosteróis podem ser sintetizados por duas vias que se iniciam com a fixação de CO_2 , formação de açúcar na fotossíntese, e conversão em acetato. O

acetato pode ser convertido pela via do mevalonato citosólico em isopentil difosfato (IPP). No entanto, nos cloroplastos o açúcar pode ser diretamente convertido em isoprenoides sem envolver a intermediação do acetato através do mevalonato-independente. Os isoprenoides unidos formam o esqualeno que é o precursor dos fitosteróis (BRAMLEY, 1997; LAULE et al., 2003; UMLAUF et al., 2004; ZHOU; NES, 2000).

A semelhança física dos esteróis é devido à semelhança das vias biossintéticas e das funções destes compostos. A característica marcante dos fitosteróis é a via direcionada para formar componentes da membrana celular, de forma semelhante ao colesterol nos animais. Porém, a sutil diferença na estrutura da cadeia lateral dos esteróis, sinaliza que estes possuem algumas funções diferentes em plantas (ZHOU et al., 2008).

As células vegetais necessitam de esteróis para a produção de membranas nas células em divisão e para o seu crescimento, como fator estimulante (BRAMLEY, 1997).

Segundo Zhou et al. (2008), os fitosteróis têm sido considerados alimentos nutracêuticos. Uma dieta rica em fitosteróis possui muitos benefícios à saúde, já que os mesmos têm demonstrado experimentalmente inibição de cânceres de mamas, próstata e cólon, além de efeitos antiinflamatórios e redução dos níveis de colesterol. Segundo Awad e Fink (2000), a dieta ocidental (80 mg/d) possui um baixo teor de fitosteróis em comparação com as dietas vegetarianas e japonesa (345 mg/d e 400 mg/d, respectivamente). A melhor fonte de fitosterol são os óleos vegetais não refinados, sementes, nozes e leguminosas.

Os fitosteróis possuem um amplo espectro de atividades biológicas em animais e humanos. E vários estudos em animais e humanos têm demonstrado que os fitosteróis são eficientes redutores do colesterol total e do nível da LDL (lipoproteína de baixa densidade ou colesterol ruim) (CALPE-BERDIEL et al., 2008; LING; JONES, 1995; PATCH et al., 2006). Os fitosteróis possuem efeito cardioprotetor reduzindo o colesterol e o LDL, e podendo ser utilizado em combinação com uma dieta hipolipemiante em terapias farmacológicas (JONES; RIDEOUT, 2011). Calpe-Berdiel et al. (2009) afirmam que os esteróis de plantas são conhecidos redutores da LDL e do nível do colesterol, e alimentos contendo estes compostos são amplamente utilizados em dietas como opção terapêuticas para reduzir o colesterol do sangue e os riscos de arteriosclerose. A ação do fitosterol na

redução do colesterol está relacionada, pelo menos em parte, com a competição com o colesterol da dieta pela absorção intestinal.

Os fitosteróis possuem potencial antiinflamatório descrito em vários trabalhos. Segundo Gabay et al. (2010) o estigmasterol possui atividade antiinflamatória e anticatabólicas que pode neutralizar enzimas envolvidas na degradação de cartilagens em doenças como osteoartrites. Navarro et al. (2001) afirmaram que os fitosteróis reduziram o edema de pata e a inflamação de neutrófilos em tecidos inflamados, além de reduzir os níveis de íons superóxidos em artrites de ratos induzidas. Huwiler e Pfeilschifter (2009) relatam que os lipídeos possuem importante função adicional como moléculas sinalizadoras regulando respostas celulares como reações antiinflamatórias.

Micallef e Garg (2009a) provaram que a dieta com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (ω -3) e fitosterol reduzem a inflamação sistêmica em indivíduos hiperlipidêmicos, sugerindo que estes possuem efeito cardioprotetor. Além disso, os esteróis possuem atividade hipocolesterolêmica, embora seu efeito sobre a cascata inflamatória seja incerta.

Além disso, o β -sitosterol possui vários efeitos biológicos, sendo um nutriente essencial para o aumento do sistema imunológico. Os fitosteróis, β -sitosterol e o sitosterol glicosilado, estimulam o aumento da proliferação *in vitro* e *in vivo* de linfócitos no sangue, agindo como imunomoduladores (BOUIC et al. 1996). O β -sitosterol também está relacionado como inibidores da enzima 5- α redutase (5AR), com eficácia no tratamento de Alopecia androgenética (AGA) (PRAGER et al., 2002). Além disso, Panda et al. (2009) relataram que o estigmasterol isolado de *Butea monosperma* mostrou propriedades inibidoras da tireoide e efeitos antioxidantes e hipoglicêmicos.

Experimentos em laboratório mostraram que o β -sitosterol na dieta inibiu o crescimento *in vitro* e *in vivo* de vários tipos de células tumorais, incluindo células de câncer de mama (AWAD et al., 2000, 2002, 2003). Ahikisa et al. (2000) afirma que os fitosteróis e ferulatos de 4 α -metilesteróis encontrados no farelo de arroz possuem propriedades antitumoral. E ainda segundo estudos mais recentes de Awad et al. (2008), o β -sitosterol aumenta a eficácia do fármaco tamoxifeno em células de câncer de mama afetando o metabolismo de ceramidas. Desta forma, uma dieta baseada em plantas rica em fitosteróis pode oferecer proteção contra cânceres mais comuns, como câncer de mama, cólon e próstata (AWAD; FINK, 2000). Entretanto,

de acordo com Zhou et al. (2008) o exato mecanismo pelo qual o sistosterol oferece essa proteção ainda não é conhecido. Em Nyctaginaceae, nenhum trabalho sobre lipidômica e atividades farmacológicas de esteróis e ácidos graxos são relatados na literatura.

3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS DE RAÍZES DE *Boerhavia paniculata*

RESUMO

Boerhavia paniculata Rich. é uma planta medicinal muito utilizada contra a inflamação das vias urinárias e uterinas, e vem sendo estudada intensivamente devido às diferentes propriedades atribuídas na medicina popular. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antiinflamatória e o perfil químico de extratos de raízes da espécie *B. paniculata*. Inicialmente, as raízes das plantas foram secas em estufa a 60°C por 48h, trituradas e submetidas à extração em coluna de vidro, com os solventes hexano, acetato de etila e solução hidroalcóolica 80% (v/v). A atividade antimicrobiana dos extratos acetato e hexânico foi analisada utilizando o método do disco de difusão em ágar contra as leveduras *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. A atividade antiinflamatória de todos os extratos foi avaliada pelo método da redução do volume do edema da pata de ratos induzido por carragenina. O perfil químico do extrato hexânico foi analisado através de técnica de lipidômica em CG/EM. Nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade antimicrobiana frente às espécies testadas. O extrato hexânico apresentou significativa atividade antiinflamatória em relação ao controle, reduzindo 77,3% o número de células inflamatórias. A análise do perfil lipídico do extrato hexânico identificou 33 substâncias, com maior proporção de fitosteróis (64,44%) e ácidos graxos (34,48%). Os fitosteróis encontrados em maior proporção foram o β -sitosterol e o estigmasterol. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que os fitosteróis encontrados no extrato hexânico podem ser responsáveis pelos efeitos farmacológicos observados na planta e permitem ampliar o conhecimento químico-farmacológico em *Boerhavia paniculata*.

Palavras-chave: *Boerhavia paniculata*, lipidômica, fitosteróis, atividade antiinflamatória, atividade antimicrobiana, raízes.

ABSTRACT

Boerhavia paniculata Rich. is a medicinal plant widely used against inflammation of the uterus and urinary tract, and it has been studied intensively due to the different properties attributed in folk medicine. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial and anti-inflammatory activities and chemical profile of extracts of roots of the specie *B. paniculata*. Initially, the roots of the plants were dried at 60 °C for 48 hours, crushed and subjected to extraction glass column (1cm x 30cm), with solvents hexane, ethyl acetate and hydroalcoholic solution 80% (v/v). The antimicrobial activity of acetate and hexane extracts were analyzed using the method of disk diffusion in agar against the yeast *Candida albicans*, *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*. The anti-inflammatory activity of all extracts was evaluated by method of the reducing rat paw edema carrageenan-induced. The chemical profile of extract was analyzed by lipidomic technique of GC/MS. Neither extracts tested showed antimicrobial activity against the species tested. The hexane extract showed significant anti-inflammatory activity compared to control treatment, reducing 77.3% inflammatory cells. The analysis of the lipid profile of extract identified 34 substances, with a higher proportion of phytosterols (64.44%) and fatty acids (34.48%). The phytosterols found in greater proportion were β -sitosterol and stigmasterol. The present results suggest that phytosterols found in the hexane extract may be responsible by pharmacological effects observed in plant and they allow to increase knowledge chemical pharmacological in *Boerhavia paniculata*.

Keywords: *Boerhavia paniculata*, lipidomic, phytosterols, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity, roots.

3.1 INTRODUÇÃO

Boerhavia paniculata, Rich. é uma planta medicinal pertencente à família Nyctaginaceae, conhecida popularmente como erva tostão ou pega-pinto. Raízes e folhas desta planta são utilizadas na medicina tradicional de vários países, principalmente como expectorante, diurético, laxante, tratamentos de asma, icterícia, ascite, infecções da via urinária (FNA, 2011; MÉNDEZ et al., 2001; SANTOS et al., 2007; TAYLOR, 2005). O gênero *Boerhavia* sp. tem sido intensamente estudado quanto às propriedades químicas e farmacológicas dos extratos e metabólitos nos últimos anos (BORRELLI et al., 2005, 2006; HIRUMA-LIMA et al., 2000; NALAMOLU et al., 2004).

Desta forma, baseada na informação etnofarmacológica na qual as raízes de *B. paniculata* são utilizadas para combater as inflamações das vias urinárias é que se iniciou uma investigação para avaliar diversos grupos de metabólitos. Assim, a investigação desta planta tinha inicialmente a finalidade estudar os metabólitos, principalmente os flavonoides, e verificar se estes possuíam atividade antimicrobiana, atuando na inflamação urinária. Porém, ao longo da investigação foi identificado que somente o extrato hexânico da planta é que apresentavam atividades antiinflamatórias. Desta forma, a investigação foi direcionada para os extratos hexânicos e para o estudo dos lipídeos presentes nestes extratos.

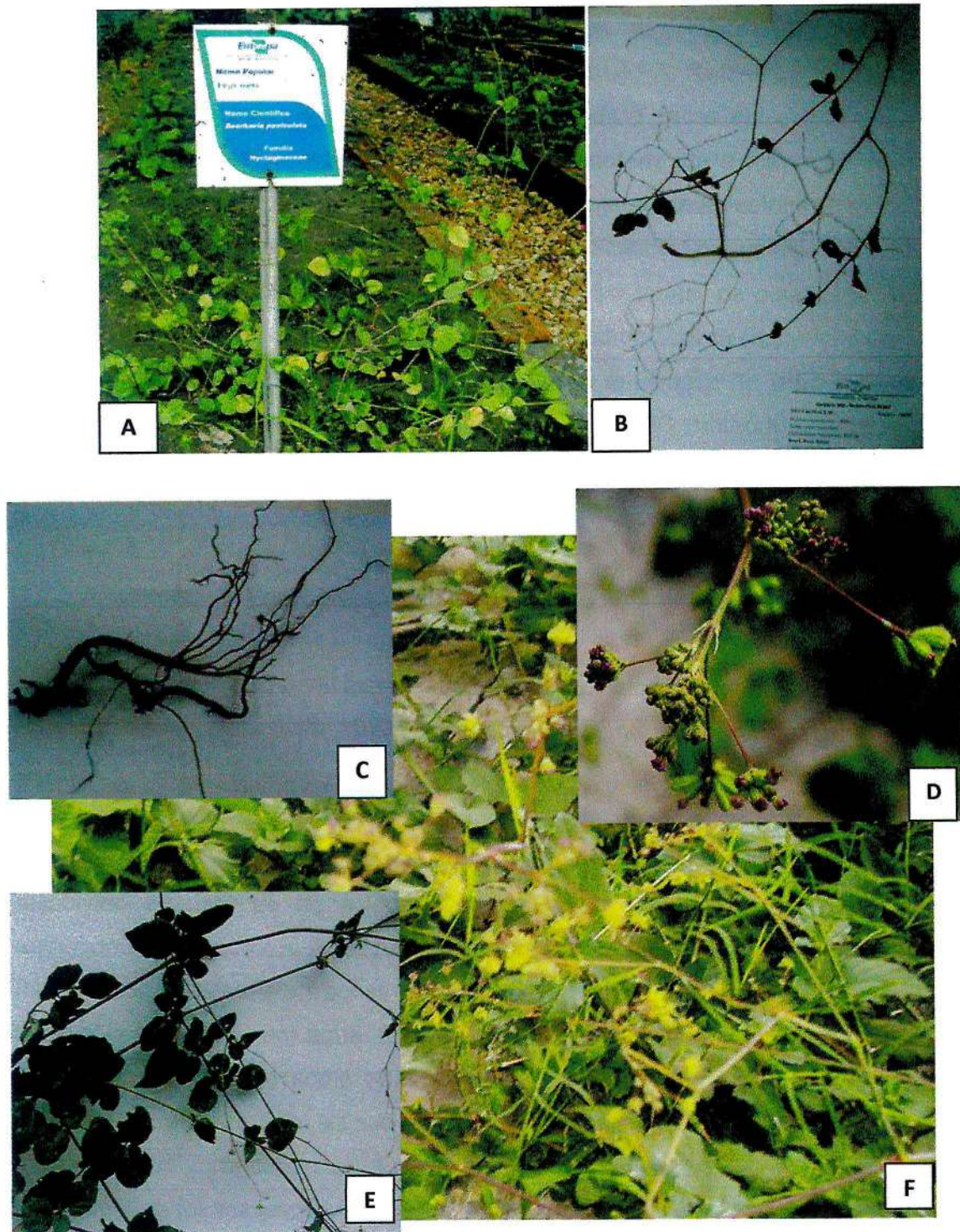
Atualmente, a biologia dos lipídeos vem se tornando alvo de muitas pesquisas através da lipidômica (FAHY et al., 2011; WENK, 2010). Os lipídeos são metabólitos formados por um grupo de substâncias diversas que possuem importantes funções biológicas (HUWILER; PFEILSCHIFTER, 2009). Um dos grupos mais estudados quanto sua atividade biológica e, principalmente quanto à atividade antiinflamatória, são as prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX), que juntos são denominados de prostanoídeos. Os prostanoídeos podem agir como mediadores pro-inflamatórios e anti-inflamatórios, dependendo do conjunto de receptores e das vias de sinais que eles estão acoplados (TILLEY et al., 2001 apud NICOLAOU; KOKOTOS, 2004). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antiinflamatória e o perfil químico dos extratos de raízes da espécie *Boerhavia paniculata* Rich.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal

Plantas de *Boerhavia paniculata* foram coletadas no Horto de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, coordenadas 1°26'18"S e 48°26'35"W-Belém-PA (Figura 4). As plantas coletadas foram identificadas por Jair Freitas e supervisionado por Silvana Tavares Rodrigues, e a exsicata registrada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental como *Boerhavia paniculata* Rich. (n° 184191).

Figura 4 – *Boerhavia paniculata* Rich.: (A) planta coletada no Horto de Plantas Medicinais, (B) exsiccata registrada e identificada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental, (C) detalhes da raiz, (D) flores, (E) folhas e (F) planta coletada no campo.



O modo de injeção foi 1 µL em split (1:5). A velocidade linear do gás de arraste foi de 1,2 mL/min, utilizando-se Hélio como gás de arraste. A coluna utilizada foi HP-5ms 5% fenil-metil-silox com 30 m x 25 µm de DI x 0,25 µm de espessura de filme. O injetor e a linha de transferência foram mantidos em 250°C. O Espectrômetro de massas operou a 70 eV, com 1 scan/s. Os dados foram analisados em bibliotecas padronizadas da base de dados "The Golm Metabolome Data Base".

3.2.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Raízes

Para a análise da atividade antimicrobiana, os extratos hexânico (Ehex) e acetato de etila (Eacet) das raízes de *B. paniculata* foram avaliados contra as linhagens de leveduras *Candida albicans* (IOC 3770), *Candida parapsilosis* (IOC 2882) e *Candida guilliermondii* (IOC 2889). O preparo dos inóculos de micro-organismos foi realizado através do preparo de uma suspensão de esporos em tubos de ensaios contendo 9 mL de solução salina (NaCl) 0,9% em uma concentração de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL. O método utilizado para análise antimicrobiana dos extratos foi o método do disco de difusão em ágar (BAUER et al., 1966). Foram aplicados 20 µL de uma solução dos extratos a 20 mg/mL (20 mg de extrato em 1 mL do solvente de extração) sobre discos de papel filtro qualitativo ($\varnothing = 5$ mm) dispostos em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultivo sólido GPY (glicose, peptona e extrato de levedura). Em seguida, os discos contendo os extratos foram levados à estufa a 35°C até evaporação do solvente e, com o auxílio de um cotonete estéril as suspensões de micro-organismos foram aplicadas sobre as placas contendo os extratos e incubadas a 27°C por até 72 h. Após este período, foi medido o diâmetro (cm) do halo de inibição formado em volta de cada disco. Como controle positivo foi utilizado discos de papel contendo nitrato de miconazol (HERRERA, 2001).

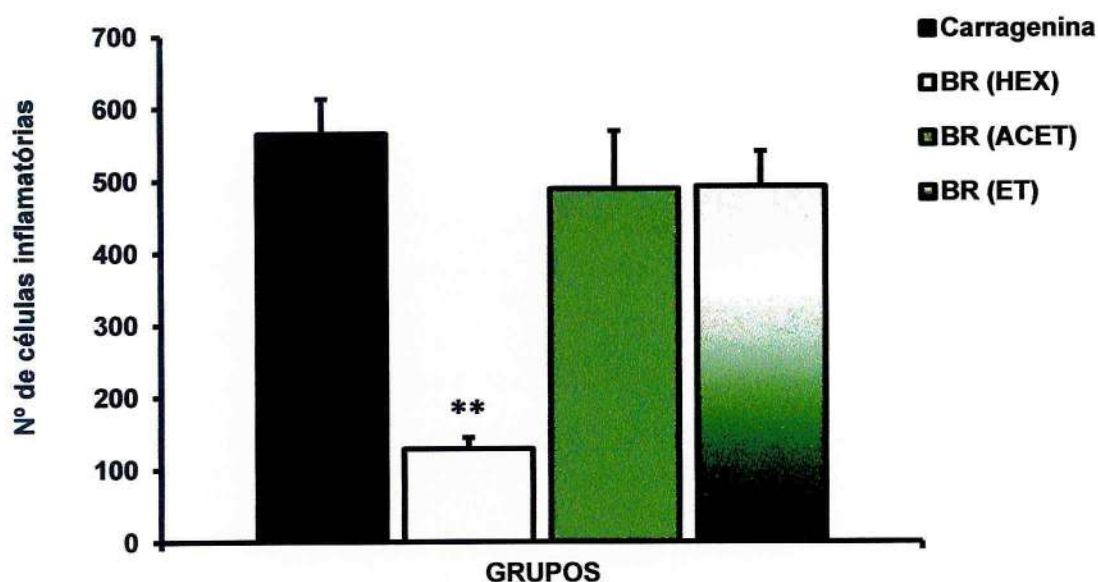
3.2.5 Avaliação da Atividade Antiinflamatória das Raízes

Os Ehex, Eacet e Eetoh das raízes de *B. paniculata* foram submetidos avaliação da atividade antiinflamatória pela redução do volume do edema de pata de rato induzido por carragenina pelo método da bolsa de ar.

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os Eetoh, Eacet e Ehex de raízes de *B. paniculata*. Os Eetoh e Eacet apresentaram uma menor taxa de redução das células inflamatórias (12,93% e 13,5%) comparado com o controle positivo, respectivamente.

Ao contrário, o Ehex das raízes apresentou significativa atividade antiinflamatória mostrando um grande potencial contra a inflamação comparado com o controle positivo, com redução de 77,3% do número de células inflamatórias. Estes dados demonstram que o extrato hexânico das raízes de *B. paniculata* possui metabólitos ativos com ação antiinflamatória quando avaliado neste método da bolsa de ar pela redução do edema de pata de ratos induzido por carragenina. Estes compostos ativos podem atuar isoladamente ou talvez algum destes compostos possa operar de forma sinérgica.

Figura 5 – Gráfico da atividade antiinflamatória dos extratos das raízes de *Boerhavia paniculata* Rich. sobre o número de células inflamadas no edema de pata de ratos induzido por carragenina no modelo de bolsão de ar.



A carragenina é um agente inflamatório que produz inflamação por liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de um edema. Os resultados demonstram atividade antiedematogênica do extrato Ehex testado. É possível que,

assim como a indometacina (controle positivo), os componentes deste extrato estejam inibindo a biossíntese de prostaglandinas (FARSAM et al., 2000).

Segundo Huwiler e Pfeilschifter (2009), a inflamação é uma importante resposta celular desencadeada por vários fatores como estresse mecânico, químico ou imunológicos e regulada por um delicado equilíbrio entre estes fatores, sendo caracterizada por dor, febre, vermelhidão, inchaço, e por último, perda de função. A inflamação é reconhecida como uma característica central na patogênese de diversas doenças da civilização Ocidental moderna tais como câncer, arteriosclerose, diabetes, asma, ou vários distúrbios neuropatológicos tais como acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer ou Parkinson.

Estima-se que cerca de 25% dos fármacos empregados em países industrializados sejam desenvolvidos a partir de produtos naturais, em especial de plantas (BOTSARIS; MACHADO, 1999). Em geral, o estudo das plantas medicinais inicia-se com a análise da forma em extrato da referida planta a fim de se investigar seus efeitos biológicos em potencial. Neste tipo de estudo leva-se em consideração todas as substâncias presentes no extrato da planta com intuito de se isolar e identificar posteriormente os seus princípios ativos (MACIEL et al., 2002).

Assim, o extrato hexânico de *B. paniculata* apresentou um potencial efeito biológico. Neste contexto, o estudo de plantas medicinais, como a espécie *Boerhavia*, apresenta um alto potencial biotecnológico visto que tais componentes, uma vez identificados, podem vir a se tornar novos fármacos.

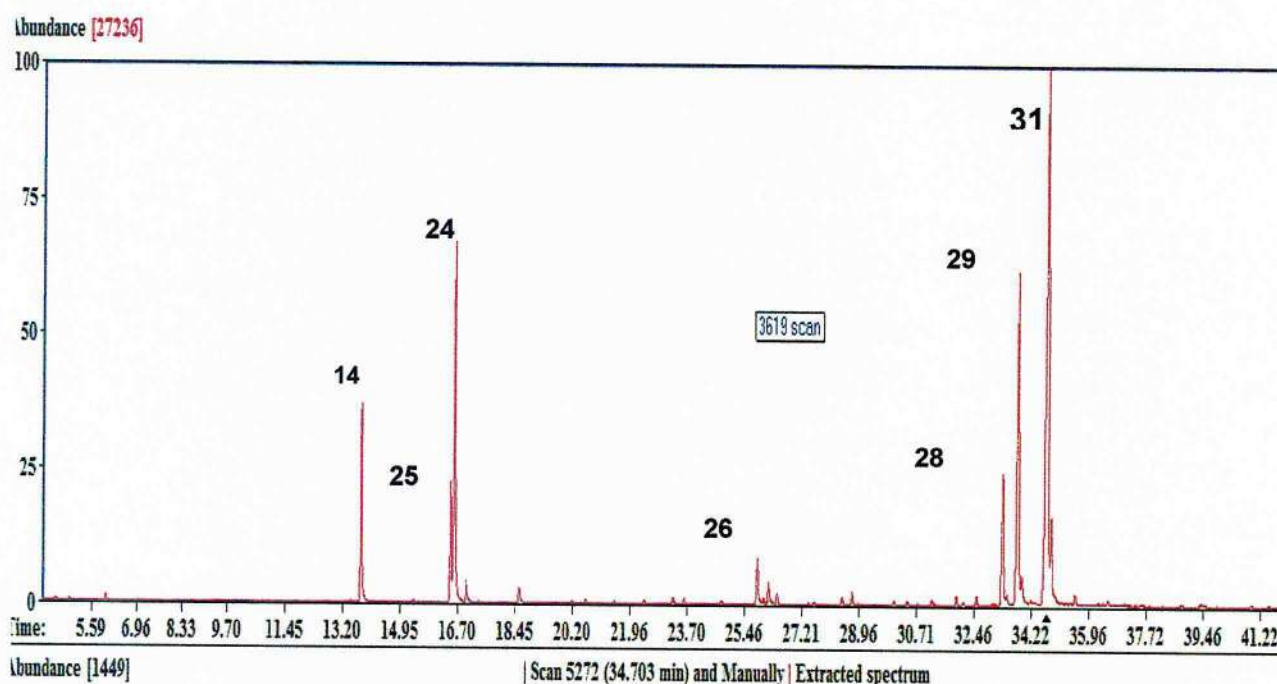
3.3.3 Perfil Metabólico do Extrato Hexânico das Raízes

O extrato hexânico é caracterizado pela presença de compostos apolares, majoritariamente lipídeos. Muitos trabalhos científicos relatam inúmeras propriedades biológicas dos lipídeos, entre elas propriedades antiinflamatórias (BOUIC et al., 1999; BOUIC; LAMPRECHT, 1999; GABAY et al., 2010; HUWILER; PFEILSCHIFTER, 2009; MENCARELLI et al., 2009; MICALLEF; GARG, 2009a; NAVARRO et al., 2001).

A análise do extrato hexânico das raízes da planta silvestre de *B. paniculata* evidenciaram o perfil lipídico do extrato, permitindo a identificação de 33 substâncias.

O cromatograma do extrato das raízes obtido a partir das análises no CG/EM apresentou oito picos separados em dois grupos (Figura 6). No primeiro grupo estão relacionados ácidos graxos, cujos picos foram identificados de acordo com o lipidoma como: o ácido hexadecanoico ou palmítico (14), ácido graxo octadecenoico ou oleico (24), ácido octadecadienoico ou linoleico (25) e ácido tetracosadienoico (26). No segundo grupo estão relacionados os fitosteróis: campesterol (28), estigmasterol (29) e β -sitosterol (31).

Figura 6 – Cromatograma das análises do extrato hexânico de raízes de *Boerhavia paniculata* Rich. por CG/EM.



Das substâncias identificadas no extrato hexânico das raízes de *B. paniculata*, a maior proporção foi de fitosteróis (64,44%), seguido de ácidos graxos (34,48%) e álcool graxo e outros (0,92%). Os ácidos graxos identificados no extrato hexânico foram, em sua maioria, monoinsaturados (14,3%), seguidos por ácidos graxos saturados (11,71%), ácidos graxos insaturados (7,33%) e ácidos graxos hidroxilados (1,14%) (Tabela 2).

O ácido hexadecanoico (palmítico) e o ácido octadecanoico (oleico) são os ácidos graxos, respectivamente, saturado e monoinsaturado, mais comuns

encontrados em plantas (HARWOOD, 1997). Os ácidos graxos poliinsaturados, ácido linoleico (ômega 6) e ácido linolênico (ômega 3), são encontrados extensivamente como lipídeos de membrana, e são considerados ácidos graxos essenciais, sendo importantes como precursores de ácidos graxos insaturados maiores como o ácido araquidônico derivado do ácido linoleico, eicosapentaenoico e docosaexaenoico a partir do ácido α -linolênico (HUWILER; PFEILSCHIFTE, 2009).

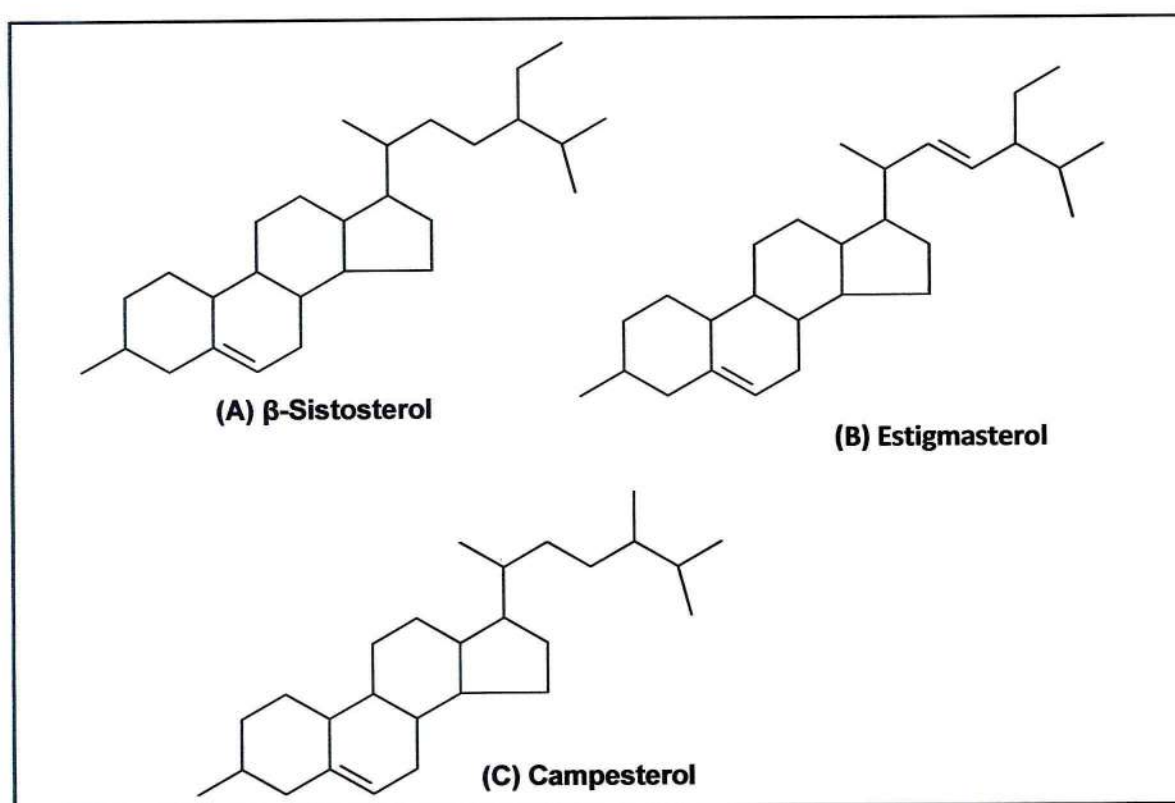
Tabela 2 - Lipidoma do extrato hexânico de raízes da planta silvestre de *Boerhavia paniculata* Rich. analisado por meio de lipidômica em CG/EM.

CLASSIFICAÇÃO	IR	%
ÁLCOOL GRAXO E OUTROS COMPOSTOS		
1. Glicerol	1279	Tr
2. Ácido fosfórico	1284	0,13
3. Octadecanol	2159	Tr
4. Docosanol	2554	0,26
5. Tetracosanol	2751	0,45
6. 2-Monostearina	2798	Tr
ÁCIDOS GRAXOS HIDROXILADOS		
7. Ácido 2-hidroxi-Hexadecanoico	2132	Tr
8. Ácido 2-hidroxi-Tricosanoico	2821	0,07
9. Ácido 2-hidroxi-Tetracosanoico	2898	0,39
10. Ácido 2-hidroxi-Tetracosanoico	2921	0,53
11. Ácido 2-hidroxi-Pentacosanoico	3018	0,13
ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS		
12. Ácido Tetradecanoico (Mirístico)	1724	0,08
13. Ácido Pentadecanoico	1826	Tr
14. Ácido Hexadecanoico (Palmítico)	1925	7,87
15. Ácido Heptadecanoico	2028	0,11
16. Ácido Octadecanoico (Estearico)	2128	0,94
17. Ácido Nonadecanoico ME - (Padrão Interno)	2229	0,87
18. Ácido Eicosanoico (Araquídico)	2331	0,08
19. Ácido Heneicosanoico	2631	0,20
20. Ácido Docosanoico (Behênico)	2532	0,37
21. Ácido Tetracosanoico (Lignocérico)	2734	1,16
22. Ácido Pentacosanoico	2833	0,13
ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS		
23. Ácido 7-Hexadecenoico (Palmitoléico)	1905	0,05
24. Ácido 9-Octadecenoico (Oleico)	2105	14,25
ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS		
25. Ácido 9,12-Octadecadienoico (Linoleico)	2098	5,14
26. Ácido Tetracosadienoico	2709	2,19
ESTEROIS E DERIVADOS		
27. Estigmastan-3,5-dieno	3111	0,21
28. Campesterol (Ergost-5-en-3 β ol)	3274	7,63
29. Estigmasterol	3307	19,54
30. 24-Etil-(22)-coprostenol	3316	0,79
31. β -Sitosterol	3371	32,59
32. Estigmastan-3-ol	3380	3,15
33. Ciclolaudenol	3477	0,17

Nota: (1) O ácido nonodecanoico foi utilizado como padrão interno. (2) IR = Índice de Retenção calculado. (3) Tr = traço (<0,05)

Na Figura 7 os fitosteróis identificados por CG/EM são mostrados. No extrato hexânico, foram encontrados campesterol com 7,63%, β -sitosterol com 32,59% e estigmasterol com 19,54%.

Figura 7 - Fitosteróis identificados por CG/EM nos extratos hexânicos das raízes da planta silvestre de *Boerhavia paniculata*: (A) β -sitosterol, (B) estigmasterol e (C) campesterol.



Müller (2010) detectou em análises de CCD (HPTLC) e CCDP (HPPLC) de extratos hexânicos de raízes de *B. paniculata* silvestre a presença de manchas definidas e intensas que isoladas e analisadas por meio de RMN ^1H e ^{13}C revelaram sinais característicos dos fitosteróis β -sitosterol e estigmasterol, triacilgliceróis em mistura com ácidos graxos, e os ácidos linoleico, esteárico, araquídico e margárico.

Pereira et al. (2009) analisaram o perfil metabólico de compostos voláteis de *B. diffusa* e detectaram a presença de terpenos, fenilpropanoides, flavonoides, ácidos orgânicos e fenólicos entre outros, com diferenças quantitativas destes compostos nas raízes e folhas desta planta. Miralles et al. (1988) identificaram a presença dos ácidos graxos linolenato, palmitato e linoleato, além dos esteróis sitosterol, campesterol e estigmasterol em folhas de três espécies de *Boerhavia*.

Os compostos encontrados no extrato hexânico das raízes de *B. paniculata* podem contribuir isoladamente ou sinergicamente para a atividade antiinflamatória detectada nestes extratos.

Dos compostos identificados no extrato hexânico, os fitosteróis são os que possuem o mais amplo espectro de atividades biológicas. Estes compostos são considerados alimentos nutracêuticos, pois possuem muitos benefícios à saúde, demonstrado experimentalmente através da inibição de cânceres de mamas, próstata e cólon, além de efeitos antiinflamatórios e redução do nível de colesterol (JONES; RIDEOUT, 2011; ZHOU et al., 2008).

Micallef e Garg (2009a) provaram que a dieta com ácidos graxos poliinsaturados n-3 e esterol de plantas reduzem a inflamação sistêmica em indivíduos hiperlipidêmicos, sugerindo que estes dois em conjunto fornecem um mecanismo com potencial cardioprotetor.

Segundo Gabay et al. (2010) o estigmasterol possui potencial antiinflamatório e anticatabólico que pode neutralizar enzimas envolvidas na degradação de cartilagens em doenças como osteoartrites. Navarro et al. (2001) afirmaram que os fitosteróis utilizados em seus experimentos reduziram o edema de pata e a infiltração de neutrófilos em tecidos inflamados, além de reduzir o nível de íons superóxidos em artrites de ratos induzida.

Delparte et al. (2005) relataram a presença de atividade antiinflamatória nos extratos hexânicos de *Proustia pyrifolia* devido principalmente a um dos componentes identificados nas análises fitoquímicas desta planta: o β -sitosterol. Ebrahimzadeh et al. (2006) identificaram alta atividade antiinflamatória em extratos hexânicos das partes aéreas e raízes de *Sambucus ebulus*.

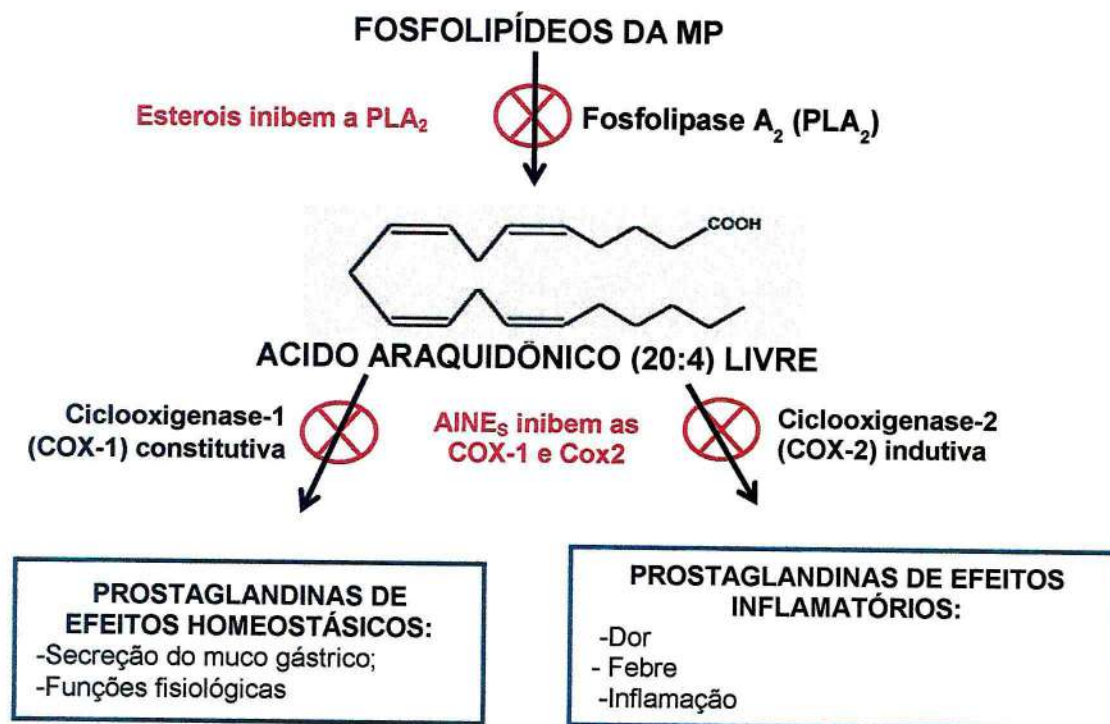
Chauhan e Joshi (2011) relataram que o extrato aquoso de raízes de *Boerhavia diffusa* inibiu o crescimento *in vitro* de estruvita um tipo de cálculo infeccioso que está associado à infecção do trato urinário. Os autores propõem que

a inibição do crescimento dos cristais de estruvita pode estar relacionada à presença de esteróis, lipídeos e ácidos orgânicos nestes extratos.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que o princípio ativo antiinflamatório está presente no extrato hexânico de *B. paniculata*. O mecanismo por trás deste efeito antiinflamatório das raízes de *B. paniculata* ainda não é conhecido, mas de acordo com os metabólitos encontrados no extrato bioativo e os dados relatados na literatura, este efeito pode estar relacionado à ação dos fitosteróis. Estes resultados confirmam a utilização popular das raízes de *B. paniculata* como antiinflamatório principalmente das vias urinárias.

Na Figura 8 é ilustrado a biossíntese de prostaglandinas e a ação dos esteróis no processo inflamatório. As prostaglandinas têm intima relação com a inflamação e possui como precursor o ácido araquidônico livre.

Figura 8 - Esquema da biossíntese de prostaglandinas e ação dos esteróis e AINEs na inflamação.



A biossíntese de prostaglandinas é iniciada com a ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) em resposta a hormônios e outros estímulos que ataca os fosfolípidios da membrana plasmática da célula liberando o ácido araquidônico livre. O ácido araquidônico livre sofre a ação de duas isoenzimas, a ciclooxygenase 1 (COX1) e a ciclooxygenase 2 (COX2). A COX1 é uma enzima constitutiva das células, e sua ação converte o ácido araquidônico em prostaglandinas de efeitos homeostáticos, relacionadas à produção do muco gástrico e outras funções fisiológicas. Já a COX2 é uma enzima indutiva ativada por estímulos inflamatórios produz prostaglandinas de efeito inflamatório que causam a dor, febre e a inflamação nos tecidos (CALDER; BURDGE, 2004; HILÁRIO et al., 2006).

A chave da ação antiinflamatória dos esteróides é conseguida pela inibição da enzima PLA₂ via bloqueio da liberação do ácido araquidônico dos glicerofosfolípidios da membrana plasmática. A anexina-1, previamente conhecida como lipocortina, e a lipoxina são moléculas que regulam este efeito. A anexina-1 é um peptídeo induzido por esteróides e possui rota convergente com a lipoxina recentemente descrita, indicando que ambas as substâncias necessitam da ativação do receptor lipoxina A₄ (ALXR). Neste sentido, estes esteróides apresentam interessante função como precursores ou intermediários na formação de moléculas com atividade antiinflamatória (HE et al., 2003).

PPAR ("peroxisome proliferator-activated receptor") é uma família de receptores de hormônios esteroidais expressos além de outras células, em células inflamatórias e que estão envolvidos na regulação da produção dos mediadores inflamatórios (CALDER, 2002 apud CALDER; BURDGE, 2004). Prostanoides derivados do ácido araquidônico e outras moléculas derivadas de ácido araquidônico são ligantes e ativadores do PPAR. Estudos mais recentes mostraram que o ácido oleico, ácido linoleico, ácido α -linolênico e ácido araquidônico também são ligantes efetivos e ativadores de PPAR (KLIEWER et al., 1997 apud CALDER; BURDGE, 2004). Assim, através da ativação do PPAR, os ácidos graxos são capazes de regular o metabolismo e repostas de outras células e tecidos. Neste sentido, é provável que a regulação destas substâncias possa levar a minimização da inflamação por algum mecanismo que ainda não se conhece. Em geral, os eicosanoides possuem muitos papéis tais como regulação da agregação de placas,

contração do músculo, inflamação e outros. Mesmo em pequeninas quantidades tais substâncias podem atuar de maneira detectável.

Os fármacos utilizados como antiinflamatório possuem efeitos indesejáveis e sua ação não é realmente eficaz na inflamação. Os antiinflamatórios de ação não esteroideais (AINEs) são formados por um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades eficazes antiinflamatória, analgésicas e antipiréticas, porém estes possuem muitos efeitos adversos em seu uso continuado. Os AINEs atuam inibindo as duas isoenzimas COX1 e COX2 e essa inibição reduz o efeito inflamatório causado pela COX2, mas tem efeitos indesejáveis, pois inibe a COX1. (BJORKMAN, 1996; WALLACE, 1997). Os novos medicamentos antiinflamatórios denominados COXIBs são seletivos para COX2, mas esses medicamentos também têm demonstrado efeitos indesejáveis no organismo. Neste contexto, a busca de novos fármacos que atuem com propriedades antiinflamatórias por mecanismos diferentes dos fármacos AINES, com menos efeitos indesejáveis e maior eficácia é o objeto de investigação atual.

Existem vários compostos, com grande diversidade química, obtidos de fontes naturais como plantas que tem evidenciado atividade antiinflamatória como os triterpenos, esteroides, flavonóides, cumarinas, alcalóides, (BACKHOUSE et al., 2011; DELPORTE et al., 2005; SPARG et al., 2004; WANG et al., 2012). Assim, a grande diversidade de plantas que existem pode representar um tesouro enorme para o desenvolvimento de novos medicamentos (VERPOORTE et al., 2006).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o extrato hexânico possui importantes metabólitos de interesse e sugerem ainda, que a espécie *B. paniculata* é uma fonte de substâncias naturais ativas importantes farmacologicamente. Este trabalho também evidenciou cientificamente o uso de *B. paniculata* na medicina popular para o tratamento de inflamações das vias urinárias e contribuiu para o aumento do conhecimento químico e farmacológico desta espécie. Assim, estes dados salientam a necessidade de maior investigação das atividades biológicas e dos metabólitos ativos nesta espécie.

3.4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos evidenciam que:

- Os extratos Ehex e Eacet das raízes de *Boerhavia paniculata* não apresentaram atividade antimicrobiana contra as candidas testadas;
- O extrato Ehex das raízes de *B. paniculata* apresentou significativa atividade antiinflamatória;
- O perfil metabólico do extrato hexânico das raízes de *B. paniculata* apresentou 33 metabólitos, destacando-se fitosteróis em maior proporção (64,44%), seguido de ácidos graxos (34,48%);
- Dos fitosteróis identificados no extrato hexânico das raízes de *B. paniculata* ressalta-se como majoritários o β -sistosterol e o Estigmasterol.

4 INDUÇÃO E PERFIL QUÍMICO DA CULTURA DE CALOS DE *Boerhavia paniculata*

RESUMO

A biotecnologia vegetal pode ser utilizada como ferramenta para diminuir as limitações na produção dos metabólitos de plantas. A espécie *Boerhavia paniculata* é uma planta medicinal da família Nyctaginaceae popularmente utilizada principalmente na inflamação das vias urinárias e uterinas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolo de indução de calos e estudar o perfil químico da cultura de calos de *Boerhavia paniculata*. Para isto, sementes sem tegumento, após assepsia, foram inoculadas em meio contendo metade das concentrações de macro, micronutrientes e vitaminas do MS ($\frac{1}{2}$ MS) com diferentes concentrações de glicose (0,0; 1,5 e 3%; m/v), diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0,0; 2,265 e 4,53 μ M; m/v), suplementado com água de coco (10%; v/v) e 0,8% de ágar (m/v). Os explantes foram mantidos com fotoperíodo de 16h de luz, 30 ± 2 °C e intensidade de luz de 27 μ mol m⁻² s⁻¹ por 4 semanas. Para aumento da biomassa, os calos friáveis obtidos foram subcultivados mensalmente no meio de indução de calos que obteve melhores resultados sob as mesmas condições. A extração de metabólitos da biomassa de calos foi realizada em coluna de vidro, com sílica 60 mesh e solventes hexano, acetato de etila e solução hidroalcolica (8:2; v/v). O perfil químico do extrato hexânico foi analisado por meio de lipidômica em CG/EM. O melhor resultado para formação de calo friável e crescimento de biomassa foi obtido no tratamento contendo $\frac{1}{2}$ MS, 2,265 μ M de 2,4-D, glicose (1,5%) e água de coco (10%). Os calos apresentaram-se com coloração bege, excelente friabilidade e crescimento. O extrato hexânico evidenciou a presença de 28 compostos, tendo em maiores concentrações ácidos graxos e hexadecanoato de metila, e em menor concentração os fitosteróis. O perfil químico desta fração foi semelhante ao observado nas raízes da planta silvestre. Assim, este trabalho contribui para o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas e de lipidômica em *B. paniculata*.

Palavras-chave: *Boerhavia paniculata*, cultura de calos, lipidômica, fitosteróis, metabólitos secundários

ABSTRACT

The plant biotechnology can be used as a tool to reduce the limitations in the production of the metabolites of plants. The specie *Boerhavia paniculata* is a medicinal plant of the family Nyctaginaceae popularly used primarily in inflammation of the urinary and the uterus tract. The objective of this study was to develop protocol for callus induction and study the chemical profile of calli cultures from *Boerhavia paniculata*. For this, seeds without tegument, after asepsis, were inoculated in medium containing half strength of MS macro, micronutrients and vitamins ($\frac{1}{2}$ MS) with different concentrations of the glucose (0.0, 1.5 and 3%; w/v) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D 0.0, 2.265 and 4.53 μ M; w/v), supplemented with coconut water (10%, v/v) and agar (0.8%; w/v). The explants were maintained with a photoperiod of 16h, 30 ± 2 °C and light intensity of 27 μ mol m⁻² s⁻¹ for 4 weeks. To increase biomass, friable calluses were subcultured monthly on callus induction medium which produced better results under the same conditions. The extraction of the metabolites of biomass callus was performed in a glass column, with silica 60 mesh and solvents hexane, ethyl acetate and hydroalcoholic solution (8:2; v/v). The chemical profile of extract was analyzed using lipidomic in GC/MS. The best result for friable callus formation and growth of biomass was obtained in the treatment containing $\frac{1}{2}$ MS, 2.265 μ M of 2,4-D, glucose (1.5%) and coconut water (10%). Calli presented with light brown color, excellent growth and friable. The hexane extract revealed the presence of 28 compounds, in higher concentrations of fatty acids and methyl hexadecanoate and in lower concentrations phytosterols. The chemical profile of this fraction was similar to that of the wild plant roots. Therefore, this work contributes to the development of biotechnology and lipidomic in *B. paniculata*.

Keywords: *Boerhavia paniculata*, callus culture, lipidomic, phytosterols, secondary metabolites.

4.1 INTRODUÇÃO

Muitas plantas produzem metabólitos com atividades biológicas de grande interesse. Alguns destes metabólitos apresentam alto valor comercial, sendo fontes naturais para usos como fármacos, agroquímicos, condimentos, fragrâncias, aditivos alimentares e pesticidas (BALANDRIN; KLOCKE, 1988).

Nos últimos anos, a medicina tradicional tem se tornado um assunto de importância global em função dos recursos naturais serem amplamente explorados e muitas espécies de plantas medicinais terem sido avaliadas cientificamente quanto as suas possíveis aplicações médicas, porém os habitats naturais das plantas medicinais estão desaparecendo rapidamente. Além disso, os princípios ativos encontrados nestas espécies geralmente são encontrados em baixas concentrações (MULABAGAL; TSAY, 2004). Para solucionar este problema diversas técnicas têm sido desenvolvidas (VAN RUTH et al., 2003; JIAO et al., 2002) e uma alternativa é a produção destes metabólitos *in vitro*, buscando-se produzir concentrações suficientes dos princípios ativos. Neste aspecto, a cultura de tecidos vegetais visa à produção e a investigação de metabólitos secundários em condições controladas, favorece a obtenção de maiores quantidades de substâncias ativas e permite induzir e acumular os metabólitos de interesse em curto espaço de tempo, sem a interferência do meio ambiente (clima, solo, infestações e sazonalidade), sem eliminar a planta matriz e permitindo a seleção de cultivares com alta produção de metabólitos de interesse (DICOSMO; LOURENÇO, 2003; MISAWA, 1995; MULABAGAL; TSAY, 2004; RAMANCHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

A espécie *Boerhavia paniculata* Rich. é uma planta medicinal utilizada popularmente em vários países nos tratamentos de febres biliares, icterícia, congestão do fígado e do baço e principalmente na inflamação das vias urinárias e uterinas (IQBAL et al., 2011). Deste modo, diversos estudos vêm sendo realizados em plantas do gênero *Boerhavia*, os quais detectaram propriedades farmacológicas como: atividades antimicrobianas, antiinflamatória, antifibrinolítica, anticonvulsiva entre outros (MÉNDEZ et al., 2001). Apesar dos estudos relatados, a química dos compostos bioativos de *Boerhavia* e de suas propriedades farmacológicas ainda é pouco estudada, e a maioria das pesquisas tem se concentrado em seus extratos. Neste aspecto, ressalta-se a importância de intensificar a aplicação de técnicas da metabolômica para se investigar os metabólitos presentes nestes extratos.

Em Nyctaginaceae poucos trabalhos na área de biotecnologia são encontrados na literatura, sendo ainda escassos os estudos sobre o cultivo *in vitro* e estudo do comportamento dos metabólitos *in vitro*, principalmente do gênero *Boerhavia*. Santos et al. (2007) relataram a produção de um rotenóide a partir de calos e de raízes de plantas silvestres de *B. coccinea*. Micropropagação a partir de ápices caulinares e segmentos nodais em *B. diffusa* foi relatada por Roy (2008). Sudarshana et al. (2008) a partir de calos de *B. diffusa* induziram o florescimento *in vitro*, a embriogênese somática e a regeneração de plantas. Protocolos de propagação *in vitro* de plantas e transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens* foi desenvolvido para a espécie *Mirabilis jalapa* (ZACCAI et al., 2007). Rownaq e Hossain (2010) desenvolveram um protocolo de regeneração *in vitro* a partir de segmentos nodais de *B. repens*.

Dentro deste panorama, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de indução de calos *in vitro* em *Boerhavia paniculata* Rich. e analisar o perfil químico do extrato hexânico dos calos por meio de lipidômica.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material Vegetal

Plantas de *Boerhavia paniculata* foram coletadas no Horto de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Oriental. As plantas coletadas foram identificadas por Jair Freitas e supervisionado por Silvane Tavares Rodrigues, e a exsicata registrada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental como *Boerhavia paniculata* Rich. (Reg. IAN nº 184191). As plantas foram levadas para o laboratório e as sementes foram selecionadas para uso como explante.

4.2.2 Preparação do Explante para Uso como Inóculo

As sementes de *Boerhavia paniculata* foram inicialmente lavadas com duas gotas de Tween 80, depois lavadas em água corrente, imersas em solução de 5% de dodecilsulfonato de sódio por 2 minutos, sob agitação, e lavadas com água destilada estéril. As sementes foram imersas em solução de álcool 70% por 1 minuto, em

seguida em solução de hipoclorito de sódio 5% contendo duas gotas de Tween 80 por 20 minutos sob agitação e lavadas três vezes em água destilada estéril em condições assépticas sob câmara de fluxo laminar. As sementes foram deixadas em solução de tetraciclina (50 mgL^{-1}) sob agitação (50-100 rpm) por 4 horas. Após este procedimento, o tegumento das sementes foi retirado, e as mesmas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, e em solução de tetraciclina (50 mgL^{-1}), secos em papel filtro estéril (adaptado de SAMBROOK et al., 1989; BRASILEIRO; LACORTE, 1998) e utilizadas para a indução de calos friáveis.

4.2.3 Indução de Calos Friáveis a partir de Sementes sem Tegumento

Após a assepsia, as sementes sem os tegumentos foram inoculadas em frascos com 30 mL de meio de cultura contendo metade da concentração de macro, micronutrientes e vitaminas do meio básico MS ($\frac{1}{2}$ MS; MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0,0; 2,265 e $4,53 \mu\text{M}$), diferentes concentrações de glicose (0,0; 1,5 e 3%; m/v), suplementado com água de coco (10%; v/v) e solidificado com ágar (0,8%; m/v; Himedia Co., Mumbai, Índia). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 15 min. Os explantes foram mantidos em câmara de germinação com fotoperíodo de 16h de luz, temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade de luz de $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 4 semanas.

4.2.4 Produção de Biomassa de Calos

Para aumentar a biomassa, os calos friáveis obtidos foram subcultivados mensalmente no meio $\frac{1}{2}$ MS, acrescido de glicose (1,5%; m/v), água de coco (10%; v/v), $2,265 \mu\text{M}$ de 2,4-D e solidificado com ágar (0,8%; m/v). Os calos foram mantidos em câmara de germinação com fotoperíodo de 16h, temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade de luz de $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.2.5 Curva de Progressão da Biomassa de Calos

A curva de crescimento dos calos friáveis de *B. paniculata* foi determinada por amostragem de sacrifício. Inicialmente, as massas dos calos mensuradas foram

inoculadas em frascos contendo o meio de cultura ½ MS para aumento de biomassa, e acrescido de glicose (1,5%; m/v), água de coco (10%; v/v), 2,26 µM de 2,4-D e solidificado com ágar (0,8%; m/v). Os calos foram subcultivados durante 30 dias nas mesmas condições observadas para o aumento de biomassa. A cada 5 dias, frascos de cultura de calos foram retirados e as massas dos calos frescos (MF) foram medidas. Posteriormente, os calos coletados foram secos em estufa a 60°C por 48h e sua massa seca (MS) foi determinada. Foi também determinado o índice de crescimento (IC) que é o fator que descreve quantas vezes a biomassa cresceu em relação ao inóculo inicial, sendo um fator sem unidade representado pela equação representada abaixo, onde IC é igual ao índice de crescimento, M_i é igual à massa inicial do inóculo e M_f é a massa final obtida.

$$IC = \frac{M_i}{M_f} \quad (1)$$

4.2.6 Obtenção de Concentrados Metabólicos dos Calos

A extração dos metabólitos da biomassa de calos foi realizada no laboratório de Produtos Naturais (PN) da Química/UFGA. O estudo da indução de metabólitos foi avaliado na biomassa de calos após esgotamento da fonte de carbono no meio. Para a extração dos metabólitos e obtenção das frações, os calos foram coletados, secos em estufa à temperatura de 60°C por 48h. Logo após, os calos foram trituradas até obter um pó. A extração foi realizada em coluna de vidro utilizando fase estacionária sílica 60 mesh e os seguintes solvente em ordem de polaridade crescente: hexano, acetato de etila e solução hidroalcolica a (8:2; v/v). Com tempo de residência de 24h, cada solvente foi coletado em frasco de vidro e as frações concentradas em capela de exaustão para evaporar todo solvente. Os extratos secos foram armazenados a -4°C e utilizados para as análises do perfil químico.

4.2.7 Avaliação do Perfil Metabólico dos Extratos Hexânicos dos Calos

As análises do perfil químico do extrato hexânico dos calos de *B. paniculata* foram realizadas por meio de lipidômica em CG/EM.

O extrato hexânico foi analisado por técnica de metabolômica após o processo de sililação descrito a seguir: uma alíquota de 500 mg do extrato hexânico foi dissolvido em 500 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄; 2%) em microtubo 1,5 µL e aquecido a 90 °C por 2h. Após resfriamento a solução foi extraída com 500 µL de n-hexano por 3 vezes. As frações recombinadas foram lavadas com bicarbonato de sódio (NaHCO₃; 4%) em água. E passado através de uma pipeta Pasteur contendo 100 mg de sulfato de sódio anidro (NaSO₄). Após evaporação do solvente, em "SpeedVac", a mistura foi sililada em 50 µL de piridina + 50 µL de BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida). Em seguida foi adicionado 300 µL de clorofórmio e 1 µL da mistura foi analisada em CG/EM AGILENT 5975C GC/MS System.

O sistema foi operado nas seguintes condições: o forno foi mantido com uma programação de temperatura que iniciou com 100 °C por 2 min, com rampa de 15 °C/min, elevando-se até 180 °C e permanecendo por 1min, com segunda rampa de 5 °C/min, elevando-se até 300 °C e permanecendo nesta temperatura por 10 min. O modo de injeção foi 1 µL em split (1:5). A velocidade linear do gás de arraste foi de 1,2 mL/min, utilizando-se Hélio como gás de arraste. A coluna utilizada foi HP-5mS 5% fenil-metil-silox com 30 m x 25 µm de DI x 0,25 µm de espessura de filme. O injetor e a linha de transferência foram mantidos em 250 °C. O Espectrômetro de massas operou a 70 eV, com 1 scan/s. Os dados obtidos foram analisados em bibliotecas padronizadas encontrada na base de dados "The Golm Metabolome Data Base".

4.2.8 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os tratamentos de indução de calos foram avaliados ao final de 30 dias por amostragem de sacrifício. O experimento de indução de calos foi realizado com delineamento inteiramente casualizado com desenho fatorial de 3x3 resultando em nove tratamentos com 10 repetições. Para análise estatística foi utilizado o programa MINITAB 14, utilizando comparação de médias pelo teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. A avaliação foi realizada através da taxa de indução de calos, taxa de indução de calos friáveis e a média da massa fresca em mg.

A porcentagem de indução de calos foi obtida através da fórmula abaixo, onde: TxIC é igual à taxa de Indução de calos (%), EC é igual ao número de explantes com calos e TE é igual ao total de explantes.

$$TxIC = \frac{EC}{TE} \times 100 \quad (2)$$

Já a porcentagem de calos friáveis foi obtida através da fórmula abaixo, onde: TxCF é igual à taxa de calos friáveis (%), EF é igual ao número de explantes com calos friáveis e EC é igual ao total de explantes com calos.

$$TxCF = \frac{EF}{EC} \times 100 \quad (3)$$

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Preparação do Explante

A preparação do explante para uso como inóculo está relacionada com uma assepsia adequada que minimize as contaminações *in vitro* do material utilizado. Neste trabalho houve uma dificuldade na adequação de uma metodologia para assepsia das sementes de *B. paniculata* devido às contaminações, principalmente bacterianas.

Em experimentos preliminares, a assepsia das sementes foi inicialmente realizada com lavagem com Tween 80, seguido de lavagem em água corrente. Depois em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70% por 1 min, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio, as quais foram avaliadas duas concentrações de cloro ativo desta solução (2% e 5%) e três tempos diferentes de exposição (10, 15 e 20 minutos), seguido de lavagens em água destilada estéril. Porém, estas metodologias apresentaram uma elevada porcentagem (80%) de contaminação fúngica e principalmente bacteriana.

Assim, posteriormente, foi adotada a metodologia de assepsia com o uso de antibiótico. Esta metodologia não apresentou contaminação nas sementes de *B. paniculata* introduzidas *in vitro*, por esta razão foi adotada neste trabalho. Na literatura, várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a

desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como hipoclorito de sódio e cálcio. O uso de detergentes, como o Tween, adicionados às soluções a base de cloro melhoram o contato destas com os tecidos. O emprego de fungicidas e antibióticos durante a descontaminação ou incorporados ao meio nutritivo também podem ser utilizados (CONSTABEL, 1984; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

4.3.2 Indução de Calos Friáveis a partir de Sementes sem Tegumento

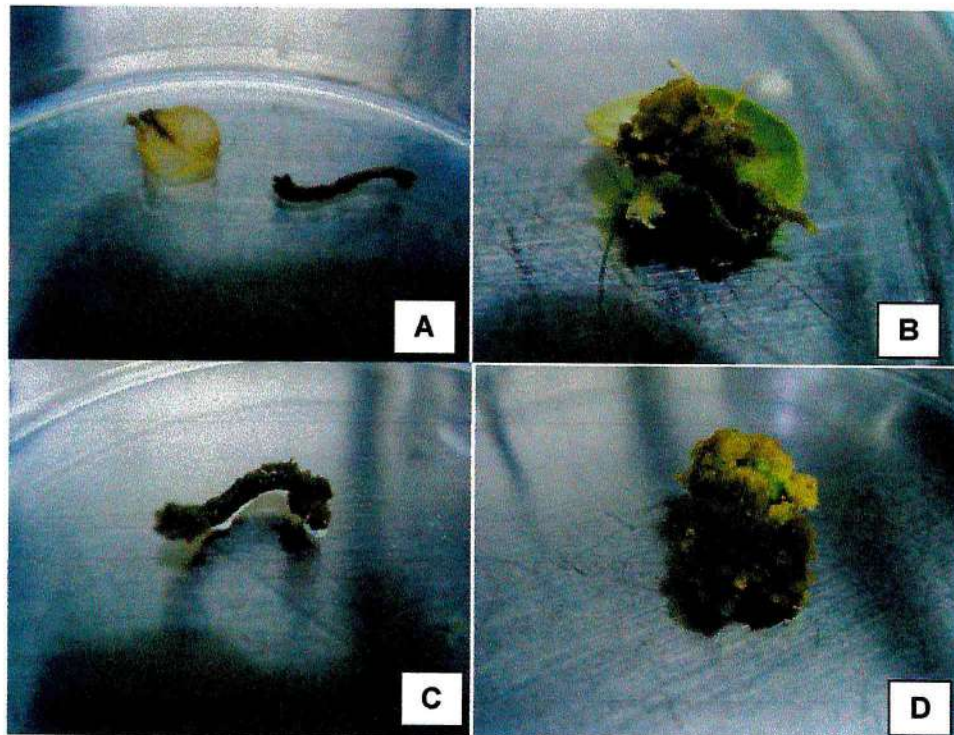
A espécie *B. paniculata*, investigada neste trabalho, apesar de ser utilizada popularmente como medicinal, é considerada como daninha em plantações agrícolas e hortícolas. Ao mesmo tempo, é uma espécie sazonal ocorrendo com maior frequência apenas no período de julho a dezembro, o que dificulta sua coleta. Neste sentido, a utilização da biotecnologia, principalmente, as técnicas de cultura de tecidos de plantas, constitui uma alternativa importante, já que possui como vantagens a produção contínua, regular e não dependente da sazonalidade da espécie vegetal e de seus metabólitos ativos. Além disso, nesta espécie poucos trabalhos na área biotecnológica são encontrados na literatura.

No presente estudo foi desenvolvido um protocolo de indução de calos e análise do perfil químico dos mesmos. O desenvolvimento de um protocolo eficiente de indução de calos friáveis é bastante laborioso e implica na adequação de muitos fatores como meio de cultura a ser utilizado, tipo de explante e condições de manutenção das culturas *in vitro*. Entretanto, neste trabalho além do desenvolvimento de um protocolo eficiente de indução de calos, era imprescindível a obtenção de grande quantidade de biomassa para as análises seguintes.

Em experimentos preliminares de indução de calos foram avaliados vários fatores. Inicialmente verificou-se a influência do tipo de meio de cultura MS e ½ MS, diferentes concentrações e reguladores de crescimento BAP (benzilaminopurina) e 2,4-D, tipo de fonte de carbono (sacarose e glicose), e influência de água de coco no meio de cultura. Como explante foram avaliados sementes sem tegumento, segmentos de hipocótilos e folhas provenientes de plântulas germinadas *in vitro*. Como condição de cultura foram avaliados diferentes temperaturas (25 °C - 35 °C), ausência e presença de luminosidade, e fotoperíodo. Entretanto a maioria dos resultados obtidos nestes experimentos preliminares não foi satisfatória, com

formação de calos pequenos, sem friabilidade (calos duros e nodulares), e que se oxidavam rapidamente (Figura 9).

Figura 9 – Testes preliminares de indução de calos em *Boerhavia paniculata* Rich. após 30 dias de subcultivo. **(A)** Segmento de folha e hipocótilo em meio MS com sacarose (3%) sem regulador de crescimento mantidos no claro a 32°C; **(B)** Folha em meio MS sacarose (3%) e 1,0 mgL⁻¹ de 2,4-D mantidos no claro a 32°C; **(C)** Segmento de hipocótilo em meio MS sacarose (3%) e 1,0 mgL⁻¹ de 2,4-D mantidos no claro a 32°C; **(D)** Calo nodular induzido em segmento de hipocótilo em meio MS com sacarose (3%), 1,0 mgL⁻¹ de BAP, 1,0 mgL⁻¹ de 2,4-D mantido no escuro a 26°C.



Nos testes preliminares para indução de calos friáveis realizados nesta espécie, os melhores resultados foram obtidos utilizando sementes sem tegumento como explante, meio ½ MS, glicose como fonte de carbono, água de coco no meio de cultura, fotoperíodo 16 h de luz e temperatura de 30±2°C como condição de cultura mais adequados.

Assim neste trabalho, foram realizados tratamentos com diferentes concentrações de 2,4-D e glicose em meio $\frac{1}{2}$ MS para adequação do meio de cultura de indução de calos. A Tabela 3 contém a análise da taxa de indução de calos (%), a taxa de calos friáveis (%) e a massa fresca dos calos obtidos (mg) a partir de sementes sem o tegumento de *B. paniculata* em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com de água de coco (10%; v/v) e diferentes concentrações de 2,4-D e glicose após 30 dias.

Tabela 3 - Indução de calos *in vitro* de *Boerhavia paniculata* Rich. em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 10% de água de coco (v/v) e diferentes concentrações de 2,4-D e glicose após 30 dias em cultura.

TRATAMENTOS	TxIC (%) (Média+ S.E.)	TxCF (%) (Média+ S.E.)	Massa fresco (mg) (Média+ S.E.)
1 $\frac{1}{2}$ MS	95,0 $\pm$ 15,8 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	150,7 $\pm$ 97,2 bc
2 $\frac{1}{2}$ MS + 2.265 μ M 2,4-D	65,0 $\pm$ 41,2 ab	80,0 $\pm$ 42,2 a	309,7 $\pm$ 69,2 b
3 $\frac{1}{2}$ MS + 4,53 μ M 2,4-D	89,0 $\pm$ 16,5 ab	88,9 $\pm$ 33,3 a	161,8 $\pm$ 82,5 bc
4 $\frac{1}{2}$ MS + 1,5 % glicose	55,0 $\pm$ 36,9 b	80,0 $\pm$ 42,2 a	198,7 $\pm$ 66,6 bc
5 $\frac{1}{2}$ MS + 1,5 % glicose + 2,265 μ M 2,4-D	63,0 $\pm$ 28,6 ab	100,0 $\pm$ 0,0 a	545,0 $\pm$ 13,7 a
6 $\frac{1}{2}$ MS + 1,5 % glicose+ 4,53 μ M 2,4-D	80,8 $\pm$ 35,0 ab	87,5 $\pm$ 35,4 a	290,7 $\pm$ 155,8 b
7 $\frac{1}{2}$ MS + 3,0 % glicose	63,0 $\pm$ 41,5 ab	33,3 $\pm$ 50,0 b	79,6 $\pm$ 4,3 c
8 $\frac{1}{2}$ MS + 3,0 % glicose+ 2,265 μ M 2,4-D	95,0 $\pm$ 15,8 a	54,5 $\pm$ 47,8 ab	132,4 $\pm$ 53,8 c
9 $\frac{1}{2}$ MS + 3,0 % glicose+ 4,53 μ M 2,4-D	84,1 $\pm$ 28,0 ab	63,6 $\pm$ 45,2 ab	115,6 $\pm$ 53,9 c
P-value	0,019*	0,003**	0,00**

Notas: Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey;

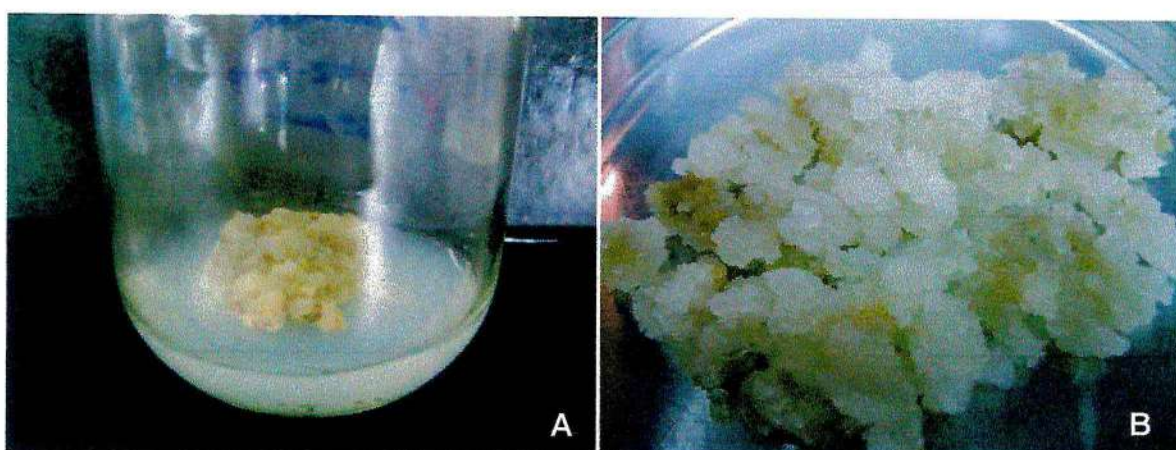
TxIC=Taxa de Indução de calos; TxCF= Taxa de calos friáveis; Massa fresco dos calos em mg; S.E. = Desvio Padrão

* 0,01<P<0,05 diferenças são significativas a 5%; ** P< 0,01 diferenças significativas a 1% e a 5%;

A indução dos calos ocorreu após uma semana de cultivo e todos os tratamentos induziram a desdiferenciação de calos que se apresentaram com coloração variando de bege a marrom claro (Figura 10). O melhor resultado para a indução de calos friáveis foi obtido no tratamento 5 ($\frac{1}{2}$ MS + 10% de água de coco + 1,5% de glicose e 2,265 μ M de 2,4-D) que apresentou 100% de calos friáveis (TxCF), maior crescimento dos calos representado pela massa fresca de 545 mg e menor desvio padrão da massa, indicando que houve pouca variabilidade dos dados em relação à média. Nestes resultados, observa-se que os calos formados

apresentaram alto grau de dediferenciação e friabilidade, comprovando que o explante, o meio e as condições de cultivo utilizadas foram adequados para a indução de calos friáveis.

Figura 10 – Calos de *Boerhavia paniculata* Rich. a partir de sementes sem o tegumento em ½ MS suplementado com água de coco (10%; v/v) e diferentes concentrações de 2,4-D e glicose. (A) Indução de calos em tratamento 5 (½ MS + glicose 1,5% + 2,265µM 2,4-D) com 30 dias. (B) Biomassa de calos friáveis obtidos do tratamento 5 de indução de calos após 60 dias.



Qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante *in vitro*, devido à totipotência das células vegetais. Porém, em geral são utilizados tecidos jovens ou imaturos como hipocótilos, endosperma de sementes, folhas jovens, embriões ou inflorescências imaturas que possuem maior proporção de tecido meristemático e maior capacidade de expressar a totipotência (CONSTABEL, 1984; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LINDSEY; JONES, 1992). Wang et al. (2007) relataram que plântulas e sementes tiveram maiores taxas de indução de calos quando comparados com folhas jovens e segmentos de caules de *Pogonatherum paniceum*. Müller (2010) também relata que a indução de calos em *B. paniculata* obteve melhores resultados a partir de sementes sem o tegumento.

A formação de calos a partir de um explante é acompanhada de várias mudanças estruturais, e no metabolismo das células que resulta na dediferenciação do tecido. A morfologia do calo pode ser descrita como friável (células agregadas de forma frouxa) ou compacta (células estão agregadas mais densamente) (LINDSEY;

JONES, 1992). Os calos friáveis possuem diferentes tipos celulares com características estruturais e histoquímicas diferenciadas, caracterizadas principalmente pela presença de células em rápido crescimento, pequenas, isodiamétricas e com alta frequência de divisões celulares (SOUZA et al., 2011).

O meio MS modificado apresentou bons resultados para diversas espécies, não sendo diferente para *Boerhavia*. As condições de cultivo, relacionadas à luminosidade e temperatura também são variáveis e dependem da espécie vegetal. O cultivo *in vitro* de *B. paniculata* demonstrou ser mais eficiente em altas temperaturas e fotoperíodo de 16 h de luz. Os resultados para a taxa de indução apresentaram diferenças significativas em nível de 5% no teste de Tukey, e a taxa de calos friáveis e a massa dos calos avaliados apresentaram diferenças significativas a 1% e a 5% pelo teste de Tukey.

No tratamento 1 ($\frac{1}{2}$ MS+ 10% de água de coco) sem a presença de regulador de crescimento e de glicose observou-se uma maior taxa de indução (95%) e alta taxa de friabilidade (100%), porém os calos obtidos tinham tamanho médio (150,7 mg). Estes resultados diferiram dos experimentos realizados por Müller (2010) com sementes de *B. paniculata* sem tegumento no mesmo meio sem adição de água de coco que não apresentaram nenhuma indução de calos, indicando que a presença de água de coco no meio de cultura favoreceu a indução e principalmente o crescimento dos calos *in vitro*.

A água de coco é o aditivo mais utilizado em cultura de tecidos vegetais, para estimular o crescimento e desenvolvimento de culturas *in vitro* (CALDAS et al. 1998; GE et al., 2005). Apresenta uma mistura complexa de substâncias minerais e orgânicas como glicose, frutose, aminoácidos essenciais, cinetina e ribosídeos de cinetina e outros compostos que podem agir individualmente ou sinergicamente (CALDAS et al., 1998; CAMPBELL-FALCK et al., 2000; GE et al., 2005, 2004). Peixe et al. (2007) conseguiram obter sucesso na micropropagação de azeitonas utilizando água de coco e BAP no meio de cultura. Roy (2008) também relatou que a adição de água de coco no meio de cultura aumentou o número de gemas tanto em explantes de meristemas como em segmentos nodais de *Boerhavia diffusa*. Assim, a presença de cinetina e outras citocininas na água de coco, como fitohormônios importantes, são suplementos importantes de crescimento e desenvolvimento em cultivo de células e tecidos vegetais.

Analisando o efeito isolado da glicose nos tratamentos, sem a presença de 2,4-D (tratamentos 4 e 7), observou-se que a indução foi maior no meio sem glicose (95%) e que esta diminuiu à medida que se aumentou a concentração de glicose no meio de cultura (55% e 63%), o mesmo ocorreu como a friabilidade dos calos.

No tratamento 4 ($\frac{1}{2}$ MS + 10% de água e coco + 1,5% de glicose) pode-se observar a menor taxa de indução de todos os tratamentos, porém os calos induzidos tiveram alta friabilidade e crescimento. O tratamento 7 ($\frac{1}{2}$ MS + 10% de água de coco + 3% de glicose) apresentou uma menor taxa de friabilidade (33%) e menor crescimento dos calos (79,6 mg) comparado a todos os tratamentos. Provavelmente, a ausência de reguladores de crescimento e a maior concentração de glicose tiveram influência nestes resultados. Os dados sugerem que a presença deste carboidrato não teve um efeito positivo no meio de cultura associada com água de coco. E que o meio sem o carboidrato, somente com a água de coco teve maior eficiência para indução de calos. Diversos artigos relatam a influência da fonte de carbono na morfogênese *in vitro* de diferentes espécies de plantas. A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, suportando altas taxas de crescimento na maioria das espécies. Entretanto, os carboidratos além da importância nutricional, influenciam o potencial osmótico do meio de cultura que também tem forte influência na morfogênese *in vitro* (FUENTES et al., 2000; PETERSEN et al., 1999).

De acordo com Paiva Neto e Otoni (2003), a glicose na concentração de 1,5% possui menor potencial osmótico de -0,205 MPa, do que a glicose e sacarose na concentração de 3%, que possuem potencial osmótico respectivamente de -0,410MPa e -0,237MPa. O aumento do potencial osmótico (concentração de solutos) nas células induz a uma redução do potencial hídrico das células *in vitro* promovendo um efeito tóxico nestas. Estas diferenças no potencial osmótico podem explicar a melhor indução de calos de *B. paniculata* no meio de cultura contendo 1,5% de glicose (menor potencial osmótico).

O tratamento 6, com uma concentração intermediária de glicose (1,5%), embora tenha apresentado alta friabilidade (87,5%) e bom acréscimo de crescimento de calos representado pelo massa fresca (290,7 mg), apresentou um desvio padrão muito alto influenciado provavelmente por fatores como luminosidade e manipulação desuniforme.

Em concentrações mais altas de glicose (tratamentos 8 e 9) observou-se um suave aumento da taxa de indução de calos em relação às doses intermediárias (1,5%). Porém, as taxas de friabilidade e a massa foram menores que os demais tratamentos com concentrações de 1,5% e 0% de glicose. Estes resultados indicam que a presença de altas concentrações de carboidrato no meio interferiu na friabilidade e crescimento dos calos.

A indução de calos e produção de biomassa é uma etapa difícil. Gopi e Vatsala (2006) conseguiram melhores resultados de indução de calos em segmentos nodais e folhas de *Gymnema sylvestris* em meio MS com $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de 2,4-D ($2,265 \text{ } \mu\text{M}$). Antognoni et al. (2007) induziram calos a partir de folhas de *Passiflora spp.* Em meio basal MS suplementado com cinetina e 2,4-D. Há poucos relatos de cultivo *in vitro*, principalmente calogênese no gênero *Boerhavia*. Santos et al. (2007) induziram calos a partir de folhas e caules de *B. coccínea* em meio MS suplementado com diferentes reguladores de crescimento, entre eles o 2,4-D. Sudarshana et al. (2008) obtiveram melhores resultados na calogênese de explantes de folha de *B. diffusa* em meio MS suplementado com 2,4-D. Rownaq e Hossain (2010) induziram calos de *Boerhavia repens* a partir de segmentos nodais em meio MS contendo $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de NAA e $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP.

A espécie *B. paniculata* parece ter sensibilidade a meios de cultura com potencial osmótico maiores, o que é evidenciado pela maior indução de calos nos tratamentos com $\frac{1}{2}$ MS e de água de coco (10%) sem glicose. Os sais inorgânicos do meio básico MS sozinhos possuem alto potencial osmótico ($-0,212 \text{ MPa}$), e associado aos açúcares devem aumentar ainda mais o potencial no meio de cultura (CAMPBELL-FALCK, 2000; GEORGE, 1993). Isto pode explicar porque nos tratamentos onde há o acréscimo de glicose ocorre uma redução na indução de calos.

4.3.3 Obtenção da Biomassa de Calos

O meio $\frac{1}{2}$ MS com 1,5 % de glicose, $2,265 \text{ } \mu\text{M}$ de 2,4-D acrescido de 10% de água de coco favoreceu o aumento da biomassa de calos *in vitro* de *B. paniculata* proporcionado à manutenção da friabilidade e um intenso crescimento dos calos que continuaram a apresentar a coloração bege claro a marrom (Figura 11).

O acúmulo de metabólitos foi induzido por meio da escassez de carbono após 30 dias de subcultivo. Baseado na observação da coloração, os calos subcultivados nesta condição tornaram-se escurecidos e houve diminuição do crescimento (massa de calos) evidenciando que estas células diminuíram a atividade de divisão e o crescimento celular e passaram a produzir metabólitos secundários. Desta forma, os metabólitos foram produzidos e acumulados em função do estresse provocado pela falta (ou escassez) dos nutrientes no meio de cultivo. Em *B. paniculata*, a utilização do mesmo meio de cultura, tipo e concentração de regulador, porém sem a adição de água de coco obteve como resultados pequeno crescimento de calos e um escurecimento rápido dos mesmos (MÜLLER, 2010).

O tipo e a concentração de reguladores no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* (HARTMANN et al., 2002). O regulador de crescimento 2,4-D é uma auxina que apresenta a função de acelerar a divisão celular, levando a um rápido crescimento do calo (SANTOS et al., 2007). A ação positiva das auxinas, principalmente 2,4-D, na indução de calos em explantes de diferentes espécies foi observada por diversos autores (THOMAS; MASEENA, 2006; GOPI; VATSALA, 2006; ANTOGNONI et al., 2007; SUDARSHANA et al., 2008).

Figura 11 – Calos de *Boerhavia paniculata* Rich. em meio de aumento de biomassa contendo ½ MS com glicose (1,5%), 2,265 µM de 2,4-D e água de coco (10%) com 20 dias de subcultivo.



4.3.4 Curva de Progressão da Biomassa de Calos

Foi realizado um estudo da progressão da biomassa de calos de *B. paniculata* para verificar a influência do tempo no crescimento dos calos. Aproximadamente 1,5 g de calos friáveis crescendo ativamente foram inoculados em frascos com 30 mL de meio para manutenção de biomassa ($\frac{1}{2}$ MS com 1,5 % de glicose, 2,265 μ M de 2,4-D acrescido de 10% de água de coco) e analisados durante 30 dias.

Os resultados são apresentados na Figura 12. No início do cultivo, período de adaptação das células ao meio, os calos mantiveram um crescimento lento. A partir do 5º dia houve um crescimento acelerado da biomassa até o 25º dia. Em seguida, pôde ser observado um início da redução do crescimento da biomassa. O período máximo de crescimento da biomassa fresca foi observado ao 25º dia de cultivo com IC₂₅ de 6,8. Os calos mantiveram-se friáveis e com coloração bege claro durante os 30 dias, após este período, então começou o processo de escurecimento, resultado provavelmente do esgotamento da fonte de carboidratos e nutrientes no meio de cultura. Os calos apresentaram elevada quantidade de água que pode ser comprovada pela relação massa fresca/massa seca dos calos (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Gopi e Vatsala (2006) em experimentos realizados em cultura de calos de *Gymnema sylvestre*.

Figura 12 – Gráfico da curva de progressão do crescimento de calos de *Boerhavia paniculata* Rich. mensurada durante 30 dias em meio de aumento de biomassa ($\frac{1}{2}$ MS, glicose (1,5%; m/v), 2,265 μ M de 2,4-D e água de coco (10%; v/v)).

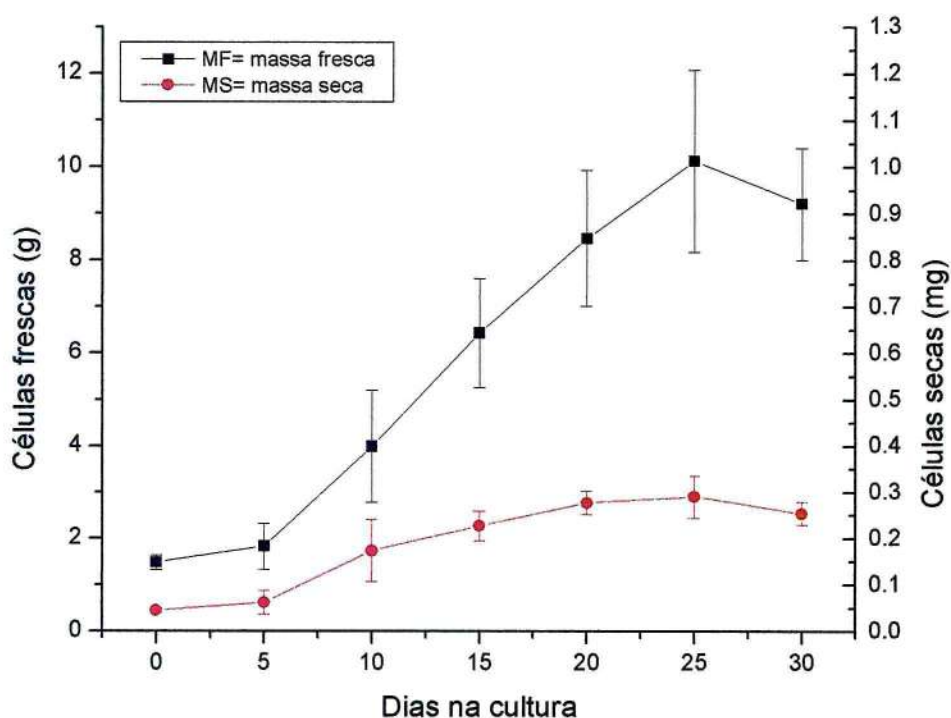


Tabela 4 - Crescimento da biomassa de calos monitorado durante 30 dias.

DIAS	MF	MS	IC	COR	DesvPad	CV(%)
0	1,48	0,04	0,00	Bege	0,16	10,5
5	1,83	0,06	1,24	Bege	0,41	27,0
10	3,99	0,17	2,70	Bege	1,21	30,3
15	6,44	0,23	4,35	Bege	1,18	18,3
20	8,46	0,28	5,72	Bege	1,48	17,5
25	10,13	0,29	6,84	Bege	1,95	19,2
30	9,34	0,25	6,31	Bege	1,38	14,7
Média Geral	-	-	3,88		1,12	19,6

Nota: MF= massa fresca em mg; MS= Massa Seca em mg; IC = índice de crescimento relacionado à MS; CV= Coeficiente de Variação relacionado à MS; DesvPad = Desvio Padrão relacionado à MS; COR = coloração apresentada pelos calos cultivadas *in vitro*;

4.3.5 Perfil Metabólico do Extrato Hexânico dos Calos

O perfil lipídico do extrato hexânico dos calos após esgotamento de carbono revelou a presença de 28 compostos, tendo como substâncias majoritárias os ácidos graxos (52,2%) e hexadecanoato de metila (47,4%).

O éster hexadecanoato de metila é relatado na literatura como uma substância de potencial alelopático, considerado inibidor da germinação e do crescimento de plântulas em vegetais superiores (MARTINS et al., 2010; OLIVA, 2006; PASSOS et al., 2010). Camara et al. (2002) identificaram por meio de CG/EM a presença do éster hexadecanoato de metila e ácidos graxos em cultura de calos e no meio de cultura de *C. paralicola* x *C. weddelliana*.

Os ácidos graxos em maior proporção no extrato foram: ácido octadecanoico ou esteárico (26,3%), ácido eicosanoico ou araquídico (5,4%), ácido octadecenoico ou oleico (6,9%), ácido octadecadienoico ou linoleico (6,3%), ácido hexadecanoico ou palmitoleico (2,5%) e ácido docosanoico ou behênico (1,2%).

Os fitosteróis encontrados no extrato apresentaram-se em concentrações minoritárias, apresentando como principal substância o β -sistosterol (0,2%) e outros fitosteróis apenas como traços.

A Tabela 5 apresenta o perfil lipídico do extrato hexânico encontrado nos calos de *B. paniculata*.

Tabela 5- Lipidoma do extrato hexânico de calos de *Boerhavia paniculata* Rich. obtida por meio de lipidômica em CG/EM.

CLASSIFICAÇÃO	IR	%
ÁLCOOL GRAXO E OUTROS COMPOSTOS		
1. Glicerol	1279	Tr
2. Octadecanol	2159	Tr
3. 1-Hexadecanoilglicerol	2606	Tr
ÁCIDOS GRAXOS HIDROXILADOS OU ESTER		
4. Ácido 2-hidroxi-Tetracosanoico	2921	Tr
5. Hexadecanoato de metila		47,4
ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS		
6. Ácido Tetradecanoico (Mirístico)	1724	0,1
7. Ácido Pentadecanoico	1826	Tr
8. Ácido Hexadecanoico (Palmitico)	1925	0,1
9. Ácido Heptadecanoico	2028	0,3
10. Ácido Octadecanoico (Esteárico)	2130	26,3
11. Ácido Eicosanoico (Araquídico)	2331	5,4
12. Ácido Heneicosanoico	2631	Tr
13. Ácido Docosanoico (Behênico)	2532	1,2
14. Ácido Tricosanoico	2634	0,1
15. Ácido Tetracosanoico (Lignocérico)	2734	0,7
16. Ácido Pentacosanoico	2833	Tr
17. Ácido Hexacosanoico (Cerótico)	2936	Tr
ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS		
18. Ácido Hexadecenoico (Palmitoleico)	1905	2,5
19. Ácido Heptadecenoico		0,1
20. Ácido Octadecenoico (Oleico)	2105	6,9
21. Ácido Octadecenoico Iso	2105	1,1
22. Ácido Eicosenoico	2307	0,4
ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS		
23. Ácido Octadecadienoico (Linoleico)	2098	6,3
24. Ácido Octadecadienoico Iso	2098	0,6
ESTEROIS E DERIVADOS		
25. Estigmasterol	3307	Tr
26. Acetato de Sitosterol (uk)		Tr
27. Esterol (uk)	3379	Tr
28. β -Sitosterol	3371	0,2

Nota: (1) O ácido nonodecanoico foi utilizado como padrão interno. (2) IR = Índice de Retenção calculado. (3) Tr = traço (<0,05); UK= substância desconhecida.

Comparando o perfil lipídico do extrato hexânico dos calos *in vitro* com o perfil lipídico encontrado no extrato hexânico das raízes da planta silvestre de *B. paniculata* (Tabela 6) observa-se que das 28 substâncias identificadas no extrato hexânico dos calos de *B. paniculata*, 18 são encontradas tanto no extrato hexânico de calos quanto no extrato das raízes. Porém estas substâncias são encontradas em concentrações distintas.

Tabela 6 - Comparação dos compostos encontrados no lipidoma de raízes e calos de *Boerhavia paniculata* Rich. analisados por meio de lipidômica em CG/EM.

CLASSIFICAÇÃO	IR	%RAIZ	%CALOS
ÁLCOOL GRAXO			
1. Glicerol	1279	Tr	Tr
2. Octadecanol	2159	Tr	Tr
ÁCIDOS GRAXOS HIDROXILADOS			
3. Ácido 2-hidroxi-Tetracosanoico	2821	0,53	Tr
ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS			
4. Ácido Tetradecanoico (Mirístico)	1724	0,08	0,1
5. Ácido Pentadecanoico	1826	Tr	Tr
6. Ácido Hexadecanoico (Palmitico)	1925	7,87	0,1
7. Ácido Heptadecanoico	2028	0,11	0,3
8. Ácido Octadecanoico (Estearico)	2128	0,94	26,3
9. Ácido Eicosanoico (Araquídico)	2331	0,08	5,4
10. Ácido Heneicosanoico	2631	0,20	Tr
11. Ácido Docosanoico (Behênico)	2532	0,37	1,2
12. Ácido Tetracosanoico (Lignocérico)	2734	1,16	0,7
13. Ácido Pentacosanoico	2833	0,13	Tr
ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS			
14. Ácido 7-Hexadecenoico (Palmitoléico)	1905	0,05	2,5
15. Ácido Octadecenoico (Oleico)	2105	14,25	6,9
ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS			
16. Ácido Octadecadienoico (Linoleico)	2098	5,14	6,3
ESTEROIS			
17. Estigmasterol	3307	19,54	Tr
18. β -Sitosterol	3371	32,59	0,2

Nota: (1) O ácido nonodecanoico foi utilizado como padrão interno. (2) IR = Índice de Retenção calculado. (3) Tr = traço (<0,05).

Os ácidos graxos hexadecanoico (palmítico) e octadecenoico (oleico), e os fitosteróis (estigmasterol e β -sitosterol) estão em maiores concentrações nas raízes do que no extrato de calos. Contudo, observa-se que os ácidos graxos octadecanoico (esteárico) e eicosanoico (araquídico) estão em concentrações maiores nos calos. Além disso, foram identificados oito compostos presentes somente no extrato hexânico de calos. São eles: 1-hexadecanoilglicerol, o éster hexadecanoato de metila, os ácidos graxos tricosanoico, hexacosanoico (cerótico), heptadecenoico, eicosenoico, um acetato de sitosterol e um esterol.

Ressalta-se que o extrato hexânico das raízes de *B. paniculata* apresentou potencial de atividade antiinflamatória, sendo que o perfil químico deste extrato continha β -sitosterol, estigmasterol e ácido behênico e outros ácidos graxos. Porém, não foram isoladas e identificadas as substâncias responsáveis pela atividade antiinflamatória. De um modo geral, a presença do ácido behênico e do β -sitosterol pode ter grande influência nesta atividade. Observa-se que a cultura de calos também apresenta estas substâncias só que em menores concentrações. Este resultado é de extrema importância, pois comprova que os metabólitos produzidos pela planta no campo também podem ser produzidos *in vitro*. Entretanto, observa-se que os metabólitos ainda não estão sendo acumulados nos calos. Este resultado é esperado do ponto de vista experimental, pois os calos como um conjunto de células indiferenciadas, não especializadas, apenas crescem a partir de sucessivas divisões (George *et al.*, 1984) e apesar de terem sido coletados no meio em esgotamento de carbono, provavelmente este estresse não foi suficiente para a indução da produção e acúmulo de metabólitos secundários em maiores concentrações.

O presente trabalho desenvolveu um protocolo eficiente de indução de calos friáveis, aumentando o conhecimento sobre o cultivo *in vitro* da espécie *B. paniculata*. Estudos posteriores em outras condições de produção, acúmulo de metabólitos e um estudo do potencial de atividade biológica dos calos deverão ser realizados objetivando uma análise completa do perfil químico e biológico contribuindo para o conhecimento químico da espécie *Boerhavia paniculata* Rich.

4.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem afirmar:

- É possível induzir calos friáveis a partir de sementes sem o tegumento em meio $\frac{1}{2}$ MS semi-sólido acrescido de água de coco (10%) suplementado com 2,265 μ M de 2,4-D e glicose (1,5%);
- Houve indução de calos no meio $\frac{1}{2}$ MS contendo somente água de coco sem regulador de crescimento e sem glicose;
- A água de coco promoveu o aumento do crescimento dos calos e de friabilidade;
- O perfil metabólico do extrato hexânico dos calos de *B. paniculata* revelou a presença de 28 metabólitos, destacando-se os ácidos graxos, um éster hexadecanoato de metila e fitosteróis (β -sistosterol);
- Existem 8 metabólitos que foram detectados somente no extrato hexânico dos calos: 1-hexadecanoilglicerol, o éster hexadecanoato de metila, os ácidos graxos tricosanoico, hexacosanoico (cerótico), heptadecenoico, eicosenoico, acetato de sitosterol e um esterol.
- Dos 28 metabólitos encontrados nos calos 18 compostos também foram detectados nas raízes, podendo-se afirmar que o extrato hexânico dos calos possui um perfil químico próximo ao perfil químico do extrato hexânico das raízes silvestres da mesma espécie;

5 CULTIVO *IN VITRO* E PERFIL QUÍMICO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *Boerhavia paniculata*

RESUMO

A cultura de células vegetais é uma ferramenta biotecnológica útil para a produção de substâncias medicinais, e a utilização de eliciação nestas culturas pode melhorar a produção destes metabólitos importantes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de suspensão celular a partir de calos friáveis de *B. paniculata* e avaliar o perfil metabólico do extrato hexânico de células eliciadas e não eliciadas. Para isto, inicialmente 5 g de calos friáveis foram cultivados em meio líquido contendo metade das concentrações de macro, micronutrientes e vitaminas do MS ($\frac{1}{2}$ MS) suplementado com glicose (1,5%; m/v), 0,5 mgL⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; m/v) e mantidos em agitador orbital a 120rpm e temperatura de 30°C durante 7 dias. As culturas de células *in vitro* foram submetidas ao estudo de progressão da biomassa celular por um período de 35 dias e eliciadas com *Aspergillus flavus* e *Candida albicans* (2%; m/v). A extração dos metabólitos das células eliciadas e não eliciadas foi realizada em coluna de vidro, com sílica 60 mesh e solventes hexano, acetato de etila e solução hidroalcolica (8:2; v/v). O perfil químico do extrato hexânico destas células foi analisado por meio de lipidômica em CG/EM. O protocolo utilizado foi eficiente para a produção da suspensão celular. O perfil químico das células eliciadas e não eliciadas apresentou em maior proporção ácidos graxos e fitosteróis (β -sistosterol e estigmasterol). O perfil metabólico dos extratos hexânicos de raízes silvestres, calos e suspensão eliciadas e não eliciadas da espécie *B. paniculata* mostraram-se próximos. Houve uma resposta nas células eliciadas com os micro-organismos que ficaram evidenciados pelo escurecimento e variação nas proporções dos lipídios produzidos por estas células, porém não houve produção de novas substâncias na fração lipídica. Este estudo contribuiu para o estabelecimento de técnicas biotecnológicas e de lipidômica na espécie *B. paniculata* e indicam que a otimização das metodologias permitirão a maior produção de metabólitos de interesse, e o estudo de suas atividades biológicas.

Palavras-chave: *Boerhavia paniculata*, suspensão celular, eliciação, lipidômica, fitosterol, metabólitos secundários.

ABSTRACT

A plant cell culture is a tool useful for biotechnological production of medicinal substances and the elicitation of these crops can improve the production of these valuable metabolites. Therefore, the objective of this study was to develop a protocol of cell suspension from friable callus of *B. paniculata* and it evaluates the metabolic profile of the hexane extract of cells elicited and not elicited. For this, initially 5 g of friable calli were cultured in liquid medium containing strength half of macro, micronutrients and vitamins of MS ($\frac{1}{2}$ MS) supplemented with glucose (1.5%; w/v), 0.5 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; w/v) and maintained in an orbital shaker at 120 rpm and 30°C for 7 days. The cell cultures were submitted to study of the progression of cell biomass for a period of 35 days and elicited with *Aspergillus flavus* and *Candida albicans* (2%; w/v). The extraction of metabolites of the cells elicited and not elicited was performed in a glass column, with silica 60 mesh and solvents hexane, ethyl acetate and hydroalcoholic solution (8:2; v/v). The chemical profile of the hexane extract of these cells was analyzed by means of lipidomic in GC/MS. The protocol used was efficient for the production of cell suspension. The chemical profile of the hexane fraction of the cells elicited and non-elicited showed a greater proportion of fatty acids and phytosterols (stigmasterol and β -sitosterol). Metabolic profile of the hexane extract of the roots of wild plant, calli and cell suspension elicited and no elicited of the specie were remarkably close. There was a response in cells elicited with microorganisms, which it was evidenced by the browning and variation in the proportions of lipid produced by these cells, but there was no production of new substances in the lipid fraction. This study contributed to the establishment of biotechnology and lipidomic of the specie *B. paniculata* and indicates that methodologies optimization will allow increasing production of metabolites of interest, and studying their biological activities.

Keywords: *Boerhavia paniculata*, cell suspension, elicitation, lipidomic, phytosterols, secondary metabolites.

5.1 INTRODUÇÃO

A abordagem biotecnológica, principalmente através de cultura de células vegetais, é uma alternativa importante para a investigação e produção de compostos de interesse em plantas (KARUPPUSAMY, 2009; MULABAGAL; TSAY, 2004), ressaltando-se a suspensão de células vegetais que pode ser utilizada para a produção de metabólitos secundários. O cultivo de células em suspensão celular é preferido para a produção em larga escala de metabólitos secundários bioativos devido ao rápido ciclo de crescimento, produzindo grande quantidade de células para análises quantitativas e qualitativas de respostas de crescimento e metabolismo de novos compostos (MULABAGAL; TSAY, 2004; VIJAYA SREE et al., 2010). Entretanto, o cultivo de células normalmente acumula grandes quantidades de metabólitos secundários somente em condições específicas. Desta forma, o uso de eliciadores pode ser uma eficiente estratégia para aumentar a produtividade de compostos bioativos (KARUPPUSAMY, 2009; MULABAGAL; TSAY, 2004).

Boerhavia paniculata, Rich. é uma planta medicinal conhecida popularmente no Brasil como erva tostão utilizada na medicina tradicional de vários países como expectorante, diurético, laxante, tratamentos de asma, icterícia, ascite, infecções da via urinária entre outros (FNA, 2011; MÉNDEZ et al., 2001; SANTOS et al., 2007; TAYLOR, 2005). O gênero *Boerhavia* tem sido intensamente estudado quanto às propriedades químicas e farmacológicas dos extratos e metabólitos nos últimos anos (CHAUDHARY; DANTU, 2011; IQBAL et al., 2011; MÉNDEZ et al., 2001; TAYLOR, 2005). Entretanto, ainda são escassos os estudos sobre o cultivo *in vitro* de células e estudo do perfil químico das células cultivadas *in vitro* de *Boerhavia*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir suspensão celular a partir de calos friáveis de *Boerhavia paniculata* Rich. e avaliar o perfil metabólico do extrato hexânico de células eliciadas e não eliciadas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Produção de Suspensão Celular a partir de Calos friáveis

Inicialmente, 5 g de calos friáveis de *B. paniculata* foram inoculados inicialmente em 100 mL de meio líquido contendo metade das concentrações de macro, micronutrientes e vitaminas do MS ($\frac{1}{2}$ MS; MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 15 gL^{-1} de glicose (m/v), $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; m/v) em frascos cônico de 250 mL e mantidos em incubadora com agitador orbital Tecnal® (Te-420) a $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 120 rpm por 7 dias.

Após este período, a cultura foi filtrada em peneira com 0,2 cm de malha. O material retido na peneira foi descartado e o filtrado foi transferido para outro tubo cônico contendo meio fresco e mantido sob as mesmas condições anteriores. Após 7 dias foi realizado o refrescamento da cultura por decantação, retirando-se o meio velho (cerca de 80%) e adicionando meio fresco novo (80 mL) reconstituindo o volume inicial de 100 mL. O material foi mantido sob as mesmas condições anteriores por mais 7 dias.

Para o estabelecimento da suspensão celular, duas alíquotas de 10 mL cada, contendo 0,9 g de células, foram retiradas, após agitação, e transferidas para dois frascos de 250 mL contendo meio novo (100 mL). O material foi mantido sob as mesmas condições anteriores.

5.2.2 Curva de Progressão da Biomassa Celular

O crescimento da suspensão celular de *B. paniculata* foi medido em relação à massa fresca e a massa seca. Para isso, três frascos cônico de 250 mL contendo a suspensão celular foram retirados a cada 5 dias como amostragem durante 35 dias. A massa fresca (MF) das células foi medida após as amostras serem filtradas em papel filtro quantitativo J.P. nº 41 (diâmetro de 7 cm) com auxílio de bomba de vácuo. A massa seca (MS) das células foram determinadas após secagem em estufa a 60°C por 48h.

5.2.3 Preparo do Elicificador Biótico

Para o preparo do elicificador biótico, suspensão de fungos *Aspergillus flavus* e *Candida albicans* foram inicialmente centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Em seguida, o material foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos, e a biomassa foi seca em estufa a 105 °C por 1h. As diferentes biomassas foram moídas separadamente em almofariz. Massas de 20 mg foram ressuspensas em 10 mL de água destilada estéril (2%; m/v) e utilizadas na suspensão celular como elicidores.

5.2.4 Eliciação de Cultura de Células em Suspensão

As culturas de células em suspensão de *B. paniculata* foram eliciadas adicionando-se 20 mg de biomassa de células de *Aspergillus flavus* ou *Candida albicans*, após 2/3 da fase exponencial da suspensão celular. O material foi mantido a 30 ± 2 °C em incubadora com agitação orbital de 120 rpm por 5 dias. A cada 24 h, dois frascos foram retirados por amostragem de sacrifício. A massa das células eliciadas foram determinadas após filtração em papel filtro quantitativo (diâmetro de 7 cm) sob pressão reduzida. O meio de cultura e as células armazenadas a -18 °C para análises posteriores.

5.2.5 Obtenção de Concentrados Metabólicos das Células em Suspensão

A extração dos metabólitos foi realizada no laboratório de Produtos Naturais (PN) da Química/UFGA. A indução de metabólitos foi avaliada na biomassa das células em suspensão de *B. paniculata* não eliciadas (SNE) por esgotamento da fonte de carbono no meio e nas células eliciadas foram avaliados a cada 24h durante 4 dias. Para a extração dos metabólitos e obtenção dos extratos, as células foram coletadas, secas em estufa à temperatura de 60°C por 48h. Logo depois, as células foram trituradas até a formação de um pó. As extrações e a derivatização foram realizadas diretamente nas células com os seguintes solventes: hexano, acetato de etila e solução hidroalcoólica (8:2; v/v).

5.2.6 Avaliação do Perfil Metabólico dos Extratos Hexânicos da Suspensão Elicida e não Elicida

As análises do perfil químico do extrato hexânico das células de *B. paniculata* foram realizadas por meio de lipidômica em CG/EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas).

O extrato hexânico foi analisado por técnica de metabolômica após o processo de sililação descrito a seguir: uma alíquota de 500mg do extrato hexânico foi dissolvido em 500 μ L de ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; 2%) em microtubo 1,5 μ L e aquecido a 90°C por 2 h. Após resfriamento a solução foi extraída com 500 μ L de n-hexano por 3 vezes. As frações re combinadas foram lavadas com bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$; 4%) em água. E passado através de uma pipeta Pasteur contendo 100 mg de sulfato de sódio anidro ($NaSO_4$). Após evaporação do solvente, em "SpeedVac", a mistura foi sililada em 50 μ L de piridina + 50 μ L de BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida). Em seguida foi adicionado 300 μ L de clorofórmio e 1 μ L da mistura foi analisada em CG/EM AGILENT 5975C GC/MS System.

O sistema foi operado nas seguintes condições: o forno foi mantido com uma programação de temperatura que iniciou com 100°C por 2 min, com rampa de 15°C/min, elevando-se até 180°C e permanecendo por 1 min, com segunda rampa de 5°C/min, elevando-se até 300°C e permanecendo nesta temperatura por 10 min. O modo de injeção foi 1 μ L em split (1:5). A velocidade linear do gás de arraste foi de 1,2 mL/min, utilizando-se Hélio como gás de arraste. A coluna utilizada foi HP-5ms 5% fenil-metil-silox com 30m x 25 μ m de DI x 0,25 μ m de espessura de filme. O injetor e a linha de transferência foram mantidos em 250 °C. O Espectrômetro de massas operou a 70 eV, com 1 scan/s. Os dados obtidos foram analisados em bibliotecas padronizadas encontradas na base de dados "The Golm Metabolome Data Base".

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Progressão da Biomassa Celular

No estudo da progressão de crescimento da biomassa de cultura de células em suspensão de *B. paniculata* Rich. foi observado a influência do tempo no crescimento das células. Este estudo permite observar a taxa de desenvolvimento da biomassa e sua relação com a produção e o acúmulo de metabólitos. Em geral, culturas de células apresentam longos períodos de observação.

Neste experimento tomou-se 35 dias de observação, com amostragem de sacrifício em intervalos de 6 dias. Durante este período foram realizadas medidas da massa fresca e massa seca. As células apresentaram elevada quantidade de água que pode ser observada pela diferença entre os valores de massa fresca e massa seca das células. A Tabela 7 apresenta os valores de biomassa e os índices de crescimento.

Tabela 7 - Crescimento da biomassa de células em suspensão e índices de crescimento das células monitoradas durante 35 dias.

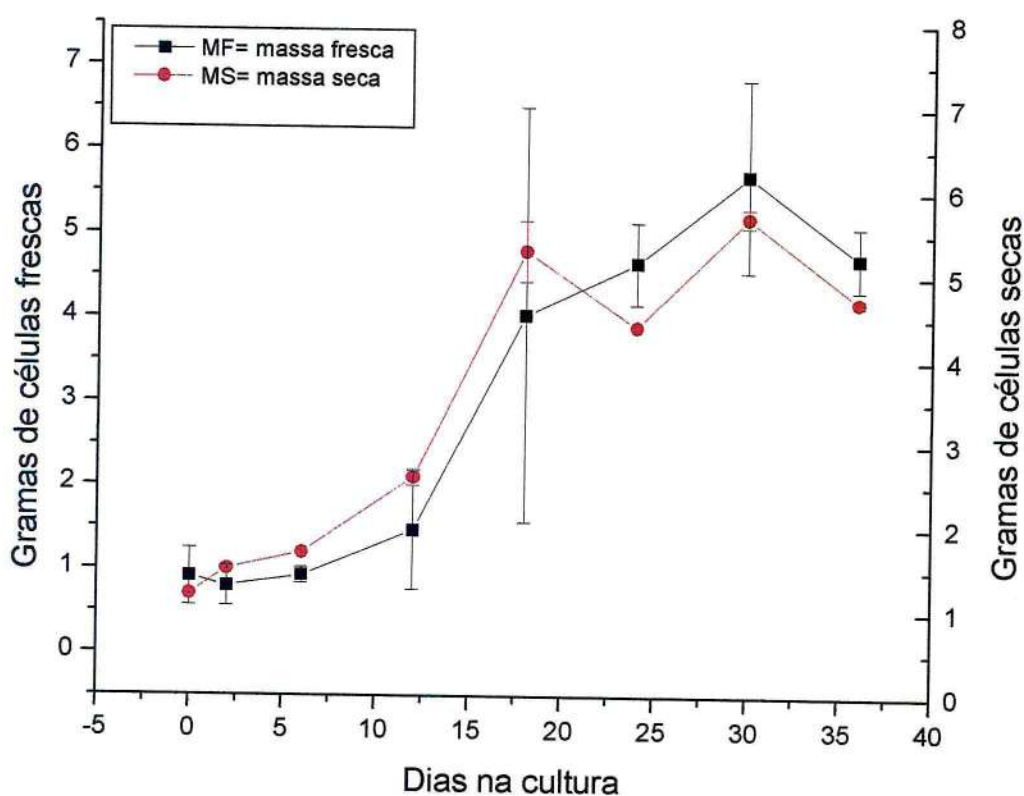
DIAS	MF	MS	IC	COR	DesvPad	CV(%)
0	0,91	0,07	0,00	Bege clara	0,34	37,0
2	0,80	0,10	0,89	Bege clara	0,24	30,0
6	0,93	0,12	1,00	Bege escuro	0,09	10,0
12	1,47	0,21	1,67	Bege escuro	0,71	48,1
18	4,04	0,48	4,44	Bege escuro	2,47	61,1
24	4,66	0,39	5,22	Marrom	0,49	10,5
30	5,70	0,52	6,33	Marrom	1,14	20,0
35	4,72	0,42	5,22	Marrom	0,38	8,1
Média Geral	-	-	3,06	-	0,44	25,0

Nota: MF= massa fresca em mg; MS= Massa Seca em mg; IC = índice de crescimento relacionado à MS; CV= Coeficiente de Variação relacionado à MS; DesvPad = Desvio Padrão relacionado à MS; COR = coloração apresentada pelas células cultivadas *in vitro*;

A curva de progressão (Figura 13) apresentou uma fase inicial de adaptação longa e lenta, em torno de 6 dias e a biomassa atingiu seu ápice ao 30º dia, atingindo-se 5,7g de massa fresca, com IC₃₀ de 6,3. Neste período, não foi observado uma fase estacionária, o que reforça a hipótese deste tipo de células, nas

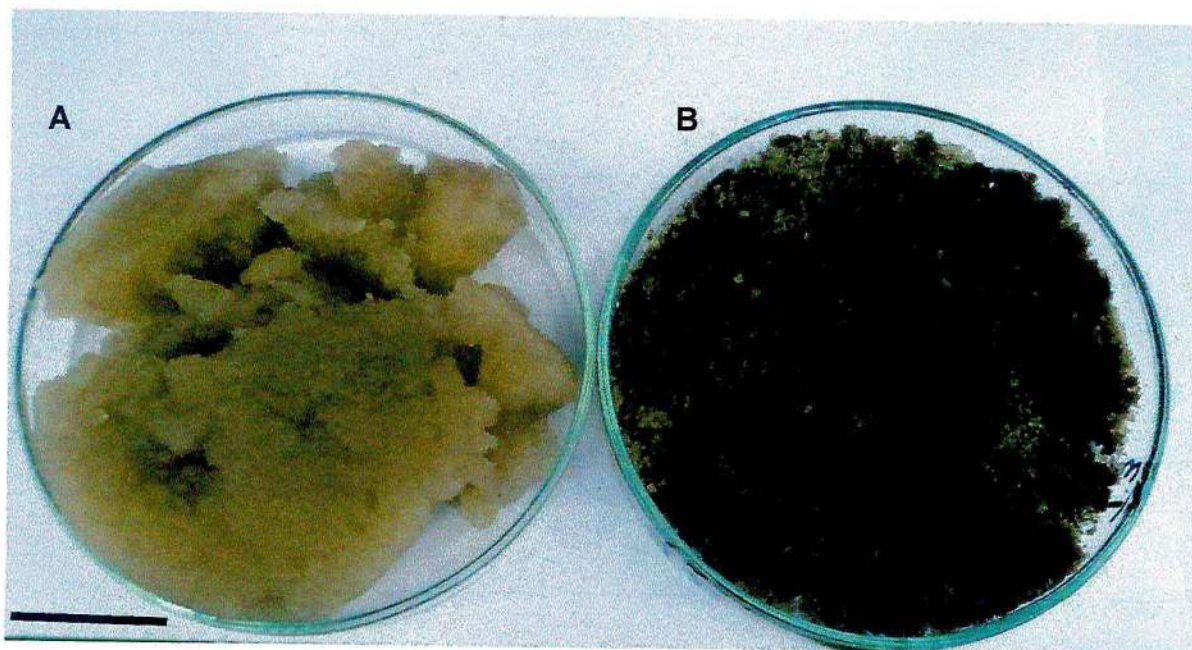
condições estabelecidas não seguir o modelo de Monod. Entre este intervalo, observou-se apenas a fase exponencial bastante prolongada o que leva a concluir que nestas condições há um excelente potencial de células mitóticas em pleno desenvolvimento, não sendo observadas as quatro fases. Gopi e Vatsala (2006) relataram que as células em suspensão de *Gymnema sylvestre* teve maior média de crescimento de biomassa entre 18º e 24º dia, e que após este período houve uma queda no crescimento da biomassa havendo mudança de coloração.

Figura 13 – Gráfico da curva de progressão do crescimento da suspensão celular de *Boerhavia paniculata* Rich. mensurada durante 35 dias.



A limitação dos nutrientes, principalmente da fonte de carbono no meio, se apresentou com acelerado consumo do mesmo, o que levou a uma senescência rápida. Nesta fase (declínio) houve a formação de metabólitos provavelmente pelo estresse das células na ausência de carbono que foi observada pelo escurecimento das células a partir do 24º dia de cultura (Figura 14).

Figura 14 – Células de *Boerhavia paniculata* Rich. obtidas de suspensão celular com 25 dias (A) e com 36 dias (B) levando ao escurecimento das células. Barra = 1 cm.



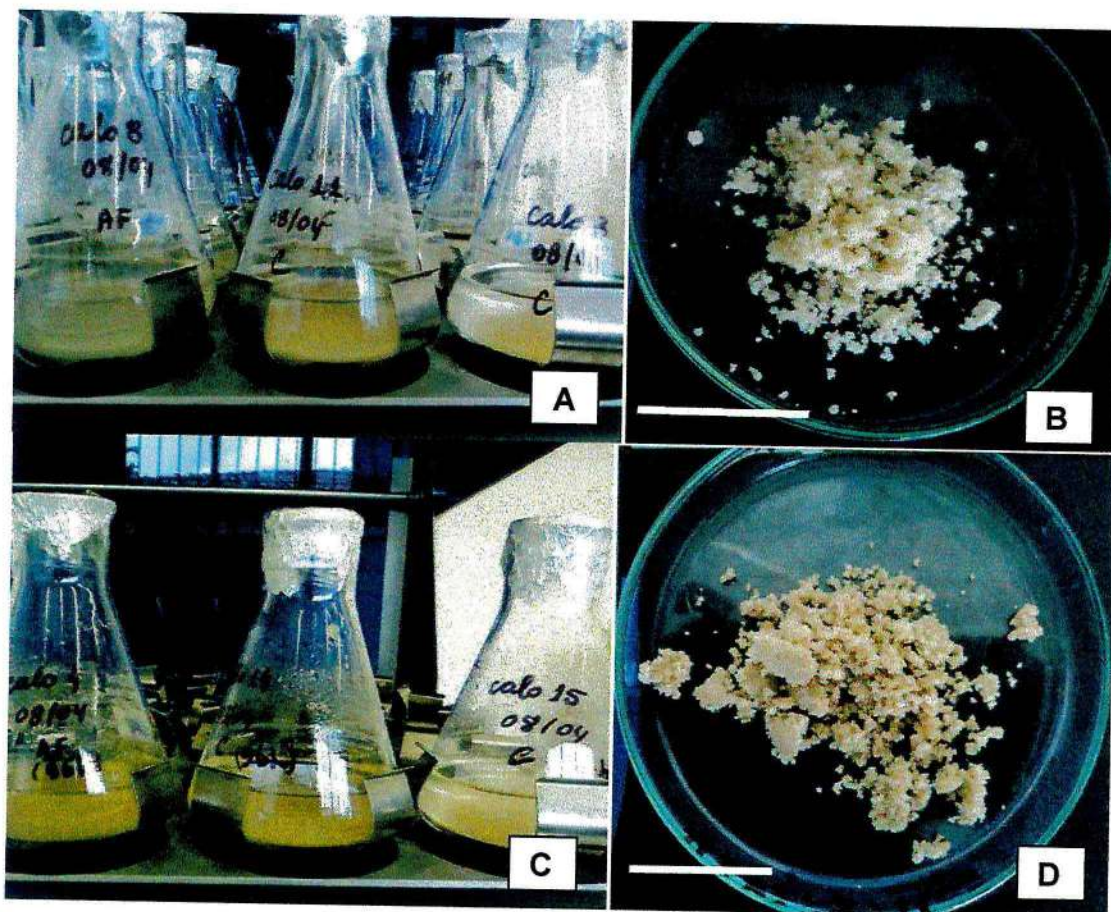
5.3.2 Eliciação de cultura de células em suspensão

Neste trabalho foi iniciado um estudo com uso de eliciadores em *B. paniculata* para investigar a produção de metabólitos com atividade biológica específica. Para isto, inicialmente foram utilizados os micro-organismos *C. albicans* e *A. flavus*. O fungo *C. albicans* foi selecionado por ser oportunista, e estar presente em alguns tipos de infecção oral e vaginal nos seres humanos (BIASOLI et al., 2002). Já o *A. flavus* foi selecionado por ser um fungo de solo patogênico que infecta e contamina sementes pré-colheita e pós-colheita produzindo uma micotoxina tóxica (aflatoxinas) para humanos e animais (AMAIKE; KELLER, 2011). A eliciação é uma resposta de defesa das células em função de um estímulo externo (ataque de patógeno ou estresse ambiental) e diversas substâncias podem ser utilizadas para a eliciação. Desta forma, é esperada neste estudo uma eliciação pela presença de substâncias encontradas nos patógenos que são estranhas as células vegetais, sendo, portanto uma eliciação bioquímica, já que nenhum destes micro-organismos é responsável por doenças em plantas.

As células em suspensão no início do cultivo apresentavam-se com coloração bege e a partir de 72h de cultivo com os dois tipos de micro-organismos,

observou-se o início da mudança de coloração. Com 96h de cultivo as células já se apresentavam com coloração marrom (Figura 15). Porém, o meio de cultura se manteve translúcido, demonstrando que não houve contaminações e que os eliciadores induziram mudanças fisiológicas nas células vegetais, provavelmente pela produção de metabólitos intracelulares que não foram expelidos para o meio.

Figura 15 – Eliciação de células de *Boerhavia paniculata* Rich. em suspensão celular. (A) Suspensão celular sem eliciação. (B) Células sem eliciação. (C) Suspensão celular com 96h de eliciação. (D) Células com 96h de eliciação com *Candida albicans*. Barra = 3,3 cm.



Plantas ou células vegetais *in vitro* apresentam mudanças fisiológicas e morfológicas quando estão na presença de micro-organismos. Deste modo, os micro-organismos podem ser utilizados como eliciadores que induzem a produção de metabólitos pelas plantas. Eliciadores bióticos e abióticos são utilizados para estimular a produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais,

reduzindo assim o tempo do processo para atingir altas concentrações do produto. Glicoproteínas, quitosanas, polissacarídeos, enzimas inativas de origem fúngica ou bacteriana são utilizadas como eliciadores para a produção de metabólitos secundários (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002). Isto tem sido comprovado em cultura de calos e suspensão celular através de diversos estudos (KARUPPUSAMY, 2009; OLIVEIRA et al., 2009; ZHONG, 2011).

Neste estudo, os micro-organismos *Aspergillus flavus* ou *Candida albicans* usados como eliciadores induziram respostas de escurecimento em células em suspensão celular de *B. paniculata*. Este resultado é de extrema importância, pois comprova que os eliciadores induziram a produção de metabólitos *in vitro*. Em estudos posteriores outros micro-organismos e outras substâncias poderão ser avaliados na eliciação visando identificar eliciadores mais eficazes para a produção dos metabólitos na espécie *Boerhavia paniculata* Rich.

5.3.3 Perfil Metabólico dos Extratos Hexânicos da Suspensão Eliciada e Não Eliciada

A análise por CG/EM revelou que tanto as células em suspensão não eliciadas (SNE) quanto às células em suspensões eliciadas com *Aspergillus flavus* e *Candida albicans* produziram os mesmos 30 metabólitos, classificados como: álcool graxo, ácidos graxos hidroxilados, éster de ácido graxo, ácidos graxos e esteróis (Tabela 8).

Nas células em suspensão não eliciadas (SNE) os ácidos graxos foram os constituintes químicos identificados em maior quantidade (60%), destacando-se os ácidos octadecadienoico ou linoleico (37,5%), octadecanoico ou esteárico (8,32%), octadecatrienoico ou linolênico (6,1%) e tetracosanoico (2,44%). Os ácidos graxos hidroxilados e o éster de ácido graxo representam juntos 25,42% do total de metabólitos, tendo como destaque o composto hexadecanoato de metila (21,1%). Os fitosteróis representaram 14,26% destacando-se principalmente com compostos majoritários o estigmasterol (9,6%) e β -sitosterol (3,49%) (Tabela 8).

Tabela 8 - Lipídima comparativo do extrato hexânico de células eliciadas e não-eliciadas de *Boerhavia paniculata* lipídima em CG/EM.

CLASSIFICAÇÃO	IR	SNE	Células eliciadas com <i>Candida albicans</i>				Células eliciadas com	
			C24h	C48h	C72h	C96h	A24h	A48h
ALCOOL GRAXO E OUTROS COMPOSTOS								
1. Glicerol	1279	0,13	0,06	0,07	Tr	0,05	Tr	0,05
2. Octadecanol	2159	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
3. 1-Hexadecanoliglicerol	2606	0,05	Tr	Tr	0,00	Tr	0,14	0,05
4. 1-Octadecanoliglicerol	2799	0,06	Tr	Tr	Tr	0,05	0,05	0,05
ACIDOS GRAXOS HIDROXILADOS OU ESTER								
5. Hexadecanoato de metila	1925	21,1	21,0	25,2	23,3	23,9	19,4	20,4
6. Acido 2-Hidroxi-tetracosanoico	2922	2,95	2,73	3,40	4,93	4,98	1,69	2,65
7. Acido 2-Hidroxi-Pentacosanoico	3020	0,42	0,51	0,63	0,90	0,98	0,42	0,51
8. Acido 2-Hidroxi-hexacosanoico	3119	0,58	0,84	1,02	1,34	1,52	0,65	0,74
9. Acido 2-Hidroxi-hexadecanoico	2132	0,37	0,18	0,29	0,21	0,21	0,07	0,25
ACIDOS GRAXOS SATURADOS								
10. Acido Hexadecanoico (Palmitico)	2048	0,24	0,20	0,26	0,21	0,25	0,09	0,26
11. Acido Heptadecanoico	2028	0,23	0,15	0,25	0,25	0,25	0,48	0,20
12. Acido Octadecanoico (Estearico)	2128	8,32	8,13	7,80	8,81	8,90	8,03	7,12
13. Acido Eicosanoico (Araquidico)	2332	0,19	0,17	0,26	0,27	0,28	0,11	0,22
14. Acido Docosanoico (Behênico)	2533	0,17	0,16	0,22	0,21	0,30	0,04	0,22
15. Acido Tricosanoico	2634	0,06	0,07	0,09	0,10	0,11	0,03	0,07
16. Acido Tetracosanoico	2734	2,44	2,42	2,98	3,44	3,61	2,57	2,42
17. Acido Pentacosanoico	2835	0,29	0,38	0,42	0,48	0,53	0,51	0,35
18. Acido Hexacosanoico	2936	0,52	0,66	0,80	0,83	0,94	0,88	0,59
ACIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS								
19. Acido Octadecenoico (Oleico)	2109	1,90	1,66	1,63	1,77	1,76	1,61	1,38
20. Acido Eicosenoico	2307	0,23	0,17	0,22	0,24	0,32	0,00	0,17
21. Acido Docosenoico	2508	1,74	2,14	2,15	2,08	2,67	2,07	1,84
22. Acido Tetracosenoico	2711	0,14	0,11	0,18	0,15	0,25	0,00	0,11
ACIDOS GRAXOS INSATURADOS								
23. Acido Octadecadienoico (Linoleico)	2030	37,5	38,4	33,6	32,1	30,0	41,4	40,0
24. Acido Octadecatrienoico (Linolênico)	2106	6,10	5,9	5,0	4,6	4,20	5,97	7,36
ESTEROIS E DERIVADOS								
25. 1,3-Trimetililoxi-ergost-5-ene	3270	0,14	0,16	0,22	0,17	0,19	0,07	0,21
26. Estigmasterol	3302	9,60	9,26	9,26	9,82	10,10	8,83	8,27
27. β -Sitosterol	3361	3,49	3,26	3,05	2,65	2,14	3,72	3,49
28. Esterol 1 (uk)	3379	0,27	0,13	0,06	0,04	0,47	0,11	0,07
29. Esterol 2 (uk)	3407	0,67	0,87	0,72	0,90	0,94	0,86	0,79
30. Esterol 3 (uk)	3460	0,09	0,12	0,09	0,11	0,11	0,16	0,14

Nota: (1) O ácido nonodecanoico foi utilizado como padrão interno; (2) IR = Índice de Retenção calculado; (3) Tr = traço (<0,05); (4) SNE = % de compostos em célula sem eliciação; (5) C=Porcentagem (%) de compostos em células eliciadas com *Candida albicans*; (6) A= Porcentagem (%) de compostos em células eliciadas com

Os ácidos graxos possuem inúmeras funções na célula. O ácido linoleico e linolênico não podem ser sintetizados por mamíferos e são considerados essenciais à nutrição humana, pois só podem ser obtidos a partir da dieta (CALDER; BURDGE, 2004). Os fitosteróis têm sido reconhecidos como uma das substâncias que possuem atividade biológica contra o câncer. Nos animais, o sitosterol é utilizado como anti-inflamatório; anti-neoplásico, anti-pirético e modulador da atividade imunológica. Além disso, vale a pena citar, que o β -sitosterol ajuda na redução do colesterol existente no plasma dos seres humanos (CALPE-BERDIEL et al., 2008; ZHOU et al., 2008).

Em Nyctaginaceae, nenhum trabalho com células em suspensão e nem eliciação foi encontrado. Assim, devido à inexistência de trabalhos sobre a composição química de células vegetais *in vitro* nesta espécie não há como fazer uma análise comparativa com a literatura.

De modo geral, os dados obtidos demonstram que houve uma resposta nas células eliciadas com os micro-organismos após 24h. Os diferentes compostos identificados tiveram comportamento diferente para cada eliciador com uma variação na porcentagem.

Na eliciação com *Candida albicans* observou-se aumento na porcentagem de algumas substâncias em relação às células não eliciadas (SNE) como: ácidos graxos hidroxilados 2-hidroxi-pentacosanoico e 2-hidroxi-hexacosanoico, os ácidos graxos tricosanoico, pentacosanoico e hexacosanoico. E após 24h tiveram redução na porcentagem alguns compostos como o ácido octadecatienoico (linolênico), β -sitosterol e esterol 1.

Na eliciação com *Aspergillus flavus* somente apresentaram aumento da porcentagem com 24h de eliciação em relação às células não eliciadas (SNE) o ácido graxo hidroxilado 2-hidroxi-hexacosanoico, mas após 72h houve redução da porcentagem. A porcentagem do hexadecanoato de metila reduziu com 24h em relação às células não eliciadas (SNE), mas logo depois houve um aumento da mesma.

Ressalta-se que na análise do lipidoma não houve produção de novas substâncias da fração lipídica das células eliciadas. Porém, observou-se uma variação nas concentrações das substâncias presentes, principalmente os ácidos graxos, estigmasterol e β -sitosterol. A variação de concentração das substâncias

lipídicas evidencia a resposta das células de *B. paniculata* frente à presença dos diferentes eliciadores bióticos no meio.

A análise comparativa do perfil metabólico das células em suspensão eliciadas e não eliciadas com o perfil das raízes e calos de *B. paniculata* revelou a presença das mesmas classes de metabólitos: álcool graxo, ácidos graxos hidroxilados, ácidos graxos saturados e insaturados e esteróis (Tabela 9).

As raízes apresentaram um maior número de compostos químicos (34 substâncias) com predominância de esteróis (64,44%), seguido de ácidos graxos insaturados (21,63%) e saturados (10,97%). Os calos apresentaram um menor número de compostos (28 substâncias) dentre elas, destacam-se um éster de ácido graxo (hexadecanoato de metila) com 47,4%, ácidos graxos saturados (34,31%), insaturados (17,9%) e uma proporção muito pequena de esteróis (0,29%). As células em suspensão exibiram 30 compostos químicos com predominância de ácidos graxos insaturados (47,61%), o éster hexadecanoato de metila (21,1%), esteróis (14,26%) e ácidos graxos saturados (12,46%) (Tabela 9).

Observa-se que nas raízes há uma maior proporção de esteróis, principalmente estigmasterol (19,54%) e β -sitosterol (32,59%), do que nos calos e nas células em suspensão. Comparativamente, a proporção de ácidos graxos saturados é maior nos calos do que nas raízes e nas células em suspensão. Entretanto, os ácidos graxos insaturados estão em maior proporção nas células em suspensão e raízes do que nos calos (Tabela 9).

Os fitosteróis são estruturalmente análogos ao colesterol, com as mesmas funções básicas na planta como no animal, regular a fluidez da membrana e outras funções fisiológicas associadas à biologia vegetal (BRUFAU et al., 2008). Há mais de 250 diferentes fitosteróis, porém os mais comuns são o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol. Os fitosteróis são efetivos na redução de 30 a 50% do colesterol no organismo, sendo um composto com potencial benefício cardiovascular (MICALLEF; GARG, 2009b).

Tabela 9 – Análise comparativa do lipídoma do extrato hexânico de raiz, calos, células eliciadas e não-eliciadas de obtida por CG/EM.

CLASSIFICAÇÃO	IR	%RAIZ	%CALOS	%SNE	Células eliciadas com <i>Candida albicans</i>			
					%C24h	%C48h	%C72h	%C96h
ALCCOL GRAXO E OUTROS								
1. Glicerol	1279	Tr	Tr	0,13	0,06	0,07	Tr	0,05
2. Octadecanol	2159	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
3. 1-Hexadecanolilglicerol	2606	0,00	Tr	0,05	Tr	Tr	0,00	Tr
ACIDOS GRAXOS HIDROXILADOS OU ESTER								
4. Hexadecanoato de metila	1925	0,00	47,4	21,1	21,0	25,2	23,3	23,9
5. Acido 2-Hidroxi-tetracosanoico	2922	0,53	Tr	2,95	2,73	3,40	4,93	4,98
6. Acido 2-Hidroxi-pentacosanoico	3020	0,13	0,00	0,42	0,51	0,63	0,90	0,98
7. Acido 2-Hidroxi-hexadecanoico	2132	Tr	0,00	0,37	0,18	0,29	0,21	0,21
ACIDOS GRAXOS SATURADOS								
8. Acido Hexadecanoico (Palmitico)	2048	7,87	0,1	0,24	0,20	0,26	0,21	0,25
9. Acido Heptadecanoico	2028	0,11	0,3	0,23	0,15	0,25	0,25	0,25
10. Acido Octadecanoico (Esteárico)	2128	0,94	26,3	8,32	8,13	7,80	8,81	8,90
11. Acido Eicosanoico (Araquídico)	2330	0,08	5,4	0,19	0,17	0,26	0,27	0,28
12. Acido Heneicosanoico	2631	0,20	Tr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13. Acido Docosanoico (Behênico)	2533	0,37	1,2	0,17	0,16	0,22	0,21	0,30
14. Acido Tricosanoico	2634	0,00	0,1	0,06	0,07	0,09	0,10	0,11
15. Acido Tetracosanoico (Lignocéfico)	2734	1,16	0,7	2,44	2,42	2,98	3,44	3,61
16. Acido Pentacosanoico	2835	0,13	Tr	0,29	0,38	0,42	0,48	0,53
17. Acido Hexacosanoico (Cerótico)	2936	0,00	Tr	0,52	0,66	0,80	0,83	0,94
ACIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS								
18. Acido Hexadecenoico (Palmitoleico)	1905	0,05	2,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19. Acido Octadecenoico (Oleico)	2105	14,25	6,9	1,90	1,66	1,63	1,77	1,76
20. Acido Eicosenoico	2307	0,00	0,4	0,23	0,17	0,22	0,24	0,32
ACIDOS GRAXOS INSATURADOS								
21. Acido Octadecadienoico (Linoleico)	2030	5,14	6,3	37,5	38,4	33,6	32,1	30,0
ESTEROIS E DERIVADOS								
22. Campesterol (Ergost-5-em-3βol)	3274	7,63	0,00	0,14	0,16	0,22	0,17	0,19
23. Estigmasterol	3302	19,54	Tr	9,60	9,26	9,26	9,82	10,10
24. β-Sitosterol	3361	32,59	0,2	3,49	3,26	3,05	2,65	2,14
25. Estigmastan-3-ol	3379	3,15	Tr	0,27	0,13	0,06	Tr	0,47

Nota: (1) O ácido nonadecanoico foi utilizado como padrão interno; (2) IR = Índice de Retenção calculado; (3) Tr = traço (<0,05); (4) SNE = % de compostos em célula sem eliciação; (5) C= Porcentagem (%) de compostos em células eliciadas com *Candida albicans*; (6) A= Porcentagem (%) de compostos em células eliciadas com

Os dois mais importantes ácidos graxos insaturados são o ácido linoleico e linolênico precursores de ácidos graxos altamente insaturados (ácido araquidônico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico e docosapentaenoico), que são responsáveis pela síntese da família de mediadores bioativos conhecidos como eicosanoides. Os eicosanoides estão intimamente relacionados à resposta anti-inflamatória nas células (CALDER-BURDGE, 2004; MICALLEF; GARG, 2009b).

Ressalta-se que são encontradas 11 substâncias apenas nas raízes, dentre elas: ácido fosfórico, docosanol, tetracosanol, os ácidos graxos hidroxilados 2-hidroxi-tricosanoico e 2-hidroxi-tetracosanoico, os ácidos graxos saturados tetradecanoico (mirístico) e pentadecanoico, o ácido graxo insaturado tetracosadienoico, e os esteróis 3,5,dieno-estigmastan, 24-etil-22-coprostenol, cicloaudenol.

Observa-se também que são encontradas 2 substâncias exclusivamente nos calos: o ácido graxo insaturado heptadecenoico e o esterol acetato de sistosterol. E 7 são encontrados compostos apenas nas células em suspensão, destacam-se 1-octadecanoilglicerol, o ácido graxo hidroxilado 2-hidroxi-hexacosanoico, os ácidos graxos insaturados docosenoico, tetracosenoico e octadecatrienoico (linolênico) e dois esteróis que não foram identificados (esterol 2 e esterol 3).

Nos extratos analisados comparativamente foram identificados 15 compostos que estão presentes nas raízes, calos e células em suspensão: glicerol, octadecanol, 2-hidroxi-tetracosanoico, os ácidos graxos hexadecanoico (palmítico), heptadecanoico, octadecanoico (esteárico), eicosanoico (araquídico), docosanoico (behênico), tetracosanoico (lignocérico), pentacosanoico, octadecenoico (oleico), octadecadienoico (linoleico), e os esteróis estigmasterol, β -sitosterol e estigmastan-3-ol (Tabela 9).

O éster hexadecanoato de metila, os ácidos palmítico e esteárico foram caracterizados no meio de cultura e em calos com diferentes idades de *C. paralicola* x *C. weddelliana*. Já os ramificados (metil-tetra, penta e hexadecanoico) foram produzidos apenas no calo de *C. paralicola* x *C. weddelliana* cultivado por mais tempo (8 meses) (CAMARA et al., 2002).

São encontrados 5 metabólitos comuns nos calos e nas células em suspensão eliciadas e não eliciadas, destacando-se o éster hexadecanoato de metila, 1-hexadecanoilglicerol, os ácidos graxos tricosanoico, hexacosanoico (cerótico) e eicosenoico. São encontrados 2 metabólitos comuns na raiz e nos calos os ácidos graxos heneicosanoico e hexadecenoico (palmitoleico). Nas raízes e nas

células em suspensão eliciadas e não eliciadas são encontrados 3 compostos em comum: os ácidos hidroxilados 2-hidroxi-pentacosanoico e 2-hidroxi-hexadecanoico, e o esterol campesterol (Tabela 9).

Os dados obtidos do perfil metabólico dos extratos hexânicos de raízes silvestres, calos e suspensão eliciadas e não eliciadas da espécie *B. paniculata* mostraram-se próximos, confirmando que alguns metabólitos estão presentes na planta silvestre bem como nas células cultivadas *in vitro* (calos e suspensão) com variações apenas nas porcentagens destas substâncias.

Este trabalho permitiu estabelecer um protocolo de suspensão celular a partir de calos friáveis e a identificação do perfil metabólico de células em suspensão eliciadas e não eliciadas de *B. paniculata*. Indicando que estudos posteriores de otimização das metodologias permitirão a maior produção de metabólitos de interesse.

5.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

- O protocolo utilizado para a suspensão celular foi eficiente e a biomassa atingiu seu ápice ao 30º dia com 5,7g de massa fresca e índice de crescimento de 6,3;
- A curva de crescimento da cultura de células não apresentou fase estacionária, e apresentou uma fase de adaptação longa;
- A eliciação com micro-organismos *Aspergillus flavus* e *Candida albicans* (2%; m/v) induziu respostas fisiológicas de escurecimento nas células em suspensão celular de *B. paniculata*;
- O perfil lipídico das células eliciadas e não eliciadas revelou 30 metabólitos, destacando-se ácidos graxos, um éster hexadecanoato de metila, e os fitosteróis β -sistosterol e estigmasterol;

- A eliciação com *Aspergillus flavus* e *Candida albicans* (2%) não produziu novas substâncias no extrato hexânico, mas produz variação nas proporções de algumas substâncias, principalmente os ácidos graxos, estigmasterol e β -sitosterol;
- O perfil metabólico dos extratos hexânicos de raízes silvestres, calos e suspensão eliciadas e não eliciadas da espécie *B. paniculata* mostraram-se próximos, confirmando que alguns metabólitos estão presentes na planta silvestre bem como nas células cultivadas *in vitro* (calos e suspensão) com variações apenas nas porcentagens destas substâncias;
- Existem 7 metabólitos que foram detectados somente nas células em suspensão: 1-octadecanoilglicerol, o ácido graxo hidroxilado 2-hidroxi-hexacosanoico, os ácidos graxos insaturados docosenoico, Tetracosenoico e octadecatrienoico (linolênico) e dois esteróis que não foram identificados (esterol 2 e esterol 3).

6 CONCLUSÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos e nas condições em que foi desenvolvido o trabalho, pode-se concluir que:

- O extrato hexânico das raízes de *B. paniculata* Rich. apresentou significativa atividade antiinflamatória;
- Os extratos acetato de etila (Eacet) e hexânico (Ehex) das raízes da planta silvestre não apresentam atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*;
- Diferentes metabólitos foram identificados no extrato hexânico das raízes da planta silvestre, destacando-se como majoritários ácidos graxos e os fitosteróis β -sitosterol e estigmasterol;
- Calos friáveis de *B. paniculata* foram induzidos a partir de sementes sem o tegumento em meio ½ MS semi-sólido suplementado com 2,265 μ M de 2,4-D, glicose (1,5%; m/v) e água de coco (10%; v/v);
- A água de coco favoreceu o crescimento e a friabilidade dos calos *in vitro*;
- Em 35 dias de cultivo de células, a suspensão celular não apresentou uma fase estacionária e o ápice de produção de biomassa ocorreu no 30º dia de cultivo de células em suspensão;
- A eliciação com os micro-organismos *Aspergillus flavus* e *Candida albicans* induziu respostas fisiológicas (escurecimento) nas células em suspensão;
- O perfil metabólico das células eliciadas com *Aspergillus flavus* e *Candida albicans* (2%) não produziu novas substâncias, mas produziu variação nas proporções de algumas substâncias, principalmente os ácidos graxos, estigmasterol e β -sitosterol;

- O perfil metabólico do extrato hexânico das raízes, calos, células em suspensão eliciadas e não eliciadas de *B. paniculata* revelaram a presença da mesma classe de compostos: ácidos graxos saturados e insaturados, ácidos graxos hidroxilados e fitosteróis;
- Foram encontrados 11 metabólitos somente nas raízes de *B. paniculata*: ácido fosfórico, docosanol, tetracosanol, os ácidos graxos hidroxilados 2-hidroxi-tricosanoico e 2-hidroxi-tetracosenoico, os ácidos graxos saturados tetradecanoico (mirístico) e pentadecanoico, o ácido graxo insaturado tetracosadienoico, e os esteróis 3,5,dieno-estigmastan, 24-etil-22-coprostenol, cicloaudenol;
- Existem metabólitos que foram encontrados exclusivamente nos calos: o ácido graxo insaturado heptadecenoico e o esterol acetato de sistosterol;
- Foram encontrados 7 metabólitos somente nas células em suspensão eliciadas e não eliciadas: 1-octadecanoilglicerol, o ácido graxo hidroxilado 2-hidroxi-hexacosanoico, os ácidos graxos insaturados docosenoico, Tetracosenoico e octadecatienoico (linolênico) e dois esteróis que não foram identificados (esterol 2 e esterol 3);
- Nas raízes de *B. paniculata* observou-se uma maior proporção de esteróis, principalmente estigmasterol (19,54%) e β -sitosterol (32,59%), do que nos calos e nas células em suspensão;
- O perfil metabólico dos extratos hexânicos de raízes silvestres, calos e suspensão eliciadas e não eliciadas da espécie *B. paniculata* mostraram-se próximos, confirmando que alguns metabólitos estão presentes na planta silvestre bem como nas células cultivadas *in vitro* (calos e suspensão) com variações apenas nas porcentagens destas substâncias;

REFERÊNCIAS

- ADESINA, S. K. Anticonvulsant properties of the roots of *Boerhaavia diffusa*. **Quarterly Journal of Crude Drug Research**. v. 17, p. 84-86, 1979.
- ADKINS, S. W. et al. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 12, p. 1829-1835, 1993.
- AKIHISA T. et al. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. **J. Agric. Food Chem.** v. 48, p. 2313-2319, 2000.
- AMAIKE, S; KELLER, N.P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 107-133, 2011.
- ANTOGNONI F. et al. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 78, p. 345-352, 2007.
- APU, A. S. et al. Phytochemical screening and *in vitro* bioactivities of the extracts of aerial part of *Boerhavia diffusa* Linn. Asian Pacific **Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 9, p. 673-678, 2012.
- AWAD A. B. et al. β -sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 52, p. 419-426, 2008.
- AWAD A. B.; FINK C. S. Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. **The Journal Nutrition**, v. 130, p. 2127-2130, 2000.
- AWAD, A. B.; DOWNIE, A. C.; FINK, C. S. Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by β -sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture, **Int. J. Mol. Med.** v. 5, p. 541-545, 2000.
- AWAD, A. B.; ROY, R.; FINK, C. S. β -sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells, **Oncol. Reports**, v. 10, p. 497-500, 2002.
- AWAD, A. B.; WILLIAMS, H.; FINK, C. S. Effect of phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells, **J. Nutr. Biochem**, v. 14, p. 111-119, 2003.

BACKHOUSE C. N. et al. Active constituents isolated from *Psoralea glandulosa* L. with anti-inflammatory and antipyretic activities. **Journal Ethnopharmacology**, v. 78, n. 1, p. 27-31, 2011.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry medicinal and aromatic plant**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. v. 4, p. 1-36.

BALANDRIN, M.F. et al. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, p. 1154-1160, 1985.

BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 23. ed. Itaquaquecetuba: EDEL, 1991.

BARANDIARAN, X. et al. An efficient method for callus culture and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). **HortScience**, v. 34, p. 206-209, 1999.

BARRUETO CID, L.P. Suspensão celular. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de Tecidos in vitro e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p.183-260.

BAUER A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEECHER, G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **The of Journal Nutrition**, v. 133, p. 3248-3254, 2003.

BHALLA, T. N. et al. Anti-inflammatory activity of *Boerhaavia diffusa*. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 12, p. 37, 1968.

BIASOLI, M. S.; TOSELO, M. H.; MAGARÓ, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. **Mycoses**, v. 45, p. 465-469, 2002.

BJORKMAN, D. J. Nosteroidal anti-inflammatory drug induced gastrointestinal injury, **Am. J. Med.**; v. 101, n. 1, p. 25-32, 1996.

BORRELLI, F. et al. Isolation of new rotenoids from *Boerhaavia diffusa* and evaluation of their effect on intestinal motility. **Planta Medica**, v.71, n.10, p. 928-932, 2005.

BORRELLI, F. et al. Spasmolytic effects of nonprenylated rotenoid constituents of *Boerhaavia diffusa* roots. **Journal of Natural Products**, v.69, n.6, p.495-501, 2006.

BOTSARIS, A. S.; MACHADO, P.V. **Introdução a fitoterapia: Momento Terapêutico Fitoterápico**, v. 1, p. 8-11, 1999.

BOUIC P.J., LAMPRECHT J.H. Plant sterols and sterolins: a review of their immune-modulating properties. **Altern Med Rev**, v. 4, n. 3, p. 170-177, 1999.

BOUIC P.J. et al. The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. **Int J Sports Med**, v. 20, n. 4, p. 258-262, 1999.

BOUIC P.J.D. et al. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. **Int. J. Immunopharmac.**, v.18, n. 12, p. 693-700, 1996.

BRAGA R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Coleção Mossoreense, Natal, Brasil: UFCE, v. 315, 1960. p. 406-407.

BRAMLEY, P.M. Isoprenoid Metabolism. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1997. p. 417-437.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação Agrobacterium-Hospedeiro. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de Transformação genética de Plantas**. Brasília-DF: Embrapa-SPI-Embrapa-Cenargen, 1988. p. 75-92.

BROWNLEADER, M. D.; DEY, P. M. Plant Cell Biotechnology. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B (Ed.). **Plant Biochemistry**. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1997. p. 517-529.

BRUFAU G., CANELA M.A., RAFECAS M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering. **Nutr Res**, v. 28, n. 4, p.217-225, 2008.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de Tecidos *in vitro* e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-132.

CALDER, P. C. Dietary modification of inflammation with lipids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p. 345-358, 2002.

CALDER, P. C.; BURDDGE, G. C. Fatty acids. In: NICOLAOU A., KOKOTOS G. (Ed.). **Bioactive Lipids**. Bridgwater, England: The Oily Press, 2004. v. 17, cap. 1, p. 1-36.

CALPE-BERDIEL L. et al. Phytosterols do not change susceptibility to obesity, insulin resistance, and diabetes induced by a high-fat diet in mice. **Metabolism**, v.57, n. 11, p. 1497-1501, 2008.

CALPE-BERDIEL L.; ESCOLÁ-GIL, J.C.; BLANCO-VACA F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. **Arteriosclerosis**, v. 203, p. 18-31, 2009.

CAMARA, C. A. G.; SHEPHERD, S. L. K.; JOAQUIM, D. R. G. Análise química da cultura de tecidos do híbrido *Clusia paralicola* x *Clusia weddelliana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 26-28, 2002.

CAMPBELL-FALCK, D. et al. The intravenous use of coconut water. **American Journal of Emergency Medicine**, v.18, n. 1, p. 108-111, 2000.

CAO, J. et al. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 586-591, 1992.

CHAUDHARY G.; DANTU P. K. Morphological, phytochemical and pharmacological, Studies on *Boerhaavia diffusa* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 11, p. 2125-2130, 2011.

CHAUHAN C. K.; JOSHI M. J. *In vitro* crystallization, characterization and growth-inhibition study of urinary type struvite crystals. **Journal of Crystals Growth**, 2011.

CHILD, J.J.; LARUE, T.A. A simple technique for the establishment of nitrogenase in soybean callus culture. **Plant Physiology**, v. 53, p. 88-90, 1974.

CHONG, T.M. et al. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3397-3405, 2005.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, v. 23, p. 515-5129, 1988.

COLDER P. C. Dietary modification of inflammation with lipids. **Proceedings of the nutrition society**, v. 61, p. 345-358, 2002.

COLLIN, H. A.; EDWARDS, S. **Plant cell culture**. New York: Springer-Verlag, 1998. p. 158.

CONSTABEL F. Callus culture: induction and maintenance. In: VASIL, I.K., (Ed.). **Cell Culture and Somatic cell genetics of plants**. Academic Press, 1984. v. 1, p. 27-35.

CORDELL, G. A. biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.

CÔTE, F. et al. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexin synthesis in soybean. **Physiologia Plantarum**. v. 93, p. 401-410, 1995.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 5. ed. Rio de Janeiro: Bertrand, 1995.

DAVIS, S. R. et al. Phytoestrogens in health and disease. **Recent Progress in Hormones Research**, v. 54, p. 185-210, 1999.

DELPORTE, C. et al. Analgesic–anti-inflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 119–124, 2005.

DEQUAN, L.; GILBERT, M.G. **Nyctaginaceae**. Flora da China, v. 5, 2003. Disponível em: <http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10617>. Acesso em: 04 jul. 2011.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. p. 145-173.

DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. **Biotechnology advances**, v. 13, n. 3, p. 425-453, 1995.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; PAIVA, N.L. The isoflavonoid phytoalexin pathway: from enzymes to genes to transcription factors. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 385-392, 1995.

EBRAHIMZADEH, M. A.; MAHMOUDI, M.; SALIMI, E. Anti-inflammatory activity of *Sambucus ebulus* hexane extracts. **Fitoterapia**, v. 77, p. 146-148, 2006.

EDAHIRO, J.-I.; SEKI, M. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 8-13, 2006.

EDWARDS J. C.; SEDGWICKK A. D.; WILLOUGHBY D.A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous inject of air: an in vivo tissue culture system. **Journal of Pathol.** v. 134, p. 147-156, 1981.

FADEYI, M. O.; ADEOYE, A. O.; OLOWOKUDEJO, J.D. Epidermal and phytochemical studies in the genus *Boerhaavia* (Nyctaginaceae) in Nigeria. **International Journal of Crude Drug Research**. v. 27, n. 3, p. 178-184, 1989.

FAHY E. et al. Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1811: 637-647, 2011.

FAHY E. et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, **J. Lipid Res**, v. 50, n.9-14, 2009.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **J. Lipid Res**. v. 46, p. 839-861, 2005.

FANG N.; CASIDA, J. E. Anticancer action of cube insecticide: correlation for rotenoids constituents between inhibition of NaDH: ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities. **Proceeding of the National Academy Science**, v. 95, p. 3380-3384, 1998.

FARSAM H. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **J Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 443-447, 2000.

FERRARI, F.; MESSANA, I. SANT'ANA, A.E.G. Two new isoflavonoids from *Boerhaavia coccinea*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 597-598, 1991.

FIEHN O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1, p. 155-171, 2002.

FLORA OF ZIMBABWE. Disponível em:
<http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=122630>.
Acesso em: 16 nov. 2011.

FNA (Flora of North America). v.4, p.14-20. Disponível em:
<http://efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=104164>. Acesso em: 29 nov. 20011.

FORREITER, C.; KIRSCHNER, M.; NOVER, L. Stable transformation of an *Arabidopsis* Cell Suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity *in vivo*. **The Plant Cell**, v. 9, p. 2171-2181, 1997.

FUENTES, S. R. L. et al. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 60, p. 5-13, 2000.

FURLAN, A. **A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil**. São Paulo: IBB/ USP. 1996. 359f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 1996.

GABAY O. et al. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. 106-116, 2010.

GAITONDE, B. B.; KULKARNI, H. J.; NABAR, S. D. Diuretic activity of punarnava (*Boerhaavia diffusa*). **Bulletins of the Haffkine Institute**, v. 2, p. 24, 1974.

GE, L. et al. Identification of Kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography- tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 829, p. 26-36, 2005.

GE, L. et al. Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar eletrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 119-126, 2004.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exergetics, 1993. v. 1, 574 p.

GLOCKE, P. et al. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. 'Urrbrae Gem'. **In Vitro cellular developmental biology Plant**, v. 42, n. 2, p. 139-143, 2006.

GOOSSENS, A. et al. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cell. **Proceeding of the National Academy Science**, v. 100, n. 14, p. 8595-8600, 2003.

GOPI, C.; VATSALA, T. M. *In vitro* studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R. Br. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 12, p.1215-1219, 2006.

GRAHAM, T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, v. 95, p. 594-603, 1991.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRUPTA, D. A new C-methylflavone from *Boerhaavia diffusa*. **Indian J. Chem.**, v. 23, p. 682-4, 1984.

GUPTA, R.B.L. SINGH, S.; DALAY, Y. Effect of punarnava on the visual acuity and refractive erros. **Indian J. Med. Res.**, v. 50, n. 428-434, 1962.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G.; Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, M.D., USA: American Society of Plant Physiologists, 2000, p.1102-1145.

HARTMANN H. T., KESTER D.E., DAVIES JR. F.T.D., GENEVE R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall/Englewood Cliffs, 2002.

HARWOOD, J.L. Plant Lipid Metabolism. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. Academic Press, 1997. p. 237-272.

HE, R.; SANG, H.; YE, R.D. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. **Blood**, v. 101, n. 1572-1581, 2003.

HERRERA, A. G.. Psychotropic Microorganisms: Agar Plate Methods, Homogenization, and Dilutions. SPENCER, J. F. T.; RAGOUT, A. L. **Methods in Biotechnology: Food Microbiology Protocols**. Totowa: Humana Press Inc., 2001. v. 14, p.1-10.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.

HILOU, A.; NACOULMA, O. G.; GUIGUEMDE, T. R. *In vivo* antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, p. 236-240, 2006.

HIRUMA-LIMA C. A. et al. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 267-274, 2000.

HOSHINO, T. et al. Phytoalexin induction in Green pepper cell cultures treated with arachidonic acid. **Phytochemistry**. v. 36, n. 6, p. 1417-1419, 1994.

HUWILER A.; PFEILSCHIFTER J. Lipid as target for novel anti-inflammatory therapies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 124, p. 96-112, 2009.

IQBAL, H. SHER, Z., KHAN, Z.U. Medicinal plants from salt range Pind Dadan Khan, district Jhelum, Punjab, Pakistan. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 5, n. 11, p. 2157-2168, 2011.

ITO, C. et al. Cancer chemopreventive activity of rotenoids from *Derris trifoliata*. **Planta Medica**, v. 70, n. 6, p. 585-588, 2004.

JAIN, G. K.; KHANNA, N. M. Punarnavosídeo: a new antifibrinolytic agent from *Boerhaavia diffusa* Linn. **Indian Journal of Chemistry**, v. 28, p. 163-166, 1989.

JIAO J. et al. Optimization of triple quadrupole of trace degradants of pharmaceutical compounds. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 216, n. 2, p. 209-218, 2002.

JONES P. J. H.; RIDEOUT T. C. Plant Sterols: nutritional aspects. In: MOO-YOUNG, M. et al. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. v. 4, p. 535-542.

JUNG, W. et al. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 208-212, 2000.

KADOTA, S. et al. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. I. examination of sterols and structures of new rotenoids, boeravinones A and B. **Chem Pharm Bull**, v. 37, p. 3214-3220, 1989.

KADOTA, S. et al. Structure and NMR spectra of Boeravinone C, a new rotenoid analogue from *Boerhaavia diffusa* Linn. **Chem Pharm Bull**, v. 36, p. 2289-2292, 1988.

KALITA, M.C. et al. Tissue culture studies and *in vitro* clonal propagation of three (*Cardiospermum halicacabum* L., *Spilanthes acmella* L. and *Boerhaavia diffusa* L.) herbal ethnomedicinal plants of North-East India and establishment of the plantlets in a natural environment. In: GOVIL, J.N.; SINGH, V.K.; BHARDWAJ, R. (Ed.). **Phytomedicines**. Houston, USA: Studium Press LLC, 2007. p. 587-600.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 3, n. 13, p. 1222-1239, 2009.

KERBAUY, G. B. Competência e Determinação celular em Cultura de células e tecidos de plantas: Desdiferenciação celular *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de Tecidos *in vitro* e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1999. v. 2.

KESSMANN, H.; EDWARDS, R.; GENO, P.W.; DIXON, R.A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**. v. 94, p. 227-232, 1990.

KHANUJA, S. P. S. et al. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, p. 1-7, 1999.

KHARE, C. P. **Indian medicinal plant: an illustrated dictionary**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. 96p.

KLIEWER S. A. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptor α e γ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 94, p. 4318-4323, 1997.

KUMAR, M. et al. Ethnomedicinal uses of plants close to rural habitation in Garhwal Himalaia, India. **Journal of medicinal plants research**. v. 5, n. 11, p. 2252-2260, 2011.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher: the paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LAMI, N.; KADOTA, S.; KIKUCHI, T. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. IV. Isolation and structure determination of Boeravinones D, E and F. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39, p. 1863-1865, 1991.

LAMI, N. et al. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. II. Structure and stereochemistry of a new rotenoid, Boeravinone C. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, p. 1558-1562, 1990.

LAULE, O. et al. Cross-talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 6866-6871, 2003.

LINDSEY, K.; JONES, M. G. K. **Biotechnologia Vegetal agrícola**. Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia, 1992. cap 2., 276p.

LING, W.H.; JONES, P.J.H. Minireview dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. **Life Sciences**, v. 57, n. 3, p. 195-206, 1995.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.) **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. cap. 1, p. 3-34.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA, 2002. p.103-104.

LOURENÇO M. V. **Biotecnologia de Plantas Medicinais: Produção de Biomoléculas**. *Biológico*, São Paulo, v. 65, n.1, p. 63-65, 2003. Disponível em: <http://200.144.6.109/docs/bio/v65_1_2/lourenco.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2012.

LYSS, G. et al. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF- B. **Biol. Chem.**, v. 378, p. 951-961, 1997.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MARTINS, C. M. et al. Prospeção fitoquímica do arilo de sementes de maracujá amarelo e influência em germinação de sementes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1934-1940, 2010.

MATHIAS, L. et al. Isolation and structural elucidation of a novel rotenoid from the seeds of *Clitoria fairchildiana*. **The Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 4, p. 325-329, 2005.

McCALL, M.L.; KARBAN, R. Induced defense in *Nicotiana attenuate* (Solanaceae) fruit and flowers. **Oecologia**. v. 146, n. 4, p. 566-571, 2006.

MENCARELLI, A. et al. The plant sterol guggulsterone attenuates inflammation and immune dysfunction in murine models of inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacology**. v. 78, p. 1214-1223, 2009.

MENDÉZ, I. E. C.; MARTÍNEZ, R. R.; GONZÁLEZ, A. D. *Boerhaavia* spp. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 6, n. 2, p. 67-72, 2001.

MESSANA, I.; FERRARI, F.; SANT'ANA, A. E. G. Two 12a-hydroxyrotenoids from *Boerhaavia coccinea*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2688, 1986.

MICALLEF M. A.; GARG M. L. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. **Atherosclerosis**, v. 204, p. 476-482, 2009a.

MICALLEF M. A.; GARG M. L. Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia. **J Nutr Biochemistry**, v. 20, p.927-939, 2009b.

MIRALLES J. et al. Chemotaxonomy in Nyctagynaceae family: sterols and fatty acids from the leaves of three *Boerhaavia* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 5, p. 475-478, 1988.

MISRA, A. N.; TIWARI, H. P. Constituents of roots of *Boerhaavia diffusa*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 3318-3319, 1971.

MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B. B. Callus culture and plantlet production in *Carica papaya* (Var. Honey Dew). **Plant Cell Reports**, v.13, p.390-393, 1994.

MULABAGAL, V.; TSAY, H. S. Plant Cell Cultures: an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 2, n. 1, p. 29-48, 2004.

MÜLLER, M.S. Técnicas da biotecnologia vegetal e a investigação da atividade antifúngica aplicadas a metabólitos produzidos por *Boerhavia paniculata* Rich. Belém, 2010. 121f. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Pará, Pará, 2010.

MUNGANTIWAR, A. A. et al. Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction. **Journal Ethnopharmacology**, v. 65, p. 125-131, 1999.

MUNGANTIWAR, A. A. et al. Effect of stress on plasma and adrenal cortisol levels and immune responsiveness in rats: modulation by alkaloidal fraction of *Boerhaavia diffusa*. **Fitoterapia**, v. 68, p. 498-500, 1997.

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

MUZILA, M. *Boerhavia diffusa* L. [Internet] Record from Protabase. Schmelzer, G.H.; Gurib-Fakim, A. (Ed.). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa /

Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. 2006. Disponível em: < <http://database.prota.org/search.htm> >. Acesso em: 4 Jul. 2011.

NADKARNI, A.K. **Indian Materia Medica**. Bombay, India: Popular Prakashan Pvt.Ltd., 1976. v.1, p. 203-205.

NAGAMORI, E. et al. Enhancement of anthocyanin production from grape (*Vitis vinifera*) callus in a viscous additive-supplemented medium. **Biochemical Engineer Journal**, v. 9, p. 59-65, 2001.

NALAMOLU, R.K.; BOINI, K.M.; NAMMI, S. Effect of chronic administration of *Boerhaavia diffusa* Linn. leaf extract on experimental diabetes in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 1, p. 305-309, 2004.

NAVARRO, A.; DE LAS HERAS, B.; VILLAR, A. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* **Clem. Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 5, p. 470-473, 2001.

NAYAK, P.; SEN, S.K. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of a minor millet, *Paspalum scrobiculatum*. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 296-299, 1989.

NEHRA, N. S. et al. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 6, p. 701-717, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NICOLAOU A. Prostanoids. In: NICOLAOU A., KOKOTOS G. **Bioactive lipids**. Bridgwater, England: The Oily Press, 2004. v. 17, cap. 8, p. 197-222.

NÜRNBERGER, T. Signal perception in plant pathogen defense. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 55, n.167-182, 1999.

O'HARA, J. F.; STREET, H. E. Wheat callus culture: the initiation, growth and organogenesis of callus derived from various explant sources. **Annals of Botany**, v. 42, p.1029-1978, 1978.

OLALEYE, M.Y. et al. Antioxidant activity and hepatoprotective property of leaf extract of *Boerhaavia diffusa* Linn against acetaminophen-induced liver damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2200-2205, 2010.

OLIVA, K. M. F. Atividade alelopática de extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre a germinação, crescimento e aspectos bioquímicos e fisiológicos em *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*. 2006. 62 fls. **Tese** (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

OLIVEIRA M. C; SIMÕES K; BRAGA M. R. Substâncias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 3, p. 509-519, 2009.

OLUKOYA, D.K.; TDIKA, N.; ODUGBEMI, T. Antibacterial activity of some medicinal plants from Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 69-72, 1993.

ORESIC, M.; HÄNNINEN, V. A.; VIDAL-PUIG, A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers, **Trends Biotechnol**, v. 26, p. 647–652, 2008.

OSTLUND, R.E. Jr. Phytosterols in human nutrition. **Annu Rev Nutr**, v. 22, p. 533-549, 2002.

PAIVA NETO, V. B.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, v. 97, p. 193–202, 2003.

PANDA S.; JAFRI M.; KARA. A.; MEHETA B.K. . Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 123-126, 2009.

PANTHONG A. et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids. **Phytomedicine**, v. 1, n. 2, p. 141-144, 1994.

PARI, L.; SATHEESH, M.A. Antidiabetic activity of *Boerhaavia diffusa* L.: effect on hepatic key enzymes in experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 109-113, 2004a.

PARI, L.; SATHEESH, M. A. Antidiabetic effect of *Boerhaavia diffusa*: effect on serum and tissue lipids in experimental diabetes. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 4, p. 472-476, 2004b.

PASSOS, J. L. et al. Effects of *Corynespora cassiicola* on *Lantana camara*. **Planta daninha**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 229-237, 2010.

PATCH C.S. et al. Plant sterols as dietary adjuvants in the reduction of cardiovascular risk: theory and evidence. **Vasc Health Risk Manag**, v. 2, n. 2, p. 157-162, 2006.

PAXTON, J. D. Biosynthesis and accumulation of legume phytoalexins. In: SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D. K. (Ed.). **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 485-499.

PEIXE, A. et al. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. **Scientia Horticulturae**. v. 113, p. 1-7, 2007.

PELZER, E.I. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PEREIRA D.M. et al. *Boerhaavia diffusa*: Metabolite profiling of a medicinal plant from Nyctaginaceae. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 2142-2149, 2009.

PERERA, P. I. P. et al. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 21-28, 2007.

PETERSEN, K. K.; HANSEN, J.; KROGSTRUP, P. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda "giganteus". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 58, p.189-197, 1999.

PICHERSKY, E.; GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends In Plant Science**, v. 5, n. 10, p. 439-445, 2000.

PIERIK, R. L. M. **In Vitro Culture of Higher Plants**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997.

POSSAMAI, R.M. Levantamento etnobotânico das plantas de uso medicinal em Mariana Pimentel, Porto Alegre, RS. 2000.108 fl. **Dissertação** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2000.

PRAGER N. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to determine the effectiveness of botanically derived inhibitors of 5- α -reductase in the treatment of androgenetic alopecia. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 8, n. 2, p. 143–152, 2002.

PRASHANTH, D.; PADMAJA, R.; SAMIULLA, D.S. Effect of certain plant extracts on α -amylase activity. **Fitoterapia**, v. 72, p. 179-181, 2001.

RAIN-TREE. Tropical plant database. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/ervatostao.htm/>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant Cell Cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.

RAVANEL, P.; TISSUT, M.; DOUCE, R. Effects of rotenoids on isolated plant mitochondria. **Plant Physiology**, v. 75, p. 414-420, 1984.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of Plants**. 6. ed. New York: W.H.Freeman and Company, 1999.

RECIO, M.C. et al. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural terpenoids. **Planta Med.**, v. 61, p. 182-185, 1995.

RIBEIRO, R.A. et al. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**. v. 73, p. 472-477, 1991.

ROIG, J. T. **Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba**. 2. ed. Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988. p. 883-884.

ROWNAQ, A.; HOSSAIN, M. S. *In vitro* direct and indirect plantlets regeneration from nodal segment of *Boerhaavia ripens* L. **Int. J. Sustain. Crop Prod.** v. 5, n. 4, p. 5-10, 2010.

ROY, P.K. Rapid multiplication of *Boerhaavia diffusa* L. through *in vitro* culture of shoot tip and nodal explants. **Plant tissue culture Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 49-56, 2008.

SÁ, C.F.C. **Nyctaginaceae**. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB025888>>. Acesso em: 12 dez. 2010.

SAIMARU, H. et al. Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 784-788, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S.; RAJA, D. P. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 235-240, 1999.

SANTOS, A. S.; CAETANO, L. C.; SANT'ANA, A. E. G. A 12a-hydroxyrotenoid from roots of *Boerhaavia coccinea*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 255-258, 1998.

SANTOS, A. S. et al. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 538-541, 2007.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ UFSC, 2000.

SCHINOR, E.C. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 145-149, 2007.

SENGUPTA, C.; RAGHAVAN, V. Somatic embryogenesis in carrot cell suspension. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, p.247-258, 1980.

SEVERI, J. A. Uso sustentável da Biodiversidade brasileira prospecção químico-farmacológica de plantas superiores: *Guapira noxia* (Nyctaginaceae). Araraquara, 2007, 89 f. **Dissertação** (Mestrado) – UNESP, Araraquara, São Paulo, 2007.

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. 247-255, 2006.

SHAH, G.L.; YADAV, S.S.; BADINATH, V. Medicinal plants from Dahana Forest. **J. Eco. Taxon. Bot.**, v. 4, p. 141. 1983.

SHEIN, I.V. et al. Accumulation of phenolic compounds in conifer callus cultures in response to wood blue-stain fungi. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 48, n. 2, p. 216-221, 2001.

SIMÕES, K. et al. Purification and characterization of a Phytoalexin elicitor from spores of the saprobe *Mucor ramosissimus*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 735-744, 2005.

SINGH, M.P.; DEY, S. **Indian Medicinal Plants**. Delhi: Satish Serial Publ. House, 2005.

SMITH, A. D (Ed.). **Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford: Oxford University Press, 2000.

SMITH, C. J. T. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. **New Phytologist.**, v. 132, p. 1-45, 1996.

SOUZA J. M. M. et al. Callus sieving is effective in improving synchronization and frequency of somatic embryogenesis in *Citrus sienensis*. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 4, p. 703-307, 2011.

SPARG S. G.; LIGHT M. E.; Van STADEN J. Biological activities and distribution of plant saponins. **J. Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219-243, 2004.

SU, X.; MEI, X.; GONG, W. Study of paclitaxel production from an antifungal variant of *Taxus* callus. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 68, p. 215-223, 2002.

SUDARSHANA, M. S.; NIRANJAN, M. H.; GIRISHA, S. T. *In vitro* flowering, somatic embryogenesis and regeneration in *Boerhaavia diffusa* Linn. - A medicinal plant. **Global Journal of Biotechnology Biochemistry**, v. 3, n. 2, p. 83-86, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Trad. de E. R. Santarém et al. Porto Alegre: Artmed, 2009, 848p.

TAO X, MA L., LIPSKY P.E. Suppression of carrageenan-induced inflammatory *in vivo* by extract of Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F. **Inflam. Res**, v. 48, p. 139-148, 1999.

TAYLOR, L. **The healing power of rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinal**. USA: Square One publishers, 2005. 535 p.

TAYLOR, N.J. et al. development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v.14, p.726-730, 1996.

THOMAS, T. D.; MASEENA, E. A. Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant. **Scientia Horticulturae**. v. 108, p. 332-336, 2006.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J Clin Invest**, v. 108, p. 15-23, 2001.

TREVIZAM, R. et al. Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 215-222, 2011.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 482-488, 1998.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em <<http://www.tropicos.org/Name/22500021/>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

UMLAUF, D. et al. Biosynthesis of irregular monoterpene artemisia ketone, the sesquiterpene germacrene D and other isoprenoids in *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2463-2470, 2004.

VAN RUTH S. et al. Evaluation of three gas chromatography and two direct mass spectrometry techniques for aroma of dried red bell peppers. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 223-224, p. 55-65, 2003.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, p. 861-875, 2007.

VERMA, H.N.; AWASTHI, L.P. Antiviral activity of *Boerhaavia diffusa* root extract and physical properties of virus inhibitor. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 926-932, 1979.

VERPOORTE R.; KIM H. K.; CHOI Y. H. Plants as source of medicines. In: BOGERS R.J, CRAKER L. E., LANGE D. (Ed.). **Medicinal and Aromatic Plants**. Netherlands: Springer, 2006. p. 261-273.

VERPOORTE, R.; COLLIN, A; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolite. **Biochem. Rev**, v. 1, p. 13-25, 2002.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 181-187, 2002.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v. 9, p. 323-343, 2000.

VERPOORTE, R. et al. Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 4, p. 3-20, 1998.

VIJAYA SREE, N. et al. Advancements in the production of Secondary Metabolites. **Journal of Natural Products**, v. 3, p. 112-123, 2010.

VOM ENDT, D.; KIJNE, J. W.; MEMELINK, J. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? **Phytochemistry**, v. 61, p. 107-114, 2002.

WALLACE, J.L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: The second hundred years, **Gastroenterology**, v. 112, p. 1000-1016, 1997.

WANG, D. et al. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of four alkaloids isolated from Bulbus of *Fritillaria wabuensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 189-193, 2012.

WANG, M.; HA, Y. An electrochemical approach to monitor pH change in agar media during plant tissue culture. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2718–2723, 2007.

WANGENSTEEN, H. et al. Rotenoids and isoflavones from *Sarcolobus globosus*. **Planta Medica**, v. 71, n. 8, p. 754-758, 2005.

WATSON A. D. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems, **J Lipid Res**, v. 47, p. 2101–2111, 2006.

WENK M. R. Lipidomics: new tools and applications. **Cell**, v. 143, n. 10, p. 888-895, 2010.

YENESEW, A. et al. Two unusual rotenoids derivatives, 7a-O-methyl-12-hydroxydeguelol and spiro-13-homo-13-oxaelliptone, from the seeds of *Derris trifoliata*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 988-991, 2006.

YU, O. et al. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. **Plant Physiology**, v. 124, p. 781-793, 2000.

ZACCAI, M. et al. Regeneration and transformation system in *Mirabilis jalapa*. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 304-309, 2007.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitors signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. v. 23, p. 283-333, 2005.

ZHONG, J.-J. Plant Secondary metabolites. In: Young, M. M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**, 2. ed. Pergamon, 2011. v. 3, p. 299-308.

ZHOU W., NGUYEN H. T., NES W. D. Plant sterol methyltransferases: phytosterolomic analysis, enzymology, and bioengineering strategies. In: BOHNERT, H. J.; NGUYEN, H.; LEWIS, N.G. **Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways**. Elsevier, 2008. v. 1, cap. 9, p. 241-281.

ZHOU, W.; NES, W. D. Stereochemistry of hydrogen introduction at C-25 in ergosterol synthesized by the mevalonate-independent pathway. **Tetrahedron Lett**, v. 41, p. 2791–2795, 2000.