

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

OBTENÇÃO DE CALOS DE *Duroia saccifera* Hook. F.
(Rubiaceae), ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
SEUS EXTRATOS

JULIO CEZAR DE SOUZA

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JULIO CEZAR DE SOUZA

OBTENÇÃO DE CALOS DE *Duroia saccifera* Hook. F.
(Rubiaceae), ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
SEUS EXTRATOS

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez

MANAUS

2016

Ficha Catalográfica

S729o Souza, Julio Cezar de
Obtenção de calos de *Duroia saccifera* Hook. F. (Rubiaceae),
estudo químico e avaliação biológica dos seus extratos / Julio
Cezar de Souza. 2016
80 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez
Coorientador: Gilmar Roberto Zafarri
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. *Duroia saccifera*. 2. Antiofídico. 3. Antimicrobiano. 4.
Micropropagação. 5. Calo. I. nunez, Cecilia Veronica II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

OBTENÇÃO DE CALOS DE *Duroia saccifera* Hook. F.
(Rubiaceae), ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
SEUS EXTRATOS

JULIO CEZAR DE SOUZA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Maria Cristina dos Santos
(Orientadora)

Dr. João Vicente Braga de Souza

Dra. Eva Maria Alves Cavalcante Atroch

Dra. Daiane Martins

Dra. Cecilia Veronica Nunez (Orientadora)

Manaus, 26 de agosto de 2016.

DEDICATÓRIA

Para minha mãe, com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de fazer uma homenagem para minha mãe, Neli, que sempre me incentivou a buscar meus sonhos, e infelizmente não pôde estar aqui para ver o final desta jornada. Ao meu pai, Valmor, que foi a pessoa responsável por tudo que sou hoje, pois além de me apoiar por toda minha vida, ainda foi o responsável por me iniciar nos caminhos da ciência. Sem ele não teria conhecido minha verdadeira vocação. Ao meu irmão e minha cunhada por todo o apoio e pelos dois sobrinhos lindos. Aos meus sogros, Rose e Dirceu, pelo incentivo por todos esses anos.

Um agradecimento especial para minha orientadora, Dra. Cecília Verônica Nunez, que há sete anos atrás acreditou no sonho de um jovem que apareceu em sua sala com uma ideia maluca de juntar cultura de tecidos com fitoquímica. A você, meu muito obrigado por ter acreditado em mim.

Para todos os amigos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia – LABB, meu muito obrigado pela convivência e pelas experiências trocadas.

Gostaria de agradecer também a Prof^a. Dra. Maria Cristina dos Santos e a doutoranda Valéria Mourão por toda a assistência recebida no Laboratório de Imunoquímica da UFAM. Também gostaria de agradecer a Dra. Marne de Carvalho Vasconcelos e a doutoranda Patrícia Danielle Oliveira de Almeida pela recepção no Laboratório de Atividade Biológica II (BIOPHAR II) da UFAM.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado. E por fim, gostaria de agradecer a minha querida esposa, Maria Carolina, pois ela esteve em todos os momentos dessa caminhada, sempre me incentivando, me apoiando e fazendo todo o possível para que eu tivesse condições de chegar ao final, para você todo meu amor.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, ao CNPq e a FAPEAM pelo apoio financeiro. A todos os professores do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos. Ao INPA pela estrutura cedida para a execução deste projeto.

RESUMO

As plantas possuem um grande potencial biossintético, porém, o percentual deste potencial utilizado atualmente é apenas uma fração do que as plantas podem nos oferecer. A procura por novas fontes de produtos naturais e fármacos oriundos de plantas tem se expandido, principalmente sobre aqueles com acentuado potencial terapêutico já comprovado. A família Rubiaceae é talvez a família de plantas mais estudada na área de produtos naturais, pois já foram identificados diversos metabólitos secundários com atividade biológica comprovada. O gênero *Duroia* que pertence a família Rubiaceae possui 30 espécies, de onde já foram identificadas substâncias como flavonoides, iridoides, terpenos, compostos aromáticos e alcaloides. Porém, todas estas substâncias foram identificadas em apenas duas espécies do gênero, o que mostra a importância de estudos com outras espécies. A espécie *Duroia saccifera* foi escolhida como objeto deste estudo por abordagem quimiotaxonômica. A finalidade do estudo foi a indução e multiplicação de calos *in vitro*, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica dos extratos como antibacteriano, antifúngico e antitumoral. A espécie *Duroia saccifera* foi estabelecida *in vitro* a partir de sementes coletadas na reserva Adolfo Ducke, no município de Manaus – AM. As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS com a adição de GA₃ e após 90 dias de cultivo 50% das sementes haviam germinado. As folhas das plântulas obtidas da germinação *in vitro* foram inoculadas em meio MS com a adição de diferentes reguladores de crescimento para a indução de calo. Ao final de 30 dias de cultivo, foi observado que 80% das folhas desenvolveram calo quando inoculados em meio MS com a presença de 2,4-D e KIN. Foram obtidos três extratos a partir dos calos: extrato hexano, extrato acetato de etila e extrato metanol. O extrato hexano quando analisado em ressonância magnética nuclear apresentou picos que indicam a presença de terpenos e esteroides. Quanto as atividades biológicas, o extrato hexano teve uma atividade significativa na inibição da fosfolipase A₂ do veneno de *Bothrops atrox*. Com relação a atividade antitumoral, o extrato hexano demonstrou atividade em menor concentração frente a linhagem tumoral adenocarcinoma de mama (MCF-7).

PALAVRAS-CHAVE: *Duroia saccifera*; Calo; Antitumoral; Antimicrobiano; Antifúngico; Micropropagação

ABSTRACT

Plants have a great biosynthetic potential, however, the percentage currently used is only a fraction of what plants can offer. The search for new sources of natural products and drugs derived from plants has expanded, especially on those with great therapeutic potential proven. The *Rubiaceae* family is perhaps the most studied plant family in the area of natural products, as several secondary metabolites have been identified with proven biological activity. The *Duroia* genre that belongs to Rubiaceae family has 30 species of which have been identified substances such as flavonoids, iridoids, terpenes, aromatic compounds and alkaloids. However all these substances were identified in only two species of the genus, which shows the importance of studies with other species. The *Duroia saccifera* was chosen as the object of this study by chemotaxonomic approach. The aim of the study was the induction and proliferation of *callus in vitro*, phytochemical study and evaluation of the biological activity of the extracts as an antibacterial, and antitumor antiophidic. The specie *Duroia Saccifera* was established *in vitro* from seeds collected in the reserve Adolfo Ducke in the city of Manaus - AM. The seeds were inoculated onto MS culture medium with the addition of GA₃ and after 90 days of cultivation 50% of the seeds had germinated. The leaves of the seedlings obtained *in vitro* germination were inoculated onto MS medium with the addition of different growth regulators for callus induction. After 30 days of cultivation, it was observed that 80% of the leaves developed callus when inoculated on MS medium in the presence of 2,4-D and KIN. three callus extracts were performed: hexane extract, ethyl acetate extract and methanol extract. The hexane extracts when analyzed by nuclear magnetic resonance showed peaks indicating the presence of terpenes and steroids. As for biological activities, hexane extract had a significant activity in inhibiting phospholipase A₂ *Bothrops atrox* venom. Regarding the antitumor activity, the hexane extract showed activity in lower concentrations against tumor type breast adenocarcinoma (MCF-7).

KEYWORDS: *Duroia saccifera*; Callus; Antitumor; Antimicrobial; antiophidic; Micropropagation;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Explantes retirados de folha e de segmento nodal de andiroba (<i>Carapa guianensis</i>). Imagem: Souza, J. C.	13
Figura 2 - Fases do estabelecimento da cultura de calos, em explante foliar de andiroba (<i>Carapa guianensis</i>). 1 – Indução; 2 – Divisão; 3 – Desdiferenciação. Imagens: Souza, J. C.	17
Figura 3 - Estrutura química de algumas substâncias isoladas de Rubiaceae	21
Figura 4 - A – espécime de <i>Duroia saccifera</i> ; B – Detalhe de um ramo; C – Detalhe do tamanho de uma folha; D – Detalhe de uma domácea; E – Detalhe do tamanho de uma domácea. Fonte: Souza, J.C.	23
Figura 5 - Distribuição geográfica da espécie <i>Duroia saccifera</i> . Fonte GBIF.	24
Figura 6 - Imagens de <i>B. atrox</i> . Fonte: FRAGA et al., 2013.	25
Figura 7 - Fluxograma geral da preparação dos extratos	34
Figura 8 - Germinação das sementes de <i>Duroia saccifera</i> ao longo de 90 dias; A: semente inoculada no meio de cultura MS; B: Início da germinação após 30 dias; C: Plântula formada aos 90 dias de cultivo.	46
Figura 9 - Indução de calos em tecido foliar de <i>Duroia saccifera</i> ; A- início da formação de calo; B- 50% da folha coberta de calo; C- 100% da folha coberta de calo. Fotos: Souza, J.C.	46
Figura 10 - Aspecto dos calos após 30 dias de cultivo em meio de multiplicação. Fotos: Souza, J.C.	49
Figura 11 - Revelação das placas cromatográficas do extrato hexano dos calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia saccifera</i> : A- Luz ultravioleta 254 nm; B- Luz ultravioleta 365 nm; C- iodo; D- Sulfato cérico.	51
Figura 12 - Revelação das placas cromatográficas do extrato acetato de etila dos calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia saccifera</i> : A- Luz ultravioleta 254 nm; B- Luz ultravioleta 365 nm; C- iodo; D- Sulfato cérico.	51
Figura 13 - Revelação das placas cromatográficas do extrato metanólico. Revelador: anisaldeído sulfúrico; A - clorofórmio/MeOH/H ₂ O 70:30:4; B - clorofórmio/MeOH/H ₂ O 5:5:1; C - clorofórmio/ácido acético/MeOH/H ₂ O 60:32:12:8; D - clorofórmio/ácido acético/MeOH/H ₂ O 50:40:12:10.	52
Figura 14 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato hexânico (300 MHz, CDCl ₃) dos calos de <i>Duroia saccifera</i>	53
Figura 15 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato acetato de etila (300 MHz, CDCl ₃) dos calos de <i>Duroia saccifera</i>	55
Figura 16 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato metanólico (300 MHz, CDCl ₃) dos calos de <i>Duroia saccifera</i>	57
Figura 17 - Espectro de RMN de ¹ H da fração HEXF1 29-37 (300 MHz, CDCl ₃) dos calos de <i>Duroia saccifera</i>	58
Figura 18 - Espectro de RMN de ¹ H da fração HEXF4-5 4 (300 MHz, CDCl ₃)	60
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹ H da fração HEXF4-5 5-6 (300 MHz, CDCl ₃)	61
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H da fração HEXF6-7 19-20 (300 MHz, CDCl ₃)	63
Figura 21 - Potencial de bloqueio dos extratos de <i>Duroia saccifera</i> frente à atividade fosfolipásica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> , protocolo de pré-incubação nas proporções de 1:10 e 1:20 veneno:extratos (m:m). *p<0,005	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultura segundo Murashigue & Skoog, 1962, (meio MS)	30
Tabela 2 - Meio MS com adição ou não de diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento para a fase de indução de calo de <i>Duroia saccifera</i> . (N=20)	31
Tabela 3 - Meio MS com 2,4D e KIN combinados com variação de concentração para a fase de multiplicação de calos em <i>Duroia saccifera</i> . (N=20).....	32
Tabela 4 - Sistema de eluição do fracionamento do extrato hexânico de <i>Duroia saccifera</i>	35
Tabela 5 - Massa das frações reunidas do fracionamento do extrato hexânico.....	35
Tabela 6 - Sistema de eluição do fracionamento da fração HEXF1	36
Tabela 7 - Massa das frações reunidas do fracionamento da fração HEXF1.....	36
Tabela 8 - Massa das frações reunidas do fracionamento da fração HEXF1.....	37
Tabela 9 - Sistema de eluição do fracionamento da fração HEXF2	37
Tabela 10 - Massa das frações reunidas do fracionamento da fração HEXF2.....	38
Tabela 11 - Sistema de eluição do fracionamento da fração HEXF4-5.....	38
Tabela 12 - Massa das frações do fracionamento da fração 4-5.....	39
Tabela 13 - Sistema de eluição do fracionamento da fração 6-7	39
Tabela 14 - Massa das frações do fracionamento da fração 6-7.....	40
Tabela 15 - Sistema de eluição do fracionamento do extrato acetato de etila de <i>Duroia saccifera</i>	40
Tabela 16 - Massa das frações reunidas do fracionamento do extrato acetato de etila.	41
Tabela 17 - Meio MS com adição ou não de diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento para a fase de indução de calo de <i>Duroia saccifera</i> . (N=20)	47
Tabela 18 - Efeito de reguladores de crescimento 2,4-D e KIN combinados, sobre a multiplicação de massa celular indiferenciada de <i>Duroia saccifera</i> durante 30 dias de cultivo (N=20).	48
Tabela 19 - Massa resultante rendimento da extração dos calos de <i>Duroia saccifera</i>	50
Tabela 20 - Resultado do ensaio de halo de inibição de microrganismos.....	66
Tabela 21 - Potencial antibacteriano do extrato hexânico sobre diferentes microrganismos (CIM)	68
Tabela 22 - Efeito de CI ₅₀ dos extratos acetato de etila, metanol e hexano em células tumorais e uma linhagem normal.....	69

1 SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Produção de Metabólitos Secundários Por Meio da Cultura de Tecidos Vegetais	13
1.2	Totipotência celular.....	14
1.3	Meios de Cultura e Reguladores de Crescimento	15
1.4	Produção de calos.....	16
1.5	Produção de Metabólitos Secundários <i>in vitro</i>	18
1.6	Metabólitos Secundários de <i>Duroia</i>	21
1.7	Atividades Biológicas dos Metabólitos Secundários	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo Geral:.....	28
2.2	Objetivos Específicos	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Material Vegetal	29
3.2	Meios de Cultura e Condições de Cultivo.....	29
3.3	Cultura de Tecidos Vegetais	29
3.3.1	Germinação	29
3.3.2	Indução dos Calos	30
3.3.3	Multiplicação dos Calos	31
3.4	Fitoquímica	32
3.4.1	Extração dos Calos.....	32
3.4.2	Análise cromatográfica dos extratos.....	33
3.4.3	Ressonância Magnética Nuclear.....	33
3.4.4	Fracionamento dos Extratos.....	34
3.5	Ensaio biológico.....	42
3.5.1	Atividade bloqueadora de PA ₂ do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	42
3.5.2	Atividade antimicrobiana	42
3.5.3	Atividade Citotóxica.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Germinação	45
4.2	Indução de Calo	46
4.3	Multiplicação dos Calos	47
4.4	Extração dos Calos.....	49
4.5	Análise em Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC) Dos Extratos Brutos	50
4.6	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	52

4.6.1	Ressonância Magnética Nuclear do extrato hexânico	52
4.6.2	Ressonância Magnética Nuclear do extrato acetato de etila.....	54
4.6.3	Ressonância Magnética Nuclear do extrato metanólico.....	56
4.6.4	Ressonância Magnética Nuclear da Fração HEXF1 29-37.....	56
4.6.5	Ressonância Magnética Nuclear da Fração HEXF4-5 4.....	59
4.6.6	Ressonância Magnética Nuclear da Fração HEXF4-5 5-6	59
4.6.7	Ressonância Magnética Nuclear da Fração HEXF6-7 19-20	62
4.7	Atividades Biológicas:.....	64
4.7.1	Atividade Fosfolipásica	64
4.7.2	Atividade Antimicrobiana	65
4.7.3	Atividades Citotóxica em Células Tumorais e não-tumorais	68
5	CONCLUSÕES	71
6	REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é uma técnica na qual, em condições assépticas, células, órgãos, tecidos ou mesmo planta inteira, podem ser mantidos em cultivo em laboratório sob condições controladas de fatores ambientais e nutricionais. Estas condições incluem a oferta adequada de nutrientes, pH, temperatura, fotoperíodo e fonte de carbono (MORAIS et al., 2012).

Pequenos pedaços de tecido vegetal denominados explantes (fig.1) podem ser retirados de uma planta matriz e utilizados para produzir milhares de novas plantas num processo contínuo, em um período de tempo relativamente curto (AKIN – IDOWU, 2009).

Esta técnica de cultivo vegetal tem sido amplamente estudada desde o início do século 20, com a finalidade de compreender rotas metabólicas primárias e secundárias, além de auxiliar estudos relacionados a morfogênese vegetal. No entanto, os potenciais medicinais e nutracêuticos de plantas oriundas da cultura de tecidos vegetais vêm sendo mais profundamente estudados nos últimos 50 anos (DAVIES, DEROLE, 2014; DIAS et al., 2016).



Figura 1 - Explantes retirados de folha e de segmento nodal de andiroba (*Carapa guianensis*). Imagem: Souza, J. C.

1.1 Produção de Metabólitos Secundários Por Meio da Cultura de Tecidos Vegetais

Recentemente, a biotecnologia vegetal vem se tornando importante para as indústrias farmacêutica e de produtos naturais, pois meio da propagação vegetativa *in vitro*, permite a eliminação de doenças e o melhoramento genético das plantas, levando à produção de microplantas

e/ou biomassa vegetal de excelente qualidade fitossanitária e genética – em curto espaço de tempo e reduzida área física, o que é de extrema importância na produção de metabólitos secundários.

Com a crescente demanda por produtos de origem natural, contrapondo-se à perda de populações vegetais, da diversidade genética e à degradação do meio ambiente e extinção de espécies, a cultura de tecidos e células vegetais *in vitro* surgiu como uma ferramenta para a produção em larga escala de biomassa vegetal, para diversificados fins (ROBERTO e FRANCESCA, 2011).

Para Nunes e colaboradores (2013), a principal motivação para a adoção do cultivo de plantas *in vitro* no setor florestal brasileiro, tem sido a pesquisa com a finalidade de aumentar a produção sustentável de madeira e produtos florestais não-madeireiros, incluindo a caracterização genética, manipulação e melhoramento de espécies florestais nativas do Brasil. Segundo os mesmos autores, essências aromáticas, frutas e óleos da Amazônia, utilizados como matérias-primas pelas indústrias químicas de cosméticos, produtos farmacêuticos, inseticidas e fungicidas provenientes de espécies amazônicas podem ser consideradas fontes renováveis de ativos biológicos.

Sendo assim, essa tecnologia deve ser aprimorada constantemente para que seja capaz de suprir a demanda, e sua exploração deve ser feita em uma base sustentável, pois espécies como *Aniba rosaeodora* (pau-rosa) e *Dicypellium caryophyllaceum* (pau-cravo) se encontram na lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção devido ao seu uso indiscriminado (NUNES et al., 2013; MURTHY et al., 2015).

1.2 Totipotência celular

A técnica de cultura de tecidos é baseada no conceito de totipotência celular, que é caracterizada como “a capacidade de uma célula vegetal, viva, nucleada, com sistema laminar intacto e já diferenciada, de ser induzida a voltar ao estado meristemático, podendo redefinir seu padrão de diferenciação celular, podendo desenvolver novos órgãos e até mesmo indivíduos inteiros” (TERMIGNONE, 2005).

Todo tecido vegetal que possui células vivas e nucleadas é totipotente e, por assim dizer, pode vir a desenvolver crescimento e/ou diferenciação celular induzida pelo meio. Após uma sinalização correta ao tecido do explante, as células estabelecem um processo contínuo de mitose (AITCHINSON et al., 1977). Juntamente com a totipotência, a capacidade das células para alterar o seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento também é igualmente fundamental.

1.3 Meios de Cultura e Reguladores de Crescimento

Para que o potencial da totipotência seja expresso na sua totalidade, é necessário fornecer ao explante as condições nutricionais e a devida sinalização hormonal. É normalmente utilizado como base, o meio de cultura desenvolvido por Murashige e Skoog, em 1962, (meio MS) composto de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, ferro, EDTA entre outros compostos orgânicos, fonte de carbono e a presença ou não de um agente geleificante (para meios sólidos ou semi-sólidos).

O pH do meio também é importante, pois afeta a absorção dos nutrientes e reguladores de crescimento presentes no meio de cultura. Murashige e Skoog (1962) recomendam o ajuste do pH entre 5.7 e 5.8, porém algumas espécies como as bromeliáceas podem ter ajuste de pH entre 6.5 a 7.

Com o passar do tempo, suplementações e alterações nos componentes foram feitas e novos meios foram surgindo para se adequar ao metabolismo de diversas espécies vegetais. A manipulação da formulação dos meios de cultura, assim como, das fontes de sacarose, combinações e concentrações de reguladores de crescimento, naturais e/ou sintéticos, além do uso de diversos agentes físicos ou químicos como elicitores, têm sido utilizados para mudanças morfogênicas e acúmulo de metabólitos de interesse (NAMDEO, 2007).

As composições do meio de cultura, especialmente dos reguladores de crescimento, têm efeitos profundos sobre a resposta do explante nas diferentes fases do cultivo *in vitro*. Os reguladores de crescimento são responsáveis pela determinação do desenvolvimento de células, tecidos ou plantas em meio de cultura.

Reguladores de crescimento são um grupo de moléculas de ocorrência natural nos tecidos vegetais e seus análogos sintéticos, que possuem ação de sinalizadores, influenciando os diferentes estágios do desenvolvimento da planta. Para a cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*, a utilização de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura é necessária para garantir que o objetivo do estudo seja alcançado (TAIZ & ZEIGER, 2013).

As auxinas e citocininas são as duas classes de reguladores de crescimento mais utilizadas. A concentração e combinação dos diferentes tipos de auxinas e citocininas para suplementar o meio de cultura, dependem principalmente da espécie da planta, do tipo de tecido ou órgão e do objetivo da pesquisa.

As auxinas possuem diversas funções no desenvolvimento vegetal na natureza, entre as quais, o alongamento do caule, dominância apical e o enraizamento, e são amplamente utilizadas nas culturas de células e tecidos por induzir a divisão celular. Na planta, as auxinas são produzidas nas

regiões de crescimento celular localizadas nos ápices dos ramos e, em menor quantidade, das raízes, e seu transporte ocorre do topo da planta em direção à base.

Já, as citocininas estão envolvidas em processos de divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea e são utilizadas nas culturas *in vitro* para a regeneração das plantas ou indução de novos ramos. Na planta, a síntese das citocininas ocorre nas raízes e seu transporte é feito da base em direção às partes aéreas (HARTMANN et al., 1988; NARAYANASWAMY, 2004; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Estes dois reguladores são, portanto, produzidos em locais diferentes e possuem funções antagônicas. Se houver um equilíbrio entre as concentrações de ambas, ocorrerá o desenvolvimento de uma massa celular indiferenciada comumente chamada de *callus* ou calo (HUSSAIN et al., 2012).

1.4 Produção de calos

Na natureza, as plantas podem gerar calo em resposta a um estresse, causado por ferimento ou infecção patogênica. A formação de calo, também denominada calogênese, pode também ser induzida *in vitro* por níveis elevados de reguladores de crescimento, onde ocorre a desdiferenciação das células do explante, que são induzidas a retornarem ao estado inicial meristemático (VIJAYASREE, 2010).

As regiões do explante que sofreram sinalização se estabelecem primeiramente na periferia do explante isolado e, de forma gradativa, em pontos internos do tecido, onde camadas e regiões de crescimento ativo na forma de cunhas passam a se formar e dependendo do balanço dos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura, diversos tipos celulares do explante poderão se desdiferenciar, caracterizando assim o novo sistema que passa a ser chamado de calo (TERMIGNONI, 2005).

Segundo Aitchinson et al. (1977) e Stafford e Warren (1991), o estabelecimento da cultura de calos a partir de explantes (sendo raízes, caules, folhas, flores, etc.) é dividido em três etapas (fig. 2):

(1) indução: preparação do tecido isolado com a ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular (mitose);

(2) divisão propriamente dita: as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor, iniciando pelas áreas periféricas e posteriormente ocupando a região central do explante;

(3) desdiferenciação: o tecido perde sua identidade histológica, as células tornam-se maiores, vacuolizadas, a taxa de divisão diminui e então ocorre o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular.

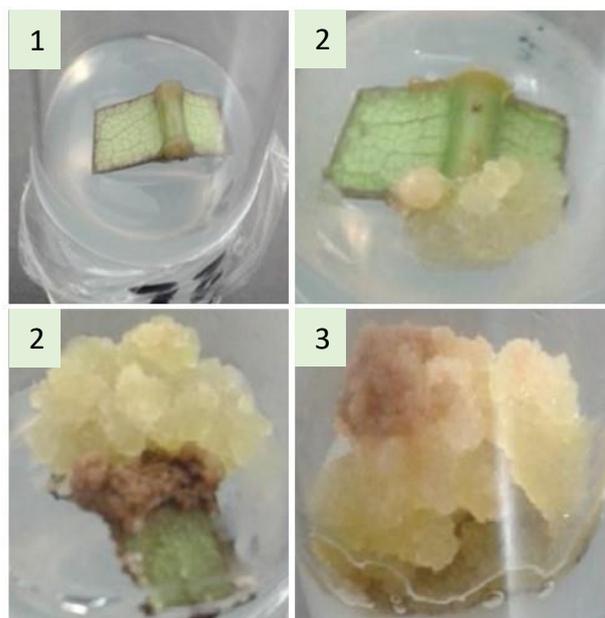


Figura 2 - Fases do estabelecimento da cultura de calos, em explante foliar de andiroba (*Carapa guianensis*). 1 – Indução; 2 – Divisão; 3 – Desdiferenciação. Imagens: Souza, J. C.

O calo pode ser produzido em resposta a uma injúria física ou química, mas é necessário saber que nem todas as células de um explante formam calo com facilidade ou produzem o metabólito de interesse, por isso a escolha do explante é fundamental para um bom resultado, no entanto, é sabido que, os tecidos jovens são mais adequados que os adultos. Pinto e Lameira (2001) descrevem o parênquima como o melhor tecido para o desenvolvimento de calos, pois se trata de um tecido de considerável plasticidade.

A formação de calo é importante na biotecnologia vegetal, podendo ser utilizada na propagação de clones saudáveis de uma determinada espécie – como tem sido estudada para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, como o pau-brasil (WERNER et al., 2009) e espécies alimentícias, como o adoçante *Stevia rebaudiana* (AHMAD et al., 2011) e as amazônicas cacau e o cupuaçu (Venturieri e Venturieri, 2004); além de ser necessária para a incorporação de genes por biobalística e para suspensão celular para a produção de metabólitos secundários (PISTELLI, 2010).

A suspensão celular é utilizada atualmente para culturas em grande escala de células vegetais, a partir das quais podem ser extraídos metabólitos secundários. Uma cultura em suspensão é feita por meio da transferência de uma quantidade de calo para um meio líquido e mantida sob condições adequadas de aeração, agitação, luz, temperatura entre outros parâmetros. A vantagem desse método é que uma vez otimizado o protocolo, é possível o fornecimento de uma fonte contínua de biomassa. Outra vantagem inclui a possibilidade de induzir a produção de metabólitos secundários de uma forma contínua utilizando elicitores tanto bióticos quanto abióticos (CUSIDO et al., 2014).

Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas configurações de biorreatores, que têm se adaptado com sucesso a produção de células e tecidos *in vitro*. O uso desta tecnologia possibilita que os nutrientes sejam efetivamente entregues as células, diferentemente do que pode ocorrer em cultura em meio de cultura semi-sólido (GEORGIEV, et al., 2013; MURTHY, et al., 2015). Neste ambiente também é possível manipular as variáveis citadas anteriormente, além de aeração e forma de fornecimento do meio de cultura, podendo ocorrer de forma constante ou não.

1.5 Produção de Metabólitos Secundários *in vitro*

As plantas possuem um grande potencial biossintético, porém, o percentual deste potencial utilizado atualmente é apenas uma fração do que as plantas podem nos oferecer. A procura por novas fontes de produtos naturais e fármacos oriundos de plantas tem se expandido, principalmente sobre aqueles com acentuado potencial terapêutico já comprovado (FOGLIO et al., 2006).

A produção de fármacos provenientes de plantas, principalmente aqueles obtidos de espécies de árvores florestais, é dificultada por diversos fatores, tais como: qualidade da matéria prima utilizada, acessibilidade, raridade de espécies de valor comercial e medicinal, principalmente aquelas localizadas em ecossistemas ameaçados de extinção (GONÇALVES & ROMANO, 2012; MORAIS et al., 2012). Além disso, algumas espécies produzem quantidades muito pequenas da substância bioativa de interesse, como é o caso do taxol, utilizado no tratamento contra o câncer, onde são necessárias as cascas de três árvores de aproximadamente cem anos de idade para produzir a quantidade suficiente para o tratamento de uma pessoa (NOSOV, 2012).

A biossíntese de metabólitos secundários é restrita a alguns tipos de células e tecidos especializados, o que dificulta os processos laboratoriais e industriais de produção, extração e purificação dos metabólitos secundários (SERAFINI et al., 2001). Estas dificuldades têm feito com que muitos produtos naturais derivados de metabólitos secundários identificados, sejam atualmente produzidos por síntese química, porém, a complexidade de algumas substâncias e o alto custo da síntese tem garantido sua produção biológica.

Para Grattapaglia e Machado (1998), as principais vantagens da produção de metabólitos *in vitro* são: a independência dos fatores ambientais, o aumento do controle da produção, o uso de linhagens que garantam uma qualidade consistente do produto, a simplificação dos métodos de processamento e recuperação do produto alvo, o aproveitamento de novas rotas de síntese a partir

de linhagens mutantes, a utilização de elicitores no direcionamento da produção e o aproveitamento das biotransformações que ocorrem durante o cultivo de células vegetais *in vitro*, entre outras.

Estudos comparativos de metabólitos secundários produzidos em plantas obtidas da natureza com plântulas e/ou calos *in vitro* têm sido realizados, assim como ensaios de atividades biológicas. Estudos de atividade antioxidante realizados com a espécie *Thymus lotocephalus* revelaram que extratos hidroalcoólicos de calos apresentam maior concentração de substâncias antioxidantes do que as plantas coletadas, particularmente ácido rosmarínico, apresentando assim, um maior potencial antioxidante do que extratos obtidos de plantas de campo (COSTA et al., 2012).

Estudos comparativos realizados com o gênero *Cyclopia*, que possui atividade biológica comprovada como antioxidante, antimutagênica, anticancerígena, fitoestrogênica, antidiabética e redutora de colesterol, identificaram diversas substâncias polifenólicas nos extratos a partir de plantas de campo e calo, onde três substâncias diferentes das encontradas em plantas de campo foram identificadas no calo, sendo a primeira vez que derivados de benzofenona e dihidrochalcona foram encontradas no gênero *Cyclopia* (KOKOTKIEWICZ, et al., 2012).

A vincristina e vimblastina são substâncias com comprovada ação antitumoral, porém as quantidades dessas substâncias na planta (*Catharanthus roseus*) é muito pequena (SAIMAN et al., 2014). Diversos grupos de pesquisa pelo mundo estão trabalhando para o melhoramento da produção dessas substâncias e para isto estão utilizando a produção de células em suspensão para a indução por elicitores tanto físicos quanto químicos (FUKUYAMA et al., 2015; FATIMA et al., 2015), quanto a indução *in vitro* por meio da genética (PRAKASH et al., 2015; MOERKERCKE et al., 2013), demonstrando que esta técnica pode ser uma grande ferramenta para auxiliar tanto na pesquisa quanto na produção de metabólitos com aplicações farmacológicas.

A artemisinina, importante antimalárico extraído de espécies do gênero *Artemisia*, é outra substância para a qual está sendo estudado o aumento da produção por suspensão celular. Seguindo o mesmo plano de ação para a vincristina e vimblastina, estão sendo testados o aumento da produção em suspensão celular utilizando elicitores (ALI et al., 2014; TARIQ et al., 2014).

Mathew e Sankar (2014) quantificaram os principais metabólitos secundários de espécies do gênero *Ocimum* (alfavaca e manjeriço) obtidos de culturas *in vivo*, culturas de calos *in vitro* com elicitores e *in vitro* sem elicitores. Observaram volumes mais elevados de fenóis, alcaloides e terpenóides nas culturas de calos *in vitro* com elicitores em função da ação destes na via do chiquimato, principal via responsável pela produção dos metabólitos secundários.

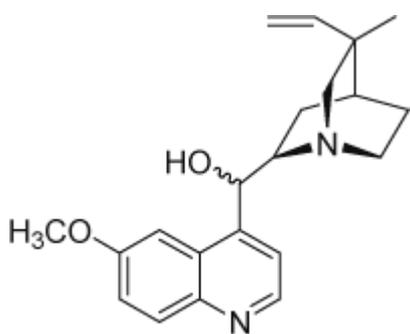
Deepthi e Satheeshkumar (2016) obtiveram uma produção de camptotecina 3 vezes maior em suspensão celular de calos de *Ophiorrhiza mungos*, se comparado aos níveis encontrado na planta *in vivo*. A camptotecina é um alcaloide quinolínicico com ação anticancerígena que está sendo utilizado em medicamentos de última geração. O aumento na produção de metabólitos, no caso, substâncias fenólicas e tocoferóis, também foi observado em culturas de calos de uma espécie de uva (*Vitis vinifera*) com elicitores (CETIN, 2014; CETIN et al., 2014).

Diante destes fatores se comprova a necessidade da busca por novos meios de obtenção dessas substâncias bioativas de forma rápida e segura. Sendo assim, a cultura de células/tecidos vegetais *in vitro* é uma ferramenta eficaz para a produção em larga escala de biomassa vegetal para a extração de metabólitos secundários de interesse, sem que ocorra a exploração predatória de populações selvagens. Uma vez que os demais métodos de cultivo vegetal são muitas vezes limitados, onerosos e demandam mais tempo para produção dos metabólitos (GONÇALVES & ROMANO, 2012; MORAIS et al., 2012).

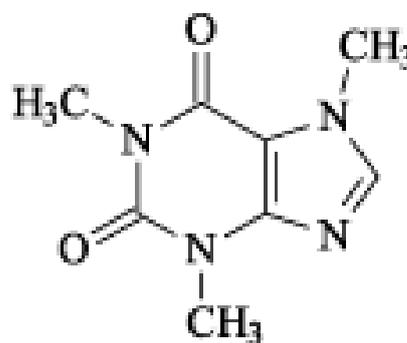
A investigação de princípios ativos oriundos de plantas úteis às mais diversas vertentes do ramo da biotecnologia, tais como as indústrias cosméticas e farmacêuticas, tem incentivado a realização de pesquisas como esta, levando ao aprofundamento no conhecimento de espécies vegetais pouco estudadas ou sem estudos prévios quanto a sua constituição química quando cultivadas *in vitro*, além de fornecer alternativas para a produção de biomassa para a produção de fármacos através da biotecnologia vegetal e cultura *in vitro*.

1.6 Metabólitos Secundários de *Duroia*

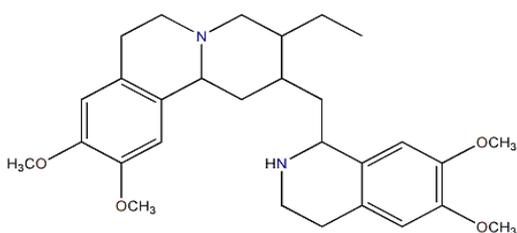
O gênero *Duroia* pertence à família Rubiaceae. Esta é uma das maiores famílias da classe das Magnoliopsida, que abrange cerca de 550 gêneros e 9000 espécies. As Rubiaceae possuem um grande potencial medicinal, com uma grande variedade de classes de metabólitos já encontradas, tais como: alcaloides, esteroides, terpenos, flavonoides e cumarinas (MARTINS e NUNEZ, 2015).



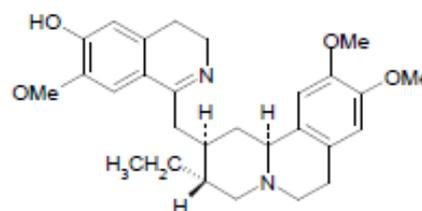
Quinina



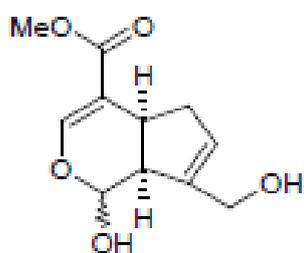
Cafeína



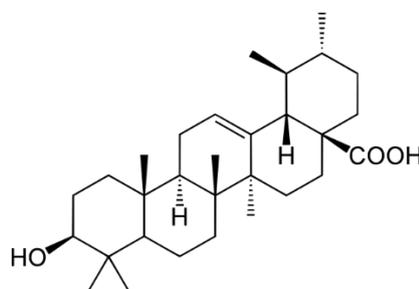
Emetina



Psicotrina



Genipina



Ácido ursólico

Figura 3 - Estrutura química de algumas substâncias isoladas de Rubiaceae

Já foram comprovadas diversas atividades farmacológicas a partir de substâncias obtidas de espécies de Rubiaceae: antidiarreica, anticancerígena, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, entre outras (CORDELL et al., 2001; TAKAYAMA, 2004; HEITZMAN et al., 2005). Esta família vegetal também é conhecida por possuir espécies de grande importância econômica, como o café (*Coffea* sp.) e o jenipapo (*Genipa* sp.), e medicinal, como a *Cinchona pubescens* Vahl, produtora da quinina utilizada no tratamento de malária (SILVA e ARAGÃO, 2009).

O gênero *Duroia* possui 30 espécies com distribuição neotropical (TAYLOR et al., 2004). Das espécies deste gênero já estudadas, destacam-se: *D. hirsuta* e *D. macrophylla*.

A espécie *D. hirsuta* é conhecida popularmente por “jardim-do-diabo”, pois nenhuma outra espécie vegetal cresce ao redor dela. Acreditava-se que este fato ocorria em função de forte alelopatia causada por aleloquímicos tóxicos como o iridoide plumericina (PAGE et al., 1994), porém, estudos mais recentes (FREDERICKSON et al., 2005, FREDERICKSON e GORDON, 2009) indicaram a atividade de formigas associadas, que ao impedir que outras espécies vegetais cresçam, estariam protegendo a *D. hirsuta* cujas domáceas lhe servem de ninho.

D. macrophylla, é a espécie na qual foram encontrados os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, com atividade frente à *Mycobacterium tuberculosis* (MARTINS et al., 2013); e substâncias aromáticas (fenóis e flavonoides), terpenos e alcaloides, com atividade antioxidante, inseticida sobre *Sitophilus zeamais* e toxicidade frente à *Artemia salina* (MARTINS et al., 2014). Desta espécie foi isolado o alcaloide indólico raunitidina (NUNEZ et al., 2009), também um alcaloide inédito com atividade antitumoral e outros alcaloides com atividade sobre *Mycobacterium tuberculosis* (os quais geraram duas patentes depositadas no INPE) (NUNEZ e VASCONCELOS, 2012; NUNEZ et al., 2014).

A espécie *D. saccifera* (figura2) foi selecionada para este estudo pela abordagem quimiotaxonômica, por pertencer à uma família e a um gênero de plantas que se destacam na produção de metabólitos com atividades biológicas comprovadas. Apesar desta espécie se destacar pela abundância na floresta amazônica, poucos estudos são encontrados a respeito dessa espécie. Sobre a sua fitoquímica, pouco se conhece, encontrando apenas um relato de presença de triterpenóides no extrato metanólico de

suas folhas, sem toxicidade frente à *Artemia salina* e com propriedades antioxidantes (MESQUITA et al., 2012).

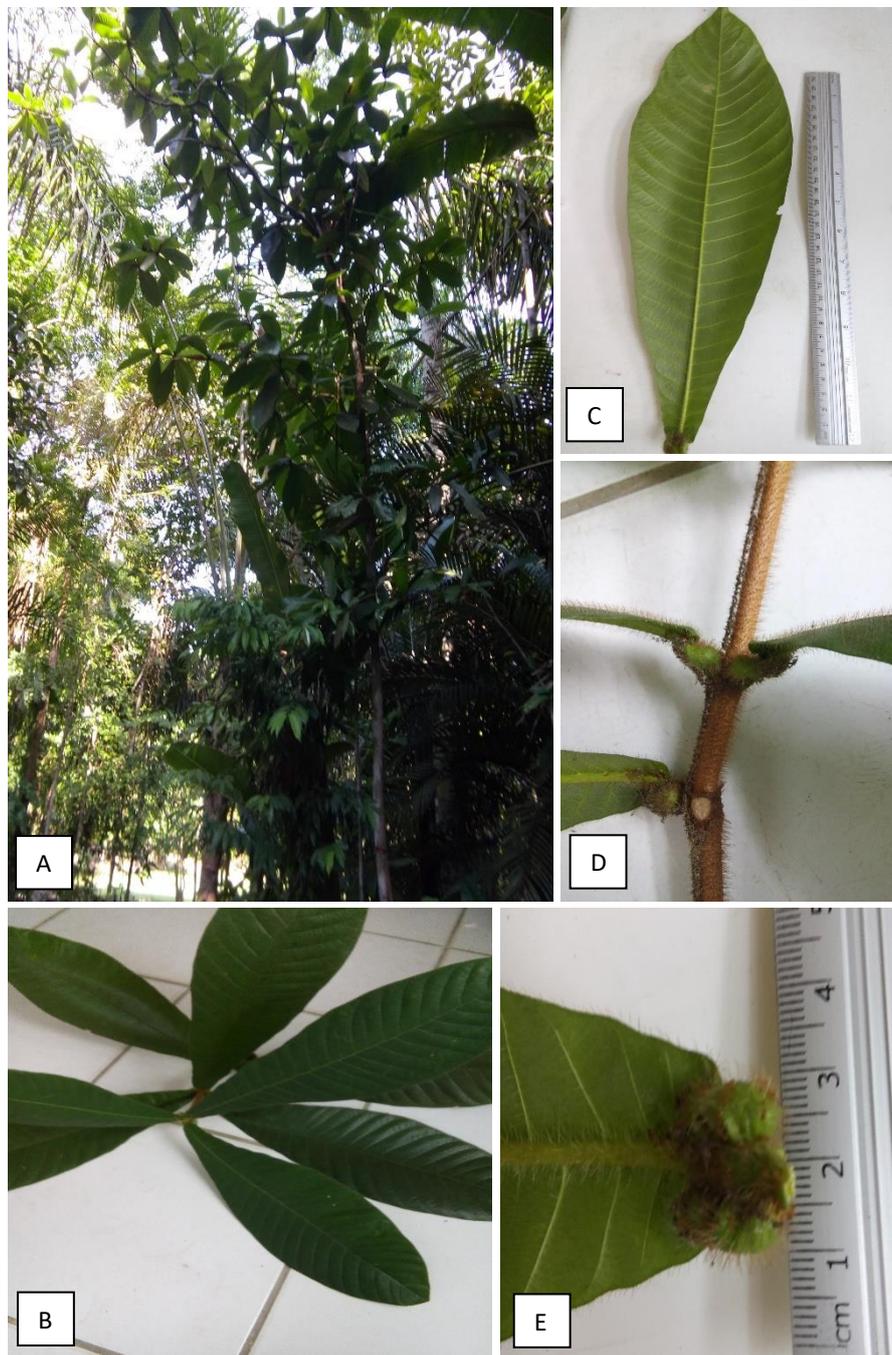


Figura 4 - A – espécime de *Duroia saccifera*; B – Detalhe de um ramo; C – Detalhe do tamanho de uma folha; D – Detalhe de uma domácea; E – Detalhe do tamanho de uma domácea. Fonte: Souza, J.C.

D. saccifera é uma árvore de pequeno porte, com folhas grandes, pilosas, com um par de domáceas características na base das folhas, ritidoma (superfície externa do caule) marrom e escamoso, encontrada na Venezuela, Colômbia, Peru e Brasil (figura 3) (RIBEIRO et al., 1999). No Brasil, ocorre nos Estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia, podendo crescer tanto em floresta de igapó, quanto em floresta de terra firme ou de várzea (FLORA DO BRASIL, 2016). É conhecida popularmente como *hormiga caspi* e *huitillo* (Peru), *palo de baba* (Venezuela) e *jiquitaya* (Brasil) (GRANDTNER e CHEVRETTE, 2013), ou ainda puruí-da-mata, puruí-grande, caá-juçara, folha-de-comichão ou cabeça-de-urubu (PEIXOTO et al., 1998). É uma espécie conhecida por sua mirmecofilia – associação mutualística com espécies de formigas nas domáceas (FONSECA e GANADE, 1996; FONSECA, 2009; RAZAFIMANDIMBISON et al., 2005; PASSMORE et al., 2012).

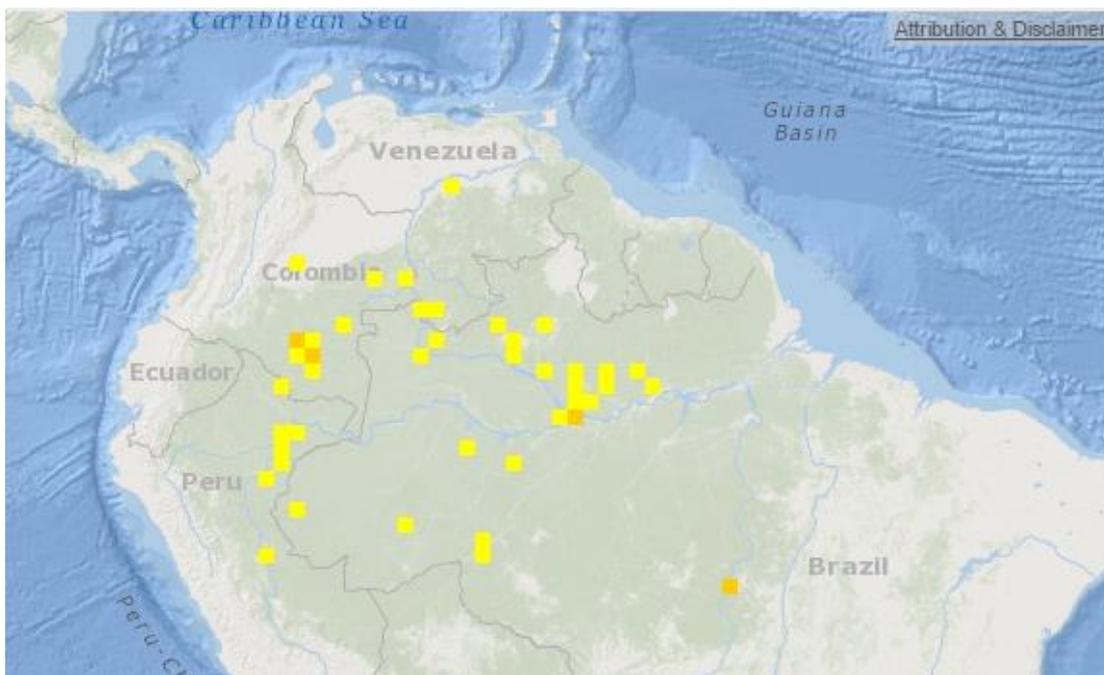


Figura 5 - Distribuição geográfica da espécie *Duroia saccifera*. Fonte GBIF.

1.7 Atividades Biológicas dos Metabólitos Secundários

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010; 2013), em todo o mundo, até cinco milhões de pessoas por ano são picadas por serpentes, sendo que entre estas serpentes, as peçonhentas causam considerável morbidade e mortalidade. São estimados cerca de 2,4 milhões de acidentes por animais peçonhentos por ano, entre 94.000 a 125.000 mortes, com adicional de 400.000 amputações e outras consequências de saúde graves, como infecções, tétano, cicatrizes, contraturas musculares e sequelas psicológicas. A peçonha também pode causar paralisia respiratória, insuficiência renal e causar danos teciduais graves e irreversíveis.

As espécies do gênero *Bothrops* tem comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas e respondem por até 95% dos acidentes ofídicos no Brasil, sendo a espécie *B. atrox* (figura 4) com maior frequência de registros em diversos estudos na Amazônia Central e possivelmente responsável pela maioria dos acidentes ofídicos nesta região (FRAGA et al., 2013). Juntamente com a *B. brazili*, a espécie *B. atrox* (jararaca do norte, surucucurana ou jararaca do rabo branco) parece ser responsável por quase 100% dos acidentes na região do Alto Rio Negro, no Amazonas (SOARES, 2006; CARDOSO et al., 2009),



Figura 6 - Imagens de *B. atrox*. Fonte: FRAGA et al., 2013.

Os venenos de serpentes são misturas complexas de substâncias, principalmente de proteínas, produzidas por uma glândula seromucosa e inoculados por um aparato especializado composto por dentes acanalados. Estas proteínas podem ser classificadas como miotoxinas, hemorraginas, nefrotoxinas, neurotoxinas e toxinas coagulantes (SANDOVAL et al., 2011). A fisiopatologia do envenenamento por serpentes botrópicas depende da ação de uma ou da combinação das seguintes toxinas: PLA₂ (fosfolipases), SVMP (metaloproteinases) e SVSP (serinoproteases), sendo a PLA₂ o componente majoritário, com uma variedade de efeitos farmacológicos (GUTIÉRREZ, 2002).

Atualmente, o único tratamento cientificamente validado é o tratamento com soro antiofídico, porém, existem algumas dificuldades como: o acesso limitado ao soro das populações distantes dos grandes centros, variações na composição dos venenos devido às diversidades taxonômicas e geográficas das serpentes, reações adversas causadas pela presença de proteínas junto ao soro (produzido geralmente com soro de cavalo), além da efetividade limitada da soroterapia de proteger contra os danos locais (dor, edema, necrose, inflamação, hemorragia) causados pelas picadas (SOARES et al., 2005; CARDOSO et al., 2009; SILVA et al., 2015).

A falta de acesso aos cuidados básicos de saúde e a escassez de antiveneno, aumentam a gravidade das lesões e suas consequências (WHO, 2010). Este é um problema agravado na região Amazônica, devido às longas distâncias existentes entre os locais de ocorrência de acidentes ofídicos e o atendimento médico, tornando o acesso ao tratamento soroterápico ainda mais difícil (DOS-SANTOS et al., 1995; DOS-SANTOS, 2009).

Em virtude destas dificuldades, a população utiliza uma variedade de plantas para complementar a terapia com soro antiofídico, ou mesmo em alternativa ao soro quando este não está disponível (MORS et al., 2000; OTERO e JIMENÉZ, 2000; CARDOSO et al., 2003; SOARES et al., 2005, SILVA et al., 2016). Segundo Moura et al. (2015), existem contravenenos comercializados preparados à base de plantas, como o Específico Pessoa (fabricado em Sobral, no Ceará), o Pau X (produzido em Alenquer, no Pará), indicados para envenenamentos por serpentes e escorpiões, Específico Composto P. Esser (fabricado em Santa Catarina) e Kutelak (comercializado no litoral norte do Estado de São

Paulo). Neste sentido, tornam-se de extrema importância os estudos de validação da atividade das plantas de conhecimento tradicional, bem como para descobrir novas moléculas ativas contra os efeitos dos venenos ofídicos.

Além dos efeitos causados pela peçonha, a lesão no local da picada pode ser alvo de infecções secundárias causadas pelos microrganismos existentes na cavidade oral das serpentes, agravando o quadro geral do paciente e gerando o risco de septicemia e até mesmo a amputação do membro (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2009). Estes microrganismos são inoculados juntamente com a peçonha no momento da picada.

Dentre os microrganismos encontrados na cavidade oral de serpentes e nos abscessos causados pela picada estão: *Morganella morganii*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Citrobacter* sp., *Providencia* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Salmonella enterica* (JORGE et al., 1990; JORGE et al., 1994; JORGE et al., 1998; BLAYLOCK, 2001; VALSAN et al., 2007; LÓPEZ et al., 2008; BASTOS et al., 2008; GARG et al., 2009; LAM et al., 2010; JHO et al., 2011, SUBRAMANI et al., 2013). Seria de grande relevância encontrar substâncias que, além de neutralizar os efeitos da peçonha, também protegessem contra infecção secundária por microrganismos.

Para garantir a segurança na utilização de produtos naturais é imprescindível que sejam realizados estudos da citotoxicidade desses produtos. Os ensaios mais utilizados atualmente são os de cultivo celular *in vitro*, que avaliam a viabilidade das células quando em contato com um determinado composto ou substância. Estes ensaios foram otimizados para serem feitos em microplacas de 96 poços, e esta miniaturização permite que sejam analisadas muitas amostras simultânea e rapidamente, utilizando um leitor de placas de ELISA (WEYERMANN et al., 2005). Diversas linhagens celulares são utilizadas para este tipo de ensaio, podendo ser células saudáveis, que indicarão a biocompatibilidade de um composto ou substância; ou linhagens de células tumorais, que podem avaliar a descoberta de um possível potencial anticâncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Obtenção de calos de *Duroia saccifera* para estudo químico e avaliação biológica de seus extratos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estabelecer um protocolo para a obtenção e multiplicação de calos de *Duroia saccifera*;
2. Avaliar a influência dos reguladores de crescimento na indução e multiplicação dos calos;
3. Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos;
4. Avaliar a citotoxicidade dos extratos sobre linhagens celulares saudáveis e neoplásicas;
5. Avaliar a atividade bloqueadora da fosfolipase A₂ dos extratos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Para o estabelecimento das culturas *in vitro*, foram utilizadas sementes provenientes de um indivíduo adulto de *Duroia saccifera*, coletadas na Reserva Adolfo Ducke localizado no município de Manaus (Latitude, 2°55'46.25"S, longitude 59°58'29.69"O), que foram coletadas no mês março de 2012. Sendo uma exsicata depositada para a confirmação da espécie no herbário do Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia-INPA sob o registro nº 259229.

3.2 Meios de Cultura e Condições de Cultivo

O meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) (MS) (tabela 1), além dos sais minerais e vitaminas, teve como fonte de carbono a sacarose a 3% e ágar 0,8% como agente geleificante. Foram utilizados 5 mL do meio de cultura em tubos de ensaio de 16 X 160 mm. O pH dos meios foi ajustado para $5.7 \pm 0,1$ e em seguida foi realizada a autoclavagem com temperatura média de $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de $1,3\text{ Kg/cm}^3$ (1 atm), durante 20 minutos. Após resfriamento, os tubos foram armazenados em temperatura ambiente até o momento da utilização. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura constante de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz branca, com intensidade de 40 a $50\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.3 Cultura de Tecidos Vegetais

3.3.1 Germinação

Foi realizada uma pré-desinfestação do fruto em bancada utilizando-se uma solução desinfestante contendo Mancozeb® 2 g.L + Estreptomicina 100 mg.L por 30 minutos, seguido de imersão em etanol 70% v/v por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada a desinfestação em câmara de fluxo laminar utilizando etanol 70% v/v por 1 minuto seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2% v/v por 5 minutos, com três lavagens em água destilada autoclavada entre os agentes desinfestantes. Após a desinfestação, as

sementes foram inoculadas em meio MS semissólido acrescido de 5 mg/L de ácido giberélico (GA₃), e cultivadas durante 90 dias, sendo avaliadas a cada 10 dias.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura segundo Murashigue & Skoog, 1962, (meio MS)

Macronutrientes	(mg.L⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0
KH ₂ PO ₄	170,0
NH ₄ NO ₃	1650,0
KNO ₃	1900,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0
Micronutrientes	(mg.L⁻¹)
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Fe EDTA	(mg.L⁻¹)
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Vitaminas	(mg.L⁻¹)
Glicina	2,0
Tiamina HCl	0,1
Piridoxina HCl	0,5
Ácido nicotínico	0,5
Mio Inositol	100,0

3.3.2 Indução dos Calos

Para o ensaio de indução de calo, foram coletados, a partir das plântulas germinadas *in vitro* com 90 dias, explantes foliares que foram inoculados em meio MS na presença dos reguladores de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), cinetina (KIN) e 6-benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações e combinações (Tabela 2). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, tendo 20 repetições, onde cada repetição constou de um tubo de ensaio contendo uma folha inteira. As culturas foram avaliadas aos 15 e 30 dias considerando-se a indução e intensidade da produção de calo sendo usados como parâmetros: início da formação de calo, 50% da superfície da folha com calo formado e 100% da folha com calo formado. A análise dos dados foi feita por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Meio MS com adição ou não de diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento para a fase de indução de calo de *Duroia saccifera*. (N=20)

Segmento foliar	Reguladores de crescimento		
	2,4-D	KIN	BAP
	(mg.L ⁻¹)		
TIC1	-	-	-
TIC2	2	-	2
TIC3	4	-	2
TIC4	2	2	-
TIC5	4	2	-

3.3.3 Multiplicação dos Calos

Os calos provenientes da fase de indução foram inoculados em meio MS com 2,4D e KIN combinados, com variação na concentração (Tabela 3). O delineamento experimental foi casualizado com 3 tratamentos sendo 20 repetições para cada tratamento, onde cada repetição consistiu de 1 tubo de ensaio contendo 3 gramas de calo. As culturas foram avaliadas a cada 10 dias em relação ao peso fresco em gramas. A análise dos dados foi feita por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Meio MS com 2,4D e KIN combinados com variação de concentração para a fase de multiplicação de calos em *Duroia saccifera*. (N=20)

Tratamento -	Reguladores de crescimento	
	2,4D	KIN
	(mg.L ⁻¹)	
TM1	2	1
TM2	4	2
TM3	4	4

3.4 Fitoquímica

3.4.1 Extração dos Calos

Os calos foram retirados dos tubos de ensaio e pesados para aferir o peso total de massa fresca, em seguida foram secos em liofilizador e novamente pesados. Foi realizada a pulverização com ajuda de cadinho e pistilo. Após a pulverização, o material foi extraído com os solventes hexano, acetato de etila e metanol. O esquema geral para a preparação de todos os extratos está ilustrado na figura 5. Foram realizadas três extrações com cada solvente utilizando o banho em ultrassom por 20 minutos em cada extração. Após o banho em ultrassom, o material foi filtrado, e o resíduo vegetal após as três extrações com cada solvente foi seco em temperatura ambiente. Esse mesmo material vegetal foi extraído com os próximos solventes, em ordem crescente de polaridade. Os extratos

foram concentrados em rotaevaporador (extratos hexano e acetato de etila) e concentrador de amostras (metanol).

3.4.2 Análise cromatográfica dos extratos

Análises iniciais dos extratos foram realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), empregando cromatofolhas de alumínio, com sílica gel com indicador de fluorescência UV₂₅₄. A eluição das cromatofolhas foi realizada com diferentes solventes, em diferentes proporções. O extrato hexânico foi eluído com uma combinação de hexano/DCM 1:1. A revelação das cromatoplasas empregou luz UV (254 e 365 nm), iodo e sulfato cérico. O extrato acetato de etila foi eluído em AcOEt/acetona 1:1 e revelado com luz UV (254 e 365 nm), iodo, sulfato cérico. E o extrato metanólico foi eluído com clorofórmio/MeOH/H₂O 70:30:4 e 5:5:1, clorofórmio/ácido acético/MeOH/H₂O 60:32:12:8 e 50:40:12:10 e revelado com luz UV (254 e 365 nm) e anisaldeído sulfúrico.

3.4.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ¹H foram realizados no espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de ¹H e foram utilizados os solventes Clorofórmio e dimetilsulfóxido, ambos deuterados, para dissolver as amostras. E como padrão interno foi utilizado TMS.

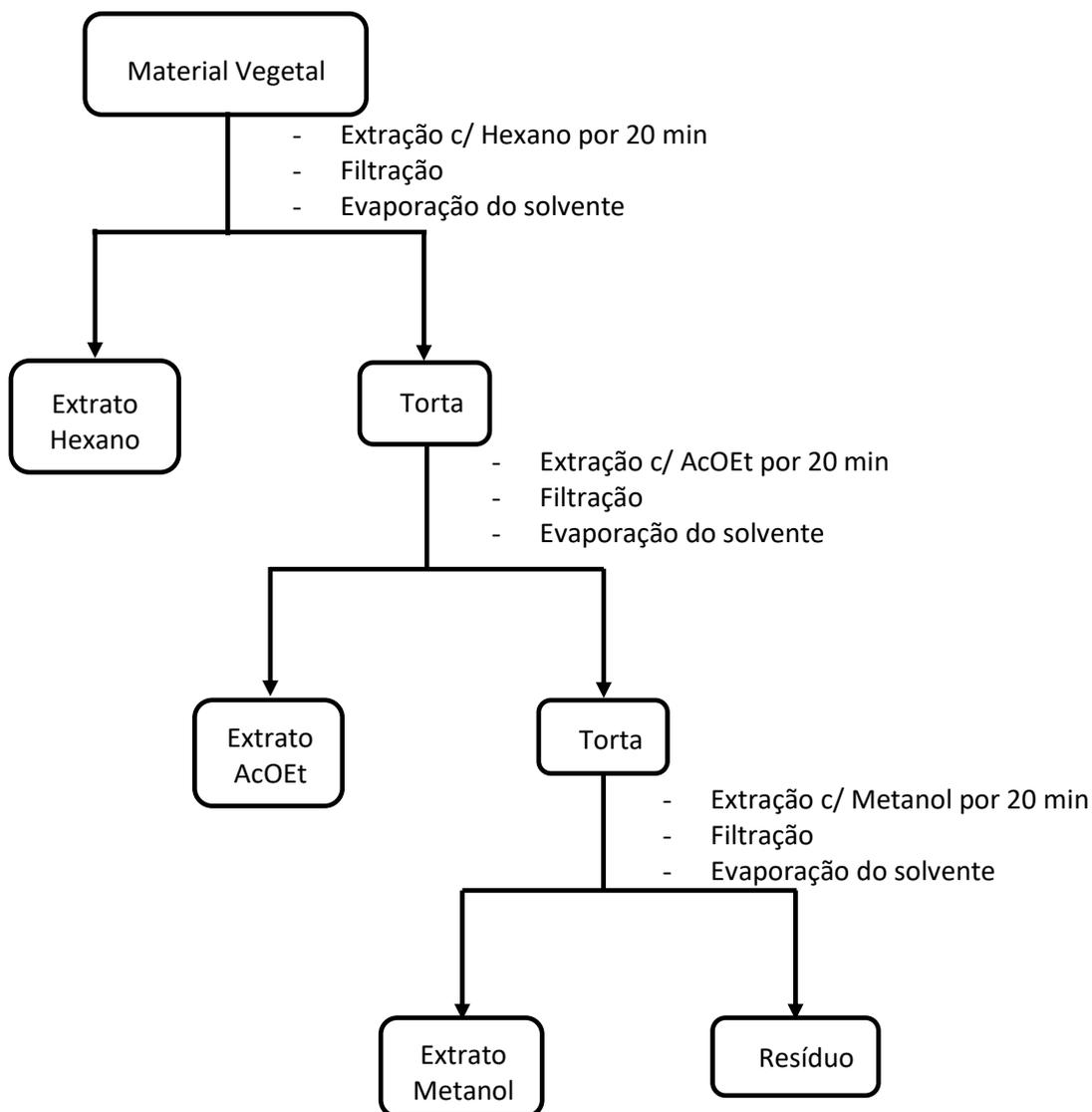


Figura 7 - Fluxograma geral da preparação dos extratos

3.4.4 Fracionamento dos Extratos

3.4.4.1 Fracionamento do Extrato Hexânico

O fracionamento do extrato hexânico (400 mg) foi realizado em coluna aberta (46,3 x 0,6 cm) de sílica gel 60 (200-400 Mesh), usando gradiente de Hexano/DCM, DCM puro e DCM/acetona (tabela 4).

Tabela 4 - Sistema de eluição do fracionamento do extrato hexânico de *Duroia saccifera*.

Frações Coletadas	Sistema de Eluição
0-1	Hex/DCM (8:2)
2	Hex/DCM (7:3)
3	Hex/DCM (6:4)
4	Hex/DCM (1:1)
5	Hex/DCM (3:7)
6	DCM 100%
7	DCM/AcOEt (9:1)
8-9	DCM/Acetona (8:2)

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna foi de 15 mL e o volume das frações recolhidas foi de 10 mL. Foram obtidas 8 frações, as quais foram analisadas em CCDC e reunidas (tabela 5).

Tabela 5 - Massa das frações reunidas do fracionamento do extrato hexânico.

Frações reunidas	Massa (mg)
0-1	164,2
2	37,1
3	15,3
4-5	24,2
6-7	51,8
8	16,6

A partir das frações reunidas da primeira coluna do extrato bruto foram escolhidas algumas para continuar o fracionamento, sendo denominadas HEXF1 (fração 1, 164,2 mg), HEXF2 (fração 2, 37,1 mg), HEXF4-5(fração 4-5, 24,2 mg) e HEXF6-7(fração 6-7, 51,8 mg), todas analisadas por CCDC.

O processo de purificação da fração HEXF1 (164,2 mg) foi realizado em coluna aberta (37 x 0,3 cm) em sílica gel 60, com um volume de 70 mL para cada sistema, usando gradiente de Hexano/DCM até DCM puro (Tabela 6).

Tabela 6 - Sistema de eluição do fracionamento da fração HEXF1

Frações Coletadas	Sistema de Eluição
0-12	Hex/DCM (7:3)
13-24	Hex/DCM (6:4)
25-40	Hex/DCM (1:1)
41-56	Hex/DCM (3:7)
57-68	DCM 100%

Foram obtidas no total 68 frações, porém somente 23 possuíam massa de no mínimo 1 mg (tabela 7).

Tabela 7 - Massa das frações reunidas do fracionamento da fração HEXF1

Frações com massa	Massa (mg)
5	1,1
6	1
9	1
17	1,7
18	1,9
19	1,7
20	1,7
21	2
22	1
23	2,1
24	1,5
25	1,3
26	1
32	2,3
33	1,4
36	1,4
48	1,6
51	1
54	1,1
55	1,1
56	1,5
60	1,1
62	1,4

Algumas frações com menos de 1 mg de massa foram reunidas pois apresentaram indícios de metabólitos secundários de interesse quando reveladas em CCDC. Após a análise em CCDC as frações foram reunidas para posterior análise (tabela 8).

Tabela 8 - Massa das frações reunidas do fracionamento da fração HEXF1

Frações com massa	Massa (mg)
5	1,1
7-8	1
9-11	2,1
14-15	1,8
25-27	2,8
29-37	7,7
40-42	1
43-48	2,4

O processo de purificação da fração HEXF 2 (37,1 mg) foi realizado em coluna aberta (37 x 0,3 cm) em sílica gel 60, com um volume de 25 mL para cada sistema, usando gradiente de Hexano/DCM, DCM puro até DCM/Metanol (tabela 9).

Tabela 9 - Sistema de eluição do fracionamento da fração HEXF2

Frações Coletadas	Sistema de Eluição
0-9	Hex/DCM (9:1)
10-17	Hex/DCM (8:2)
18-24	Hex/DCM (7:3)
25-31	Hex/DCM (6:4)
32-38	Hex/DCM (1:1)
39-47	Hex/DCM (4:6)
48-54	Hex/DCM (3:7)
55-61	Hex/DCM (2:8)
62-70	DCM 100%
71-78	DCM/Metanol (9:1)

Foram obtidas no total 78 frações, porém somente 12 possuíam massa de no mínimo 1 mg (tabela 10)

Tabela 10 - Massa das frações reunidas do fracionamento da fração HEXF2

Frações com massa	Massa (mg)
48	1,1
51	1
52	1
66	1,2
67	1
71	1,3
72	1,1
73	6,4
74	1
75	1
76	1,5
77	1,4

Após análise por CCDC foram reunidas as frações 72-73 e 74-77 para posterior análise.

O processo de purificação da fração HEXF4-5 (24,2 mg) foi realizado em coluna aberta (30 x 0,3 cm) em sílica gel 60, com um volume de 10 mL para cada sistema, usando gradiente de Hexano/DCM, DCM puro até DCM/Metanol (tabela 11).

Tabela 11 - Sistema de eluição do fracionamento da fração HEXF4-5

Frações Coletadas	Sistema de Eluição
0-2	Hex/DCM (9:1)
3-4	Hex/DCM (8:2)
5-6	Hex/DCM (7:3)
7-8	Hex/DCM (6:4)
9-10	Hex/DCM (1:1)
11-12	Hex/DCM (4:6)
13-14	Hex/DCM (3:7)
15-16	Hex/DCM (2:8)
17-18	DCM 100%
19-20	DCM/Metanol (9:1)

Foram obtidas no total 20 frações, porém somente 8 possuíam massa de no mínimo 1 mg (tabela 12)

Tabela 12 - Massa das frações do fracionamento da fração 4-5

Frações com massa	Massa (mg)
4	1,7
5	2,2
6	1,3
9	1
11	2,1
14	1
15	1,8
19	3,9

Foram obtidas no total 20 frações, porém somente 7 possuíam massa de no mínimo 1 mg. Após análise por CCDC foram reunidas as frações 5-6, 8-18 e 19-20 e juntamente com a fração 4 foram enviadas para posterior análise.

O processo de purificação da fração 6-7 (51,8 mg) foi realizado em coluna aberta (30 x 0,3 cm) em sílica gel 60, com um volume de 10 mL para cada sistema, usando gradiente de Hexano/DCM, DCM puro até DCM/Metanol (tabela 13).

Tabela 13 - Sistema de eluição do fracionamento da fração 6-7

Frações Coletadas	Sistema de Eluição
0-2	Hex/DCM (9:1)
3-4	Hex/DCM (8:2)
5-6	Hex/DCM (7:3)
7-8	Hex/DCM (6:4)
9-10	Hex/DCM (1:1)
11-12	Hex/DCM (4:6)
13-14	Hex/DCM (3:7)
15-16	Hex/DCM (2:8)
17-18	DCM 100%
19-20	DCM/Metanol (9:1)

Foram obtidas no total 20 frações, porém somente 7 possuíam massa de no mínimo 1 mg (tabela 14). Após análise por CCDC foram reunidas as frações 5-6, 9-10,16-18, 19-20 e juntamente com a fração 4 foram enviadas para posterior análise.

Tabela 14 - Massa das frações do fracionamento da fração 6-7

Frações com massa	Massa (mg)
4	1,3
5	1
10	9,3
16	1
18	1
19	5
20	2,4

3.4.4.2 Fracionamento do Extrato Acetato de Etila

O fracionamento do extrato hexano (900 mg) foi realizado em coluna aberta (45,4 x 1 cm) de sílica gel 60 (200-400 Mesh), usando gradiente de DCM/AcOEt, AcOEt puro, AcOEt /acetona, acetona pura, acetona/metanol e metanol puro (tabela 15).

Tabela 15 - Sistema de eluição do fracionamento do extrato acetato de etila de *Duroia saccifera*

Frações Coletadas	Sistema de Eluição
0-1	DCM/AcOEt (9:1)
2-6	DCM/AcOEt (8:2)
7-11	DCM/AcOEt (7:3)
12-14	DCM/AcOEt (1:1)
15-16	DCM/AcOEt (4:6)
17-18	DCM/AcOEt (3:7)
19-20	AcOEt 100%
21-22	AcOEt/Acetona (1:1)
23-24	Acetona 100%
25-26	Acetona/Metanol (1:1)
27-28	Metanol 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna foi de 30 mL e o volume das frações recolhidas foi de 15- 20 mL. Foram obtidas 28 frações, as quais foram analisadas em CCDC e reunidas (tabela 16).

Tabela 16 - Massa das frações reunidas do fracionamento do extrato acetato de etila.

Frações reunidas	Massa (mg)
1	11,3
2	4
3	2,2
4	2,6
5	2,4
6	2,6
7	4,1
8-9	15,6
10-17	34,6
18-19	13,6
20-21	14,5
22	7,4
23-24	14,5
25	14,5
26	2,3
27	4,8
28	2,9

A partir do resultado das placas cromatográficas, foram escolhidas algumas frações para a análise por ressonância magnética nuclear, foram elas, fração 2 (4 mg), fração 7 (4,1 mg), fração 8-9 (15,6 mg) e fração 10-17 (34,6 mg).

3.4.4.3 *Fracionamento do Extrato Metanólico*

O extrato metanólico, após uma análise prévia por RMN de ^1H , mostrou possuir uma grande quantidade de açúcares em sua composição, e a análise em CCDC não encontrou um sistema ideal para a realização do fracionamento. Devido a esses fatores e à falta de tempo, foi definido que o extrato metanólico seria estudado em outra ocasião (num possível estágio pós-doutoral ou por outro aluno).

3.5 Ensaios biológicos

3.5.1 Atividade bloqueadora de PA₂ do veneno de *Bothrops atrox*

A inibição da atividade fosfolipásica foi mensurada pela atividade hemolítica indireta em gel de agarose. A dose mínima hemolítica indireta (DMHi) foi calculada segundo Gutiérrez et al. (1988) e determinada como uma medida da atividade da fosfolipase A₂, definida como a quantidade de proteína que produz um halo mínimo de 10 mm, padronizada em 1,25 µg, para o pool de veneno utilizado (Moura et al., 2014).

O efeito bloqueador dos extratos de *Duroia saccifera* na hemólise foi avaliado inicialmente incubando-os previamente por 30 minutos a 37 °C com 2DMHi do veneno na proporção de 1:10 e 1:20 (veneno:extratos, m:m). Alíquotas de 15 µL contendo as misturas foram aplicadas nos poços sobre as placas de vidro cobertas com a mistura (agarose 1%, gema de ovo e eritrócitos). A atividade enzimática foi expressa como percentual de inibição, onde 100% de inibição correspondem à ausência do halo. Foi utilizado como controle negativo solução salina 0,9% e cada ensaio foi realizado em quadruplicata e expresso como média ± desvio padrão da média.

O veneno utilizado nos experimentos foi extraído de serpentes adultas de *Bothrops atrox*, provenientes da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no Km 83 da BR-163, Santarém, PA, Brasil. A coleta de serpentes e a extração do veneno foram aprovadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - nº 14018). Os espécimes foram mantidos no biotério das Faculdades Integradas do Tapajós- FIT, Santarém-PA, sob a responsabilidade do MSc. Hipócrates de Menezes Chalkidis e com autorização do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA número 26/2013. O veneno foi coletado in natura, liofilizado e mantido a -20 °C, até o momento do uso. Os testes foram realizados pelo Dra. Valéria Mourão, no laboratório de Imunoquímica no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, sob supervisão da Prof^a. Dra. Maria Cristina dos Santos.

3.5.2 Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana dos extratos foi testada pela técnica de difusão em ágar, seguindo a metodologia descrita por HU et al. (2004), com modificações. Placas de ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com as bactérias teste, nas quais foram perfurados poços de 6 mm de diâmetro e inoculados 50 µL do extrato, na concentração de 2 mg/mL. As placas foram mantidas em estufa por 24h a 30 ou 37 °C e, após, realizada a medição dos halos, em mm.

Os microrganismos utilizados foram: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Aeromonas hydrophilla* (IOC/FDA 110-36), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Morganella morganii* (ATCC 00082), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella entérica* (ATCC 13076) e *Serratia marcescens* (ATCC 13880). As cepas foram adquiridas na Fundação André Tosello, Campinas e Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Brasil. O controle utilizado foi o antibiótico oxitetraciclina (125 µg/mL).

Considerando o diâmetro dos halos de inibição, a atividade do extrato foi classificada em: baixa atividade (até 0,6 cm), média atividade (até 1,3 cm) e alta atividade (maior que 1,3 cm). O ensaio foi realizado em triplicata e o controle utilizado foi o antibiótico oxitetraciclina (125 µg/mL).

A concentração mínima inibitória dos extratos foi testada seguindo a metodologia de microdiluição descrita por ELOFF (1998), com modificações. Os extratos que apresentaram resultados positivos no ensaio de difusão em ágar foram testados quanto ao potencial inibidor do crescimento das bactérias, nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 60 e 30 µg/mL, em triplicatas. O antibiótico oxitetraciclina (125 µg/mL) foi utilizado como controle positivo e o meio Mueller-Hinton, apenas com bactérias, foi utilizado como controle negativo. As leituras da absorbância, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm, foram realizadas antes das placas serem levadas à estufa por 24 horas e após este período de tempo. A atividade inibitória foi obtida pelas diferenças das densidades ópticas (D.O.) entre essas duas leituras. Os resultados estão expressos como média das leituras da D.O. e desvio padrão.

3.5.3 Atividade Citotóxica

A citotoxicidade foi avaliada pelo método de alamar blue segundo AHMED et al. (1994). As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com os extratos na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, durante um período que de 72 horas. Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da doxorrubicina (5 $\mu\text{g/mL}$) e controle negativo DMSO. Após o período de tratamento foi adicionado 10 μL de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado, que compreendeu de 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência. Os extratos que apresentaram viabilidade menor que 50% foram realizadas curvas em diferentes concentrações para o cálculo da CI50. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde Ft = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e ΔFb = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Ft} \times 100}{\text{Fb}}$$

Para a realização do ensaio foram utilizadas as linhagens tumorais: MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); SK-MEL-3 (melanona humano); HCT-116 (carcinoma coloretal) e fibroblasto humano da linhagem MRC5. As células tiveram as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Atividade Biológica II (BIOPHAR II) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), ensaio realizado por Patricia Danielle Oliveira de Almeida, sob supervisão da Prof^a. Dra. Marne de Carvalho Vasconcelos. As células foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 50 U/mL de penicilina e 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Invitrogen) a 37°C em estufa a 5% de CO₂.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação

O ensaio de germinação de sementes de *Duroia saccifera* foi realizado após uma pré-desinfestação em bancada, onde o fruto foi despulpado e foi retirado o arilo das sementes. Foram inoculadas 108 sementes em meio de cultura MS acrescido de 5 mg/L de GA₃. Após 90 dias de cultivo, 50% das sementes haviam germinado. Do total de 108 sementes iniciais, 24% desenvolveram contaminação (fungos) e 25% não germinaram.

Após o término do experimento, estas sementes que não iniciaram a germinação foram deixadas por mais 30 dias no meio de cultivo, porém, mesmo neste tempo excedente não houve germinação, sugerindo que estas sementes não estavam viáveis. No total foram obtidas 54 plântulas em boas condições para o prosseguimento do trabalho (figura 6).

O GA₃ é um regulador de crescimento do grupo das giberelinas, que possuem participação na quebra da dormência de sementes (LAVAGNINI, 2014). Ele é muito utilizado na cultura de tecidos para reduzir o tempo e melhorar a porcentagem de germinação *in vitro*.

Não foram encontrados na literatura dados sobre a porcentagem de germinação da espécie *Duroia saccifera* para comparativos, porém, Ferreira et al. (2016) aumentaram a taxa de germinação de *Morinda citrifolia* (Rubiaceae) *in vitro* de 40% para 90% adicionando 0,5 mg/L de GA₃ ao meio ¹/₂ MS no período de 30 dias de cultivo. Para a cultura de tecidos, uma taxa de germinação de 50% já pode ser considerada satisfatória.

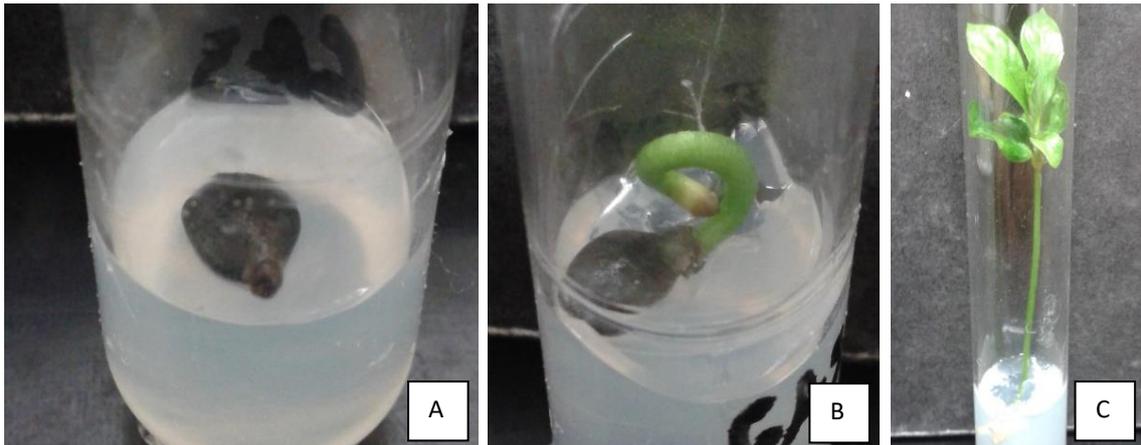


Figura 8 - Germinação das sementes de *Duroia saccifera* ao longo de 90 dias; A: semente inoculada no meio de cultura MS; B: Início da germinação após 30 dias; C: Plântula formada aos 90 dias de cultivo.

4.2 Indução de Calo

Para a indução de calo, os explantes foliares obtidos das plântulas *in vitro* foram inoculados em meio semissólido de Murashige & Skoog (1962) (MS) adicionado ou não dos reguladores de crescimento ácido-2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Cinetina (KIN) e 6-benzilaminopurina (BAP). A indução do tecido foliar para a formação de calo foi medida visualmente utilizando-se como parâmetro a formação inicial de calo, 50% da folha coberta de calo e 100% da folha coberta de calo, como ilustrado na figura 7.

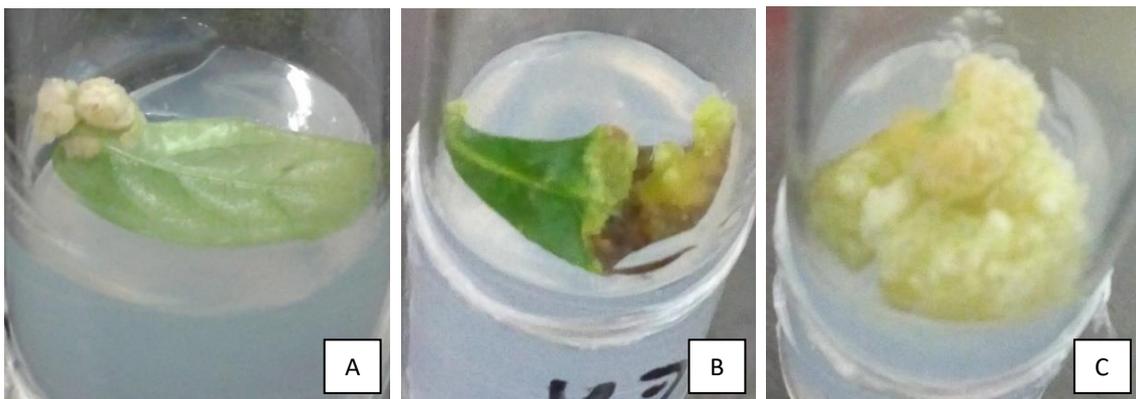


Figura 9 - Indução de calos em tecido foliar de *Duroia saccifera*; A- início da formação de calo; B- 50% da folha coberta de calo; C- 100% da folha coberta de calo. Fotos: Souza, J.C.

O tratamento TIC5 (tabela 17) onde foi utilizado 4 mg/L de 2,4-D e 2 mg/L de KIN se mostrou o mais eficiente na indução de calo aos 30 dias de cultivo, onde, 80% das

folhas apresentaram 100% da superfície coberta de calo, diferindo dos outros tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os tratamentos onde foi utilizado BAP não foram eficientes, sendo que aos 30 dias de cultivo, apenas 15% das folhas apresentavam formação inicial de calo na superfície.

Tabela 17 - Meio MS com adição ou não de diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento para a fase de indução de calo de *Duroia saccifera*. (N=20)

	Reguladores de crescimento			Avaliação					
	2,4-D	KIN	BAP	Inicial	50%	100%	Inicial	50%	100%
	mg.L ⁻¹			15 dias			30 dias		
(%)									
TIC1	-	-	-	0,0 a B	0,0 a B	0,0 a A	0,0 a B	0,0 a B	0,0 a B
TIC2	2	-	2	0,0 a B	0,0 a B	0,0 a A	0,0 a B	0,0 a B	0,0 a B
TIC3	4	-	2	0,0 a B	0,0 a B	0,0 a A	0,15 a B	0,0 a B	0,0 a B
TIC4	2	2	-	0,20 a B	0,05 a B	0,0 a A	0,30 a b A	0,45 a A	0,10 b B
TIC5	4	2	-	0,60 a A	0,40 a A	0,0 b A	0,0 b B	0,20 b A B	0,80 a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A concentração alta de 2,4-D combinada ao KIN fornece as condições para a formação de um calo esbranquiçado, de aspecto friável, um indicador de uma massa celular indiferenciada. Segundo Figueiredo et al. (2014) o 2,4-D é a auxina mais utilizada para a indução de calo. Cid e Teixeira (2012) relataram que a ação do 2,4-D é mais potente que a do AIA (ácido-3-indolacético) e o ANA (ácido naftalenoacético), além de ser mais termoestável em altas temperaturas (autoclavagem) e menos fotossensível, sendo necessário uma concentração menor para se obter o mesmo efeito.

4.3 Multiplicação dos Calos

Os calos induzidos na fase anterior foram transferidos para meio MS com a adição de 2,4-D e KIN combinados em diferentes concentrações, para avaliar o aumento de massa. O crescimento dos calos foi inferido através do peso fresco em gramas. Foram realizadas 4 pesagens, sendo a primeira em tempo zero de cultivo, outras aos 10, 20 e 30 dias de cultivo.

Como demonstrado na tabela 18, através da análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), o tratamento TM1 composto de 4 mg/L de 2,4-D mais 2 mg/L de KIN teve uma diferença significativa aos 30 dias de cultivo em relação aos outros dois tratamentos. Os tratamentos TM2 e TM3, visualmente obtiveram um crescimento parecido com o TM1, porém estatisticamente foram inferiores.

O tratamento TM1 é o mesmo utilizado para a indução dos calos. Este tratamento foi utilizado, pois percebeu-se que os calos, após a indução, continuaram se desenvolvendo, então optou-se por utiliza-lo junto com duas variações. Este mesmo tratamento foi utilizado por Maciel et al. (2003) para a indução e multiplicação de *Coffea arabica*, espécie da mesma família que a *Duroia saccifera* (Rubiaceae).

Tabela 18 - Efeito de reguladores de crescimento 2,4-D e KIN combinados, sobre a multiplicação de massa celular indiferenciada de *Duroia saccifera* durante 30 dias de cultivo (N=20).

Tratamento	Peso inicial	10 dias	20 dias	30 dias	
		(g)			
TM1	MS + 4 2,4D + 2 KIN	3,0 a	3,05 a	3,89 a	4,74 a
TM2	MS+ 4 2,4D + 4 KIN	3,0 a	3,35 a	3,37 a	3,45 b
TM3	MS + 2 2,4D + 1 KIN	3,0 a	3,33 a	3,32 a	3,09 b

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O crescimento dos calos foi uniforme, sem a ocorrência de variação na morfologia ou coloração (figura 8), e produzindo calos friáveis (não compactados, capazes de se

fragmentar). Para a obtenção de calos com essas características, deve-se equilibrar o balanço entre auxina e citocinina, até que o resultado esperado seja alcançado. A obtenção de calos nestas condições nem sempre é simplificado, Pereira et al. (2007) obtiveram calos de *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) que variaram em coloração e consistência, enquanto Almeida et al. (2010), só obtiveram calos com melhor aspecto e desenvolvimento quando na presença de auxina juntamente com a citocinina.



Figura 10 - Aspecto dos calos após 30 dias de cultivo em meio de multiplicação. Fotos: Souza, J.C.

Pelos resultados obtidos tanto na indução quanto na multiplicação dos calos, percebeu-se que as células da espécie *Duroia saccifera* respondem a estímulos de concentrações hormonais bem específicos, visto que, as variações de concentração dos reguladores de crescimento 2,4-D e KIN tanto na indução quanto na multiplicação de calos não foi alta, e mesmo assim houve diferença do desenvolvimento dos calos, o que pode apontar uma estabilidade fisiológica e genética da espécie, que são fatores importantes nos estudo envolvendo cultura de tecidos vegetais.

4.4 Extração dos Calos

Os calos foram repicados a cada 30 dias, por um período de 150 dias para a obtenção de massa. Após este período, os calos foram retirados do meio de cultivo e pesados, resultando em 553,25 g de massa fresca. Os calos foram liofilizados por 72 horas e pesados novamente, resultando em 38,92 g de massa seca.

A massa seca de calos foi pulverizada com ajuda de graal e pistilo, formando um pó fino. Por meio de testes preliminares, observou-se que a não pulverização dos calos antes da extração reduz a sua eficiência, pois os calos quando secos formam aglomerados, e as células no interior não são alcançadas pelos solventes, diminuindo a eficiência do processo de extração. A pulverização serve também para o rompimento da parede celular (que na metodologia clássica para extração de metabólitos de plantas, é feito com moinho de facas), outra barreira que impede a ação dos solventes. Os calos foram extraídos com solventes de polaridade crescente, resultando em 3 extratos (tabela 19) que foram secos e pesados.

Tabela 19 - Massa resultante rendimento da extração dos calos de *Duroia saccifera*

Massa calo fresco (g)	Massa calo seco (g)	Extrato	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
553,25	38,92	Hexânico	0,45	1,1
		Acetato de etila	1,09	2,8
		Metanol	8,88	22,8

4.5 Análise em Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC) Dos Extratos Brutos

Os extratos foram analisados em CCDC em diferentes sistemas de eluição, para a escolha do melhor sistema, de acordo com a polaridade da amostra. Para o extrato hexânico, o sistema hexano/DCM 1:1 indicou a presença de terpenos e substâncias alifáticas, apesar da presença de rastros, ao analisar com os reveladores químicos e físicos (figura 9).

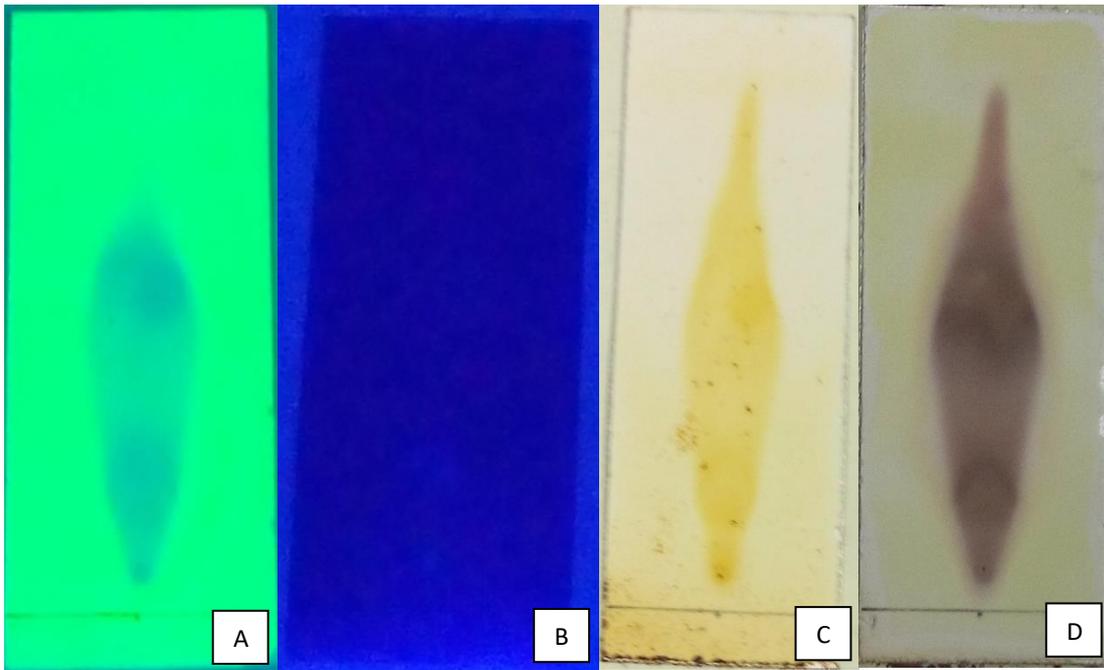


Figura 11 - Revelação das placas cromatográficas do extrato hexano dos calos cultivados *in vitro* de *Duroia saccifera*: A- Luz ultravioleta 254 nm; B- Luz ultravioleta 365 nm; C- iodo; D- Sulfato cérico.

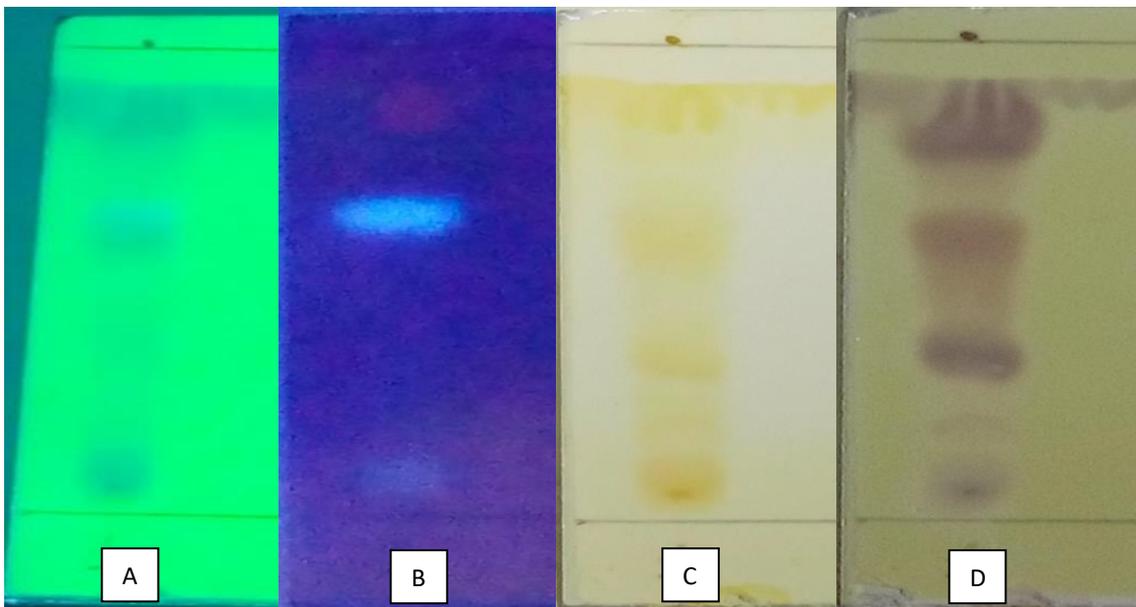


Figura 12 - Revelação das placas cromatográficas do extrato acetato de etila dos calos cultivados *in vitro* de *Duroia saccifera*: A- Luz ultravioleta 254 nm; B- Luz ultravioleta 365 nm; C- iodo; D- Sulfato cérico.

Para o extrato acetato de etila o sistema de eluição AcOEt/acetona 1:1 indicou a presença de terpenos e substâncias alifáticas, tendo uma melhor separação e permitindo a análise com os reveladores químicos e físicos (figura 10).

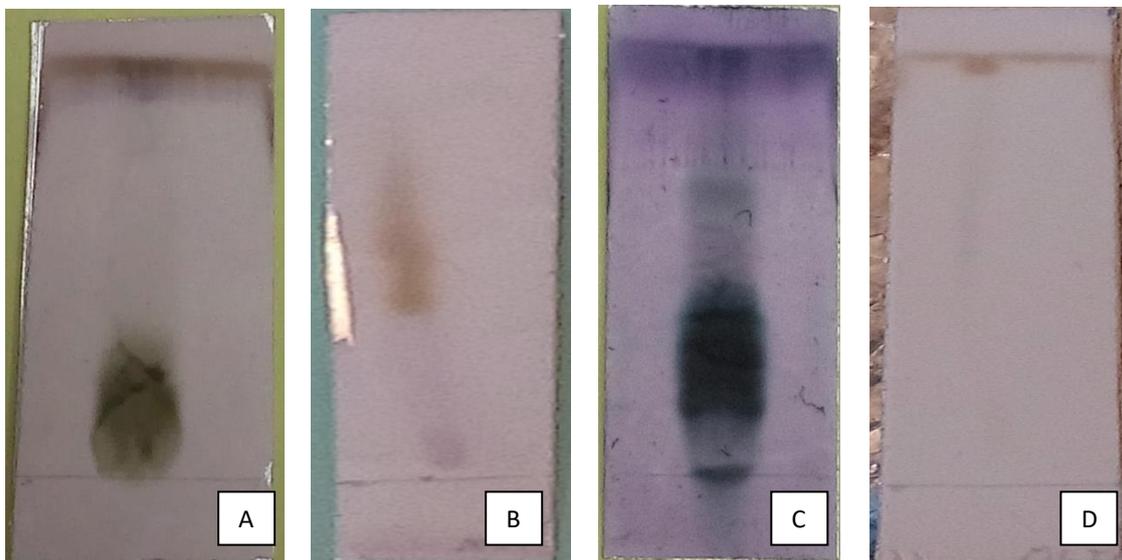


Figura 13 - Revelação das placas cromatográficas do extrato metanólico. Revelador: anisaldeído sulfúrico; A - clorofórmio/MeOH/H₂O 70:30:4; B - clorofórmio/MeOH/H₂O 5:5:1; C - clorofórmio/ácido acético/MeOH/H₂O 60:32:12:8; D - clorofórmio/ácido acético/MeOH/H₂O 50:40:12:10

Para o extrato metanólico, diversos sistemas de eluição foram avaliados, entre eles: clorofórmio/MeOH/H₂O 70:30:4 e 5:5:1, clorofórmio/ácido acético/MeOH/H₂O 60:32:12:8 e 50:40:12:10, porém nenhum mostrou ser capaz de separar satisfatoriamente as substâncias presentes (figura 11).

4.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

4.6.1 Ressonância Magnética Nuclear do extrato hexânico

A análise do espectro de RMN de ¹H do extrato hexânico dos calos (figura 12) indicou a presença de algumas classes químicas:

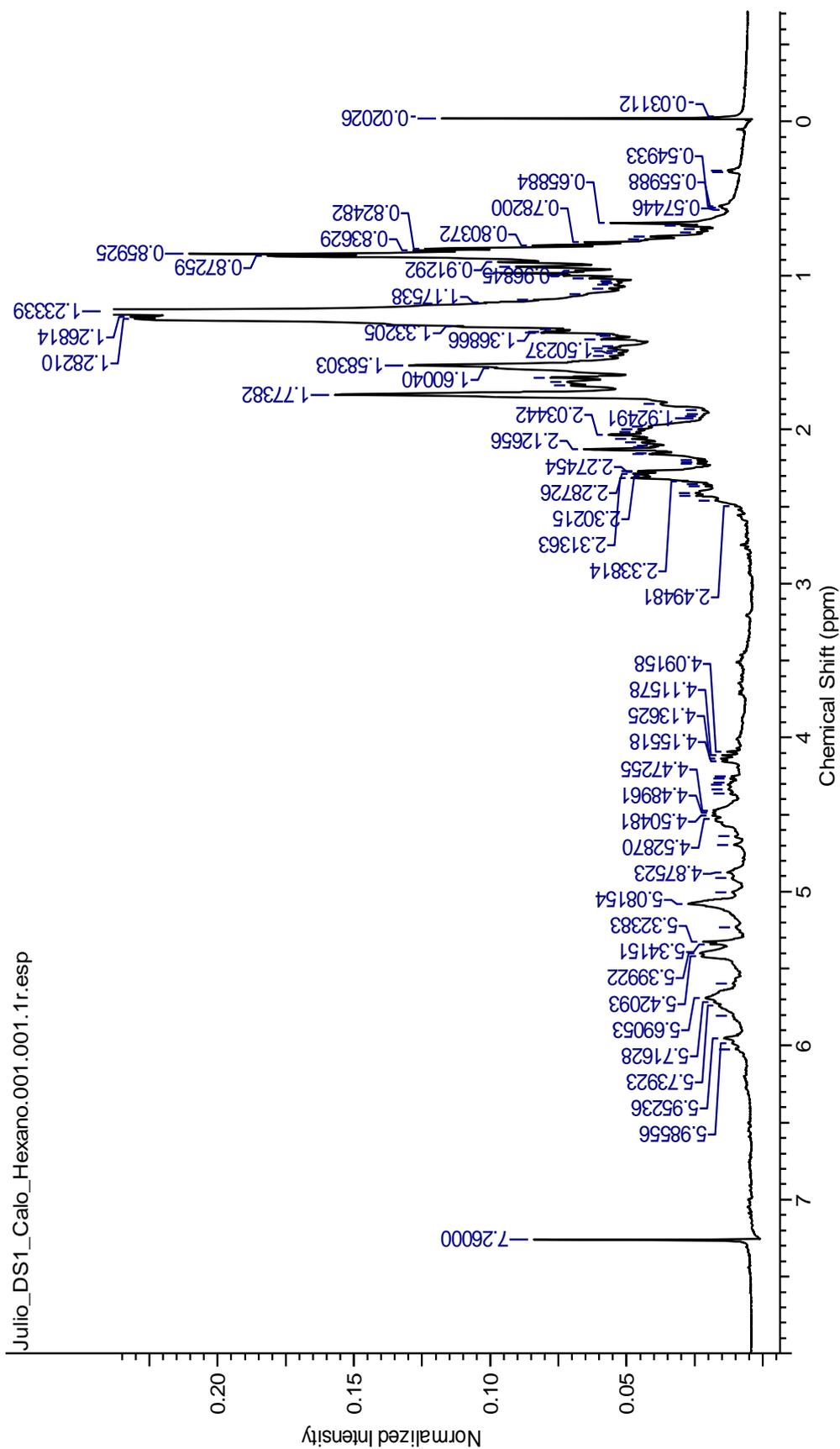


Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico (300 MHz, CDCl_3) dos calos de *Duroia saccifera*.

Presença de terpenos (esteroides e outros), pelos sinais entre 5 e 6 ppm, referentes à hidrogênios de ligações duplas isoladas, entre 4 e 5 ppm referentes à hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos (com oxigênio ligado), presença de diversos sinais de metilas entre 0,6 e 1,0 ppm.

- Presença de alcanos e alcenos de cadeias longas (“graxa”), pelo sinal bem intenso em 1,25 ppm, referente aos hidrogênios de CH₂ de cadeias alifáticas longas, e outro em 0,86 ppm referente às metilas terminais das cadeias dos alcanos e alcenos.

Para tentar purificar os terpenos presentes, o extrato hexânico foi submetido à uma cromatografia em coluna aberta, descrita na metodologia.

4.6.2 Ressonância Magnética Nuclear do extrato acetato de etila

A análise do espectro de RMN de ¹H do extrato acetato de etila dos calos (figura 13) indicou a presença de algumas classes químicas:

- Presença de terpenos (esteroides e outros), pelos sinais entre 5 e 5,5 ppm, referentes à hidrogênios de ligações duplas isoladas, entre 3 e 4,5 ppm referentes à hidrogênios ligados a carbonos carbonílicos (com oxigênio ligado), presença de diversos sinais de metilas entre 0,6 e 1,2 ppm. A concentração destes é bem maior do que nos extratos hexânicos.

- Presença de alcanos e alcenos de cadeias longas (“graxa”), pelo sinal bem intenso em 1,25 ppm, referente aos hidrogênios de CH₂ de cadeias alifáticas longas, e outro em 0,86 ppm referente às metilas terminais das cadeias dos alcanos e alcenos. Porém, neste caso, a concentração de alcanos e alcenos é bem menor que no extrato hexânico.

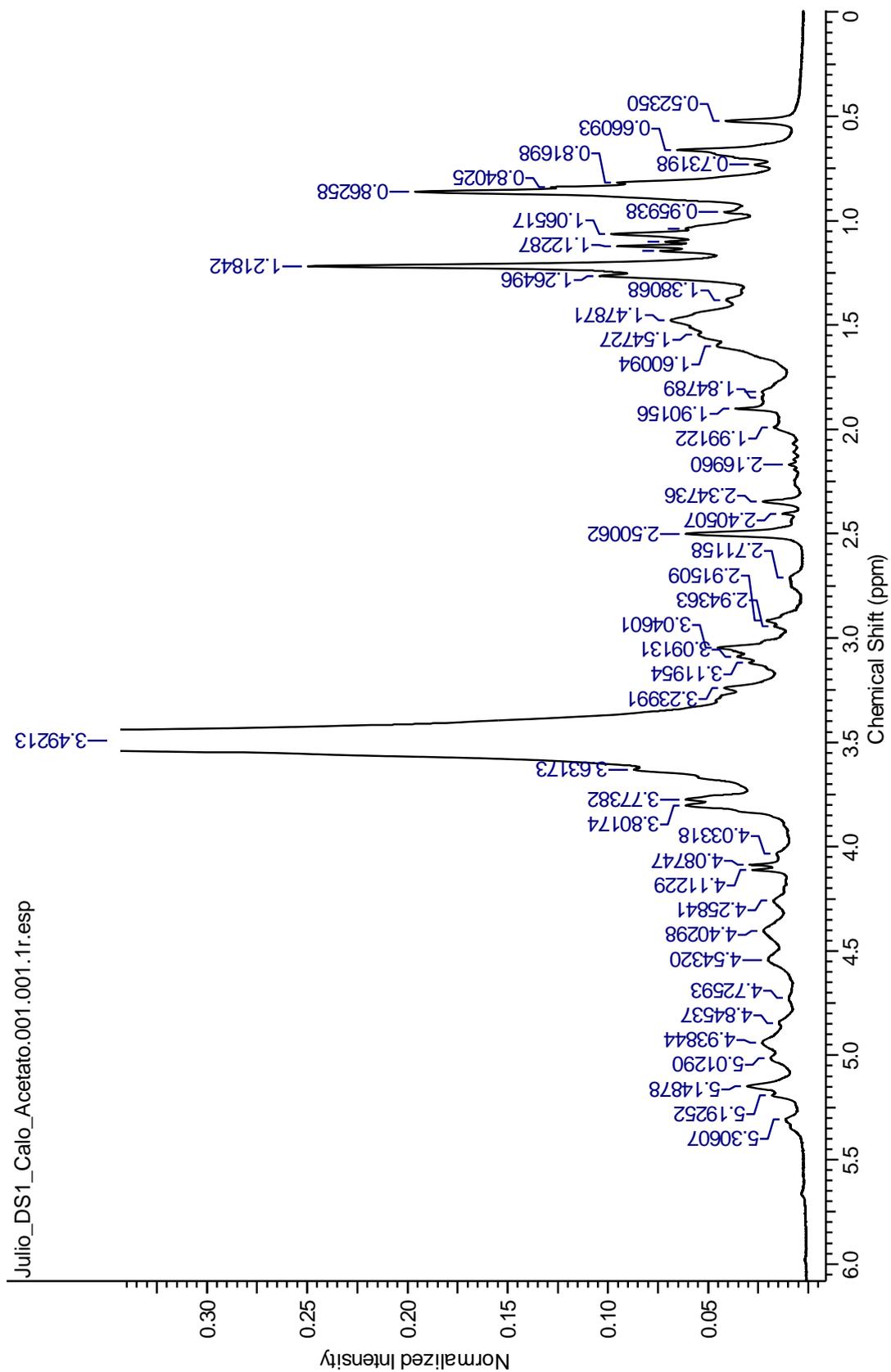


Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H do extrato acetato de etila (300 MHz, CDCl_3) dos calos de *Duroia saccifera*.

4.6.3 Ressonância Magnética Nuclear do extrato metanólico

A análise do espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico dos calos (figura 14) indicou a presença de alta concentração de açúcares, pelos sinais bem intensos entre 3 e 4,4 ppm referentes à hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos (com oxigênio ligado), e a presença de três sinais de hidrogênios anoméricos, sendo um em 5,20 ppm ($d, J = 3,8$ Hz, $\text{H}\beta$, forma α de açúcar), em 5,02 ppm ($d, J = 3,7$ Hz, $\text{H}\beta$, forma α de açúcar), e 4,43 ppm ($d, J = 7,9$ Hz, $\text{H}\alpha$ forma β de açúcar).

Com isto, constata-se que há três açúcares majoritários no extrato metanólico dos calos, na proporção de 1:1,2:1,8. O sinal em 4,43 ppm é indicativo da presença de β -glicose. No meio de cultura foram adicionados os açúcares sacarose e mio-inositol. O deslocamento químico do hidrogênio anomérico da sacarose é 5,42 ppm (ARAÚJO, 2010), já os hidrogênios pertencentes ao mio-inositol possuem deslocamentos químicos numa faixa mais ampla (ABRAHAM, 2005), não possuindo um valor mais específico. Com isto, conseguimos descartar a presença de sacarose no extrato metanólico, mas não a do mio-inositol. Assim, observa-se que as células de calos metabolizaram a sacarose em três açúcares: 1 (ainda desconhecido), 1,2 (ainda desconhecido) e (1,8) β -glicose.

4.6.4 Ressonância Magnética Nuclear da Fração HEXF1 29-37

A análise do espectro de RMN de ^1H da Fração HEXF1 29-37 (figura 15) indicou a presença de algumas classes químicas:

- Presença de terpenos (esteroides e outros), pelos sinais entre 5 e 6 ppm, referentes à hidrogênios de ligações duplas isoladas, entre 4 e 5 ppm referentes à hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos (com oxigênio ligado), presença de diversos sinais de metilas entre 0,6 e 1,0 ppm.
- Presença de alcanos e alcenos de cadeias longas (“graxa”), pelo sinal bem intenso em 1,25 ppm, referente aos hidrogênios de CH_2 de cadeias alifáticas longas, e outro em 0,86 ppm referente às metilas terminais das cadeias dos alcanos e alcenos.

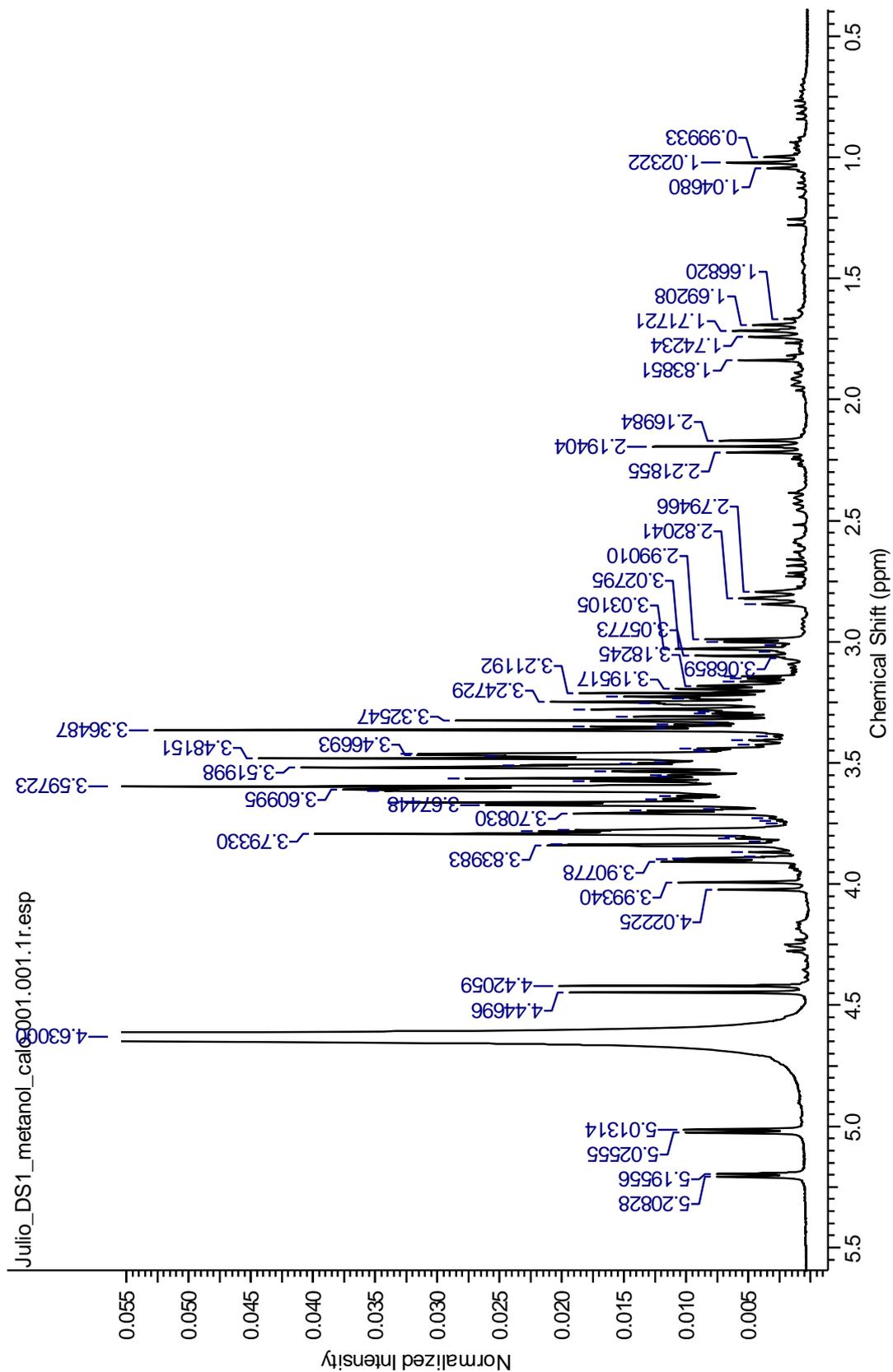


Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico (300 MHz, CDCl_3) dos calos de *Duroia saccifera*.

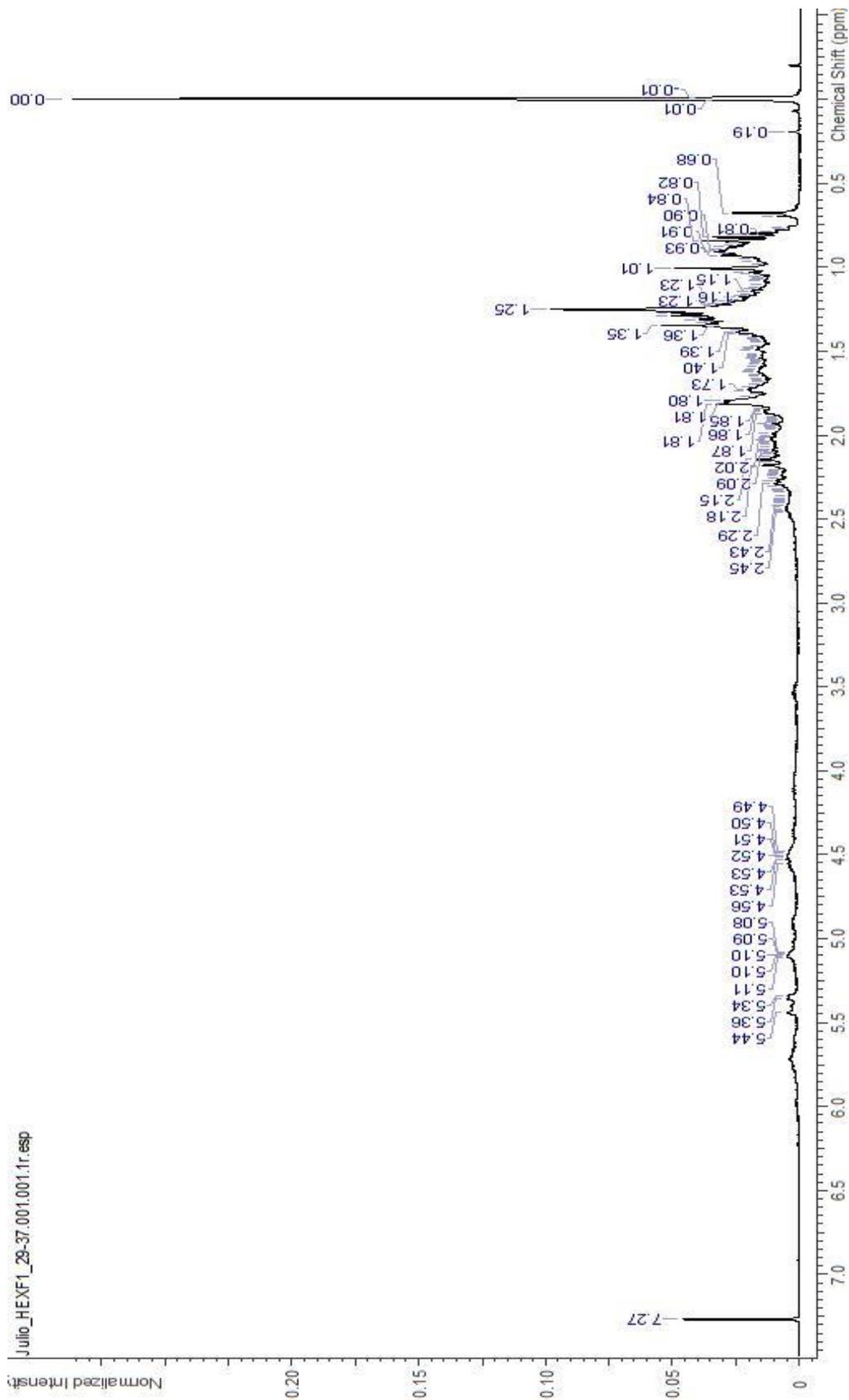


Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H da fração HEXF1 29-37 (300 MHz, CDCl_3) dos calos de *Duroia saccifera*.

4.6.5 Ressonância Magnética Nuclear da Fração HEXF4-5 4

A análise do espectro de RMN de ^1H da Fração HEXF4-5 4 (figura 16) indicou a presença de:

- Alcanos e alcenos de cadeias longas (“graxa”), pelo sinal bem intenso em 1,25 ppm, referente aos hidrogênios de CH_2 de cadeias alifáticas longas, e outro em 0,86 ppm referente às metilas terminais das cadeias dos alcanos e alcenos.
- Presença do contaminante ftalato, pelos sinais entre 7,5 e 7,7 ppm, provavelmente do solvente comercial utilizado.

4.6.6 Ressonância Magnética Nuclear da Fração HEXF4-5 5-6

A análise do espectro de RMN de ^1H da Fração HEXF4-5 5-6 (figura 17) indicou a presença de algumas classes químicas:

- Presença de alcanos e alcenos de cadeias longas (“graxa”), pelo sinal bem intenso em 1,25 ppm, referente aos hidrogênios de CH_2 de cadeias alifáticas longas, e outro em 0,86 ppm referente às metilas terminais das cadeias dos alcanos e alcenos.

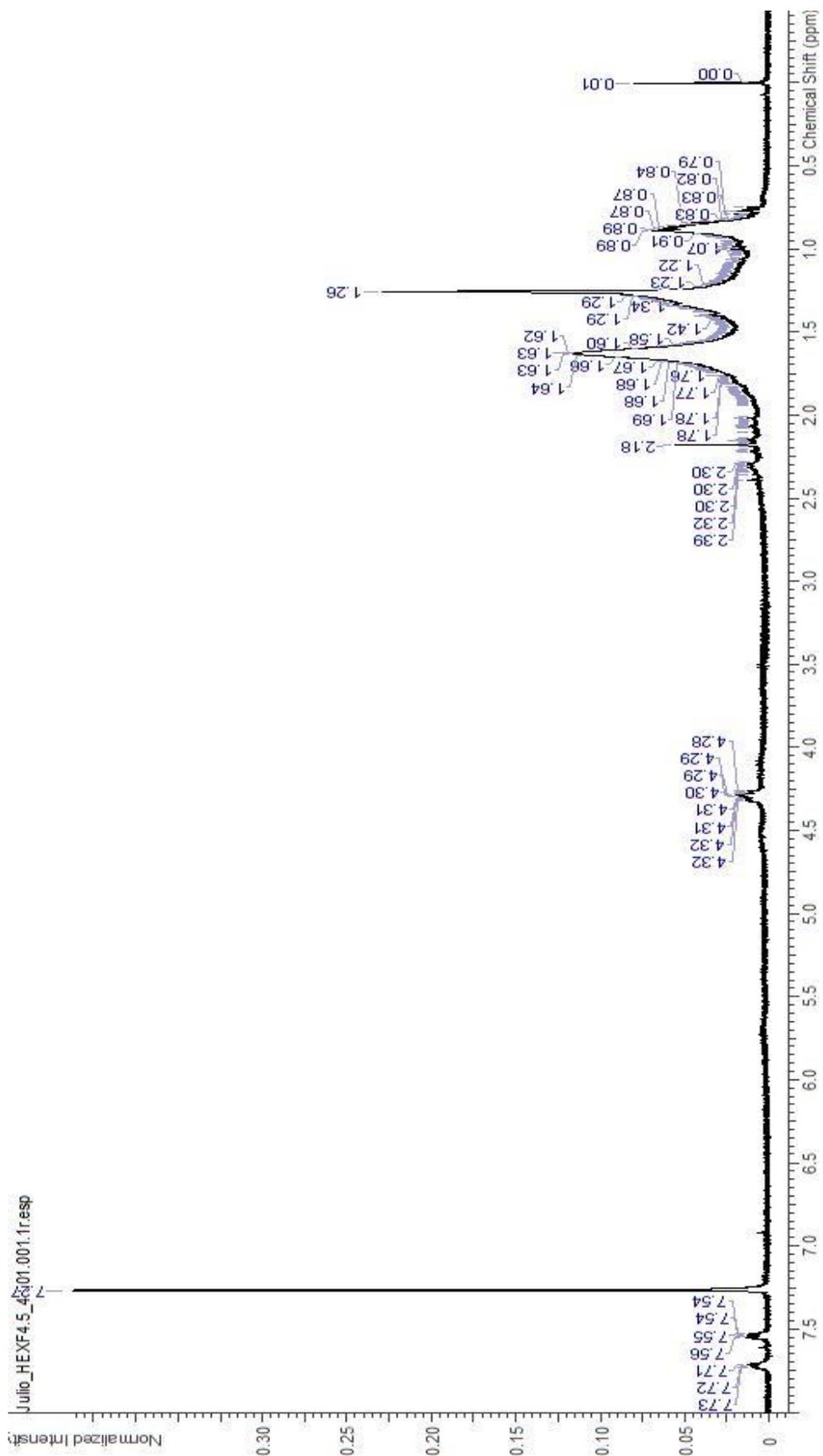


Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H da fração HEXF4-5 4 (300 MHz, CDCl_3)

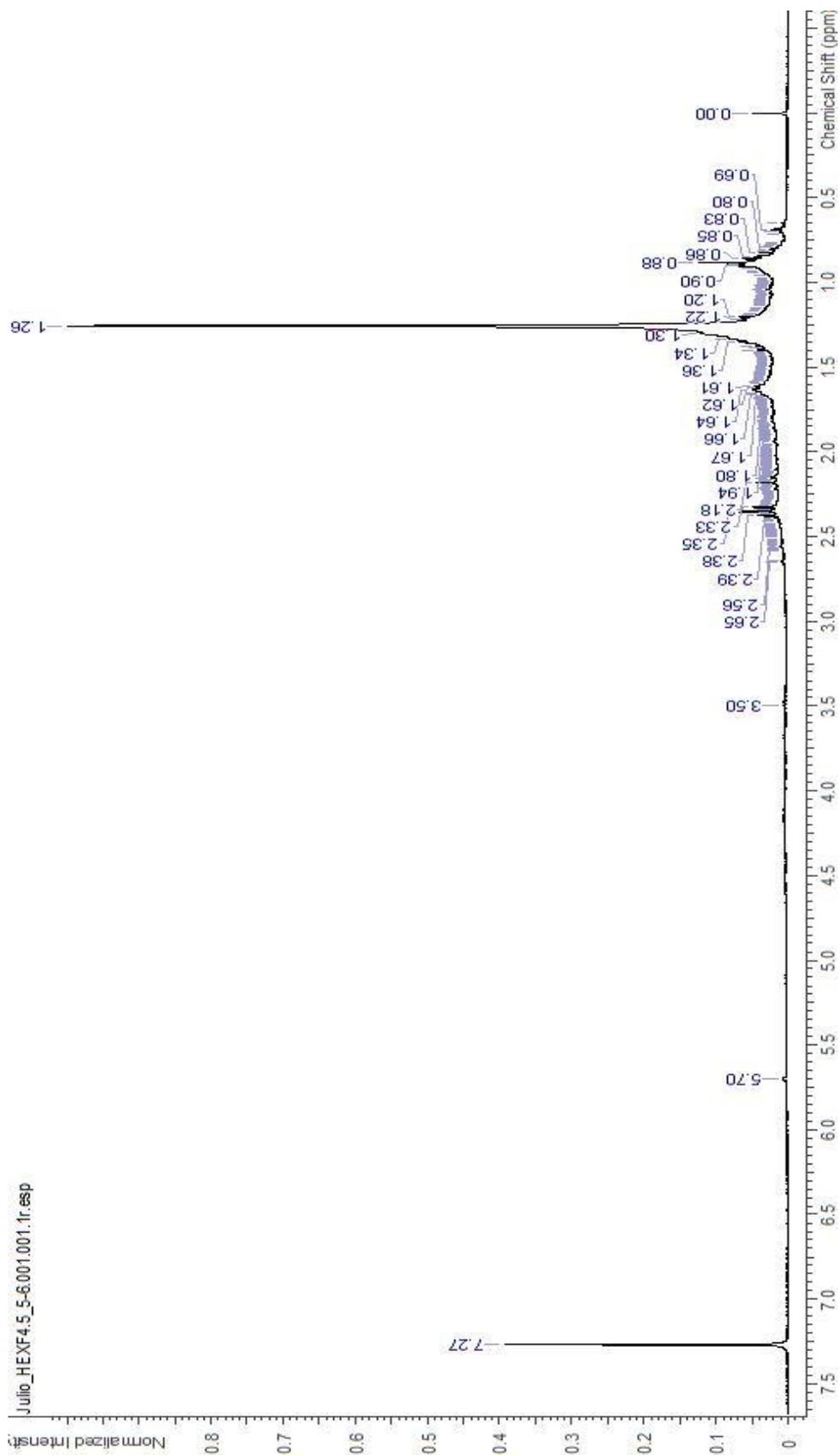


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H da fração HEXF4-5 5-6 (300 MHz, CDCl_3)

4.6.7 Ressonância Magnética Nuclear da Fração HEXF6-7 19-20

A análise do espectro de RMN de ^1H da Fração HEXF6-7 19-20 (figura 18) indicou a presença de algumas classes químicas:

- Presença de alcanos e alcenos de cadeias longas (“graxa”), pelo sinal bem intenso em 1,25 ppm, referente aos hidrogênios de CH_2 de cadeias alifáticas longas, e outro em 0,86 ppm referente às metilas terminais das cadeias dos alcanos e alcenos.

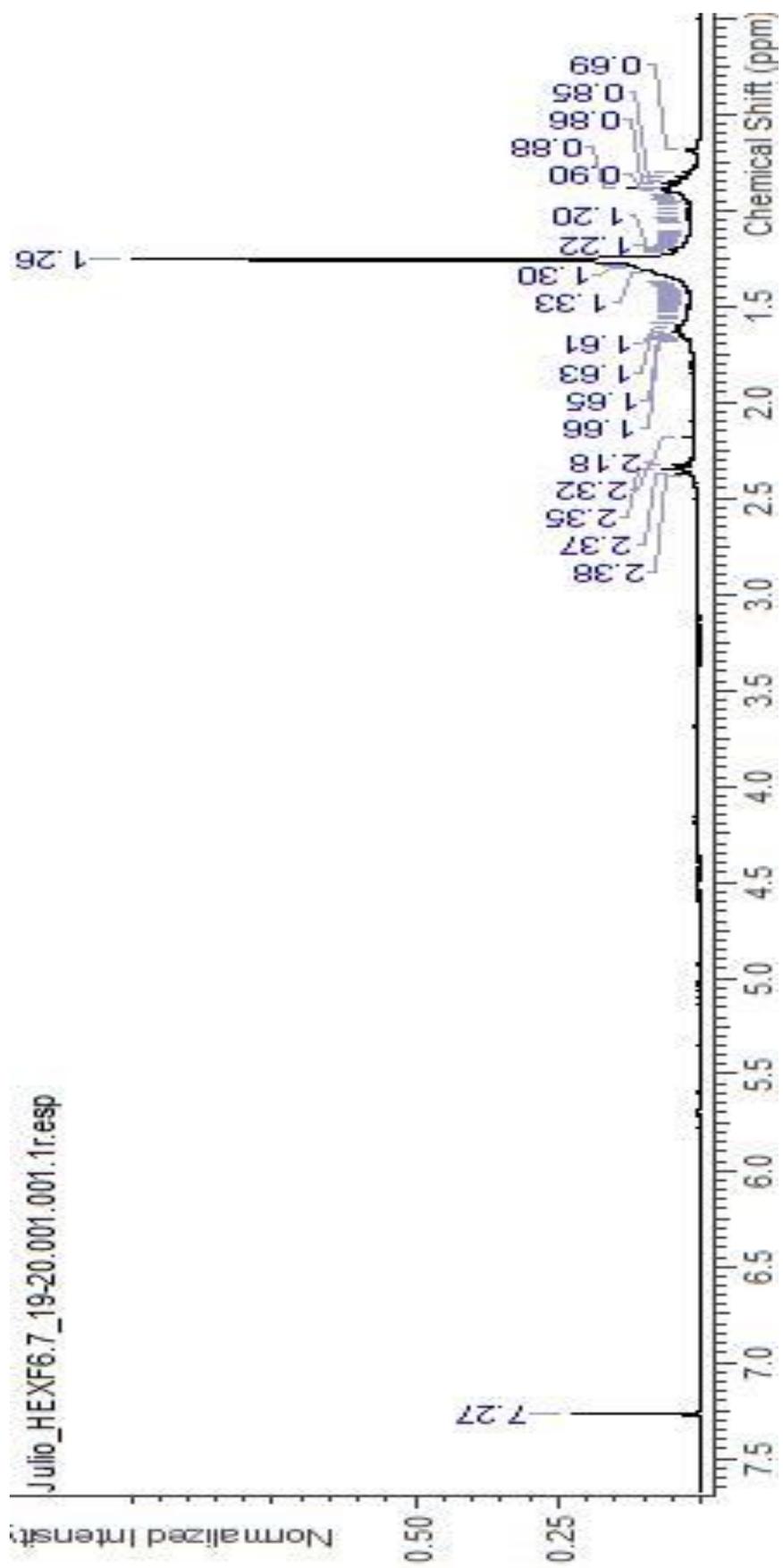


Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H da fração HEXF6-7 19-20 (300 MHz, CDCl_3)

4.7 Atividades Biológicas:

4.7.1 Atividade Fosfolipásica

Pelos resultados, podemos observar que o extrato acetato de etila e o extrato hexânico tiveram uma atividade significativa na inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops atrox* (figura 19), sendo que o extrato hexânico teve uma porcentagem de inibição sobre o veneno de 60% na proporção de 1:10.

Segundo Vilar et al. (2005), em um levantamento feito para verificar a ação de extratos de plantas contra o veneno de serpentes, foram citados vários compostos como tendo possível ação antiofídica, entre eles triterpenos, esteroides, fenóis e flavonoides. Como foi observado nas análises de RMN, tanto o extrato hexânico quanto o extrato acetato de etila apresentaram picos que indicam a presença de terpenos e esteroides, que podem ser responsáveis pela ação de neutralização do veneno. O extrato metanólico não apresentou bloqueio efetivo, não havendo diferença significativa quando comparado com o grupo controle somente com o veneno.

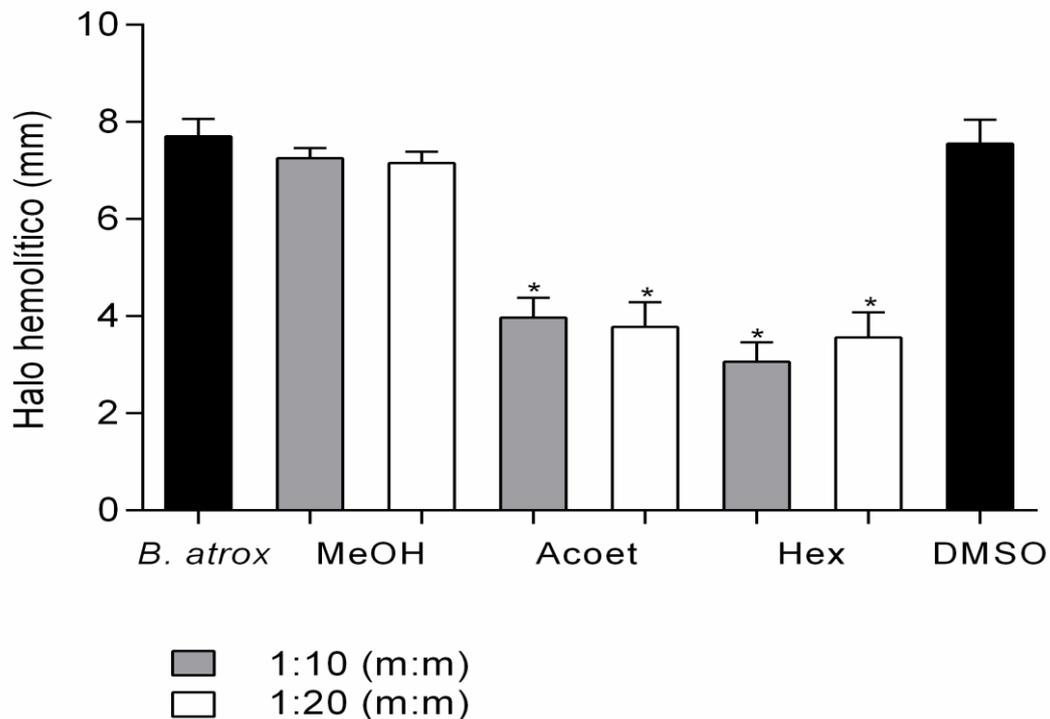


Figura 21 - Potencial de bloqueio dos extratos de *Duroia saccifera* frente à atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops atrox*, protocolo de pré-incubação nas proporções de 1:10 e 1:20 veneno:extratos (m:m). * $p < 0,005$

4.7.2 Atividade Antimicrobiana

Os acidentes ofídicos podem ocasionar infecções secundárias causadas por bactérias presentes na cavidade oral das serpentes ou na microbiota presente na pele da vítima, que são inoculadas junto com a peçonha (GRICE et al., 2011). Os abscessos resultantes destas infecções representam um fator de risco para a amputação de membros (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2009). Muitas cepas de microrganismos têm surgido apresentando resistência às terapias de antibióticos preconizadas, fato devido, entre outros fatores, ao uso indiscriminado de drogas antimicrobianas e também à transferência horizontal de genes entre os microrganismos. Os padrões de resistência aos antimicrobianos também são influenciados pela localização geográfica, ano em que as cepas isoladas foram obtidas, classe dos agentes antimicrobianos e a pressão exercida pelo uso destes antibióticos (PEIRANO et al., 2006). Por estes motivos, faz-se importante

a busca por novos ativos contra os microrganismos, sendo de notável relevância que estes ativos sejam eficazes também contra os efeitos da peçonha de serpentes.

O teste por difusão em ágar indicou que os extratos testados, quando na concentração de 2 mg/mL, possuem efeito inibitório no crescimento de nove bactérias e uma levedura. A alta atividade inibitória (considerando halo inibitório acima de 1,3 cm) foi apresentada pelo extrato hexânico quando testado frente à *Candida albicans*, *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aeruginosa*; e pelo extrato de acetato de etila frente à *P. aeruginosa*. Os demais resultados demonstraram média (até 1,3 cm) ou baixa atividade inibitória (até 0,7 cm) em relação ao crescimento das bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Edwardsiella tarda*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* (tabela 20).

Para esta concentração de extrato utilizada no ensaio, não foram detectados halos de inibição do crescimento de *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella entérica* e *Serratia marcescens*. O controle utilizado foi o antibiótico oxitetraciclina (125 µg/mL).

Tabela 20 - Resultado do ensaio de halo de inibição de microrganismos

Microrganismo	Atividade		
	Hexano	AcoET	Metanol
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Média	Média	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Média	-	-
<i>Candida albicans</i>	Alta	Média	-
<i>Citrobacter feundii</i>	Alta	Média	Média
<i>Edwardsiella tarda</i>	Média	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	Média	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alta	Alta	Média
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Média	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Média	-	-
<i>Yersinia esnterocolitica</i>	Baixa	-	-

Com relação ao ensaio de CIM (concentração inibitória mínima) (tabela 21), os resultados indicaram que o extrato hexânico tem maior potencial para inibir o crescimento microbiano das cepas testadas do que os extratos metanólico e de acetato de etila. Para as cepas utilizadas de *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, o extrato hexânico foi mais eficaz na concentração de 1000 µg/mL.

Frente as cepas utilizadas de *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus*, o extrato hexânico foi mais eficaz para reduzir o crescimento bacteriano na CIM de 500 µg/mL. Para a cepa de *Pseudomonas fluorescens*, foi observada redução do crescimento em 250 µg/mL. Para *Candida albicans*, foi observada uma pequena redução do crescimento em 1000µg/mL..

Os resultados encontrados em outras pesquisas com espécies da família Rubiaceae podem corroborar as atividades antimicrobianas observadas neste estudo. Niño et al. (2006) observou a atividade de outra Rubiaceae (*Gonzalagunia rosea*) frente à *Candida albicans*. Substâncias isoladas de *Heterophyllaea pustulata* foram ativas frente à *Staphylococcus aureus* (COMINI et al., 2011). Uma revisão de literatura sobre esta família revela que 48 dos seus 611 gêneros são estudados por suas atividades antimicrobianas (CHOUDHURY et al., 2012).

O extrato hexânico, que foi o mais ativo nos ensaios antimicrobianos, apresenta sinais no RMN que indicam a presença de terpenos. A família Rubiaceae se destaca pela produção de metabólitos secundários e entre as classes encontradas estão os terpenos (MARTINS e NUNEZ, 2015). Por exemplo, a espécie *Duroia macrophylla*, que apresentou atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* e de onde foram isolados dois triterpenos (MARTINS et al., 2013). A propriedade antibacteriana dos terpenos pode estar relacionada às propriedades lipofílicas desta classe de metabólitos e suas interações com as bicamadas fosfolipídicas das células dos microrganismos (DORMAN e DEANS, 2000).

Tabela 21 - Potencial antibacteriano do extrato hexânico sobre diferentes microrganismos (CIM)

Microrganismo	Hexano µg/mL
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	250
<i>Aeromonas hydrophila</i>	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	500
<i>Yersinia enterocolitica</i>	500
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1000
<i>Candida albicans</i>	1000
<i>Citrobacter freundii</i>	1000
<i>Edwardsiella tarda</i>	1000

4.7.3 Atividades Citotóxica em Células Tumorais e não-tumorais

As atividades citotóxicas e antitumoral foram avaliadas utilizando as linhagens celulares tumorais: adenocarcinoma de mama (MCF-7), melanoma humano (SK-Mel-3), carcinoma coloretal (HTC-116) e uma linhagem celular não tumoral: fibroblasto humano (MRC 5). Com relação às células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) o extrato hexânico foi o que demonstrou atividade em menor concentração (tabela 21) com relação aos extratos acetato de etila e metanol. Fato também observado nos ensaios com carcinoma coloretal (HTC-116) e fibroblasto humano (MRC5). No ensaio com melanoma humano (SK-Mel-3) o extrato acetato de etila foi o mais efetivo em relação aos outros extratos.

Foram necessárias concentrações muito menores de extratos para atingir 50% das células de melanoma humano do que para atingir os fibroblastos. Da mesma forma, para o extrato hexânico foi necessária uma concentração muito menor para o adenocarcinoma de mama do que para os fibroblastos. É importante ressaltar que os fibroblastos são oriundos de linhagens não tumorais, portanto há um indicio de que

nesses extratos de calo testados pode haver substâncias com atividade antitumorais que não prejudicam células normais.

Como foi discutido anteriormente, o extrato hexânico apresenta sinais no RMN que indicam a presença de terpenos e esteroides, sendo que estes são usados em medicamentos para o tratamento de câncer, principalmente o câncer de mama (MACIEL et al., 2007), por exemplo o taxol, que é um diterpeno com ação antitumoral obtido a partir de plantas do gênero *Taxus*.

A doxorubicina utilizada como controle no experimento é um quimioterápico comercial já utilizado no tratamento de câncer. Em função disso, foram necessárias quantidades muito menores para atingir 50% das células. Portanto, apesar de o extrato hexânico ser aproximadamente 60 vezes menos potente que a droga-referência, apresenta um potencial interessante a ser explorado buscando-se terpenos e esteroides, que poderiam estar em sinergia com outras substâncias, diminuindo seu potencial citotóxico sobre as células tumorais.

Tabela 22 - Efeito de CI₅₀ dos extratos acetato de etila, metanol e hexano em células tumorais e uma linhagem normal

Células	Histotipo	Acetato	Metanol	Hexano	Doxorrubicina
µg/mL					
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	239,2	>500	61,1	1,71
SK-Mel-3	Melanona humano	51,4	98,3	83,1	0,50
HCT-116	Carcinoma colorectal	313,7	>500	102,2	1,02
MRC5	Fibroblasto humano	277,7	>500	179,9	1,61

A família Rubiaceae já possui descrito na literatura diversas espécies que possuem atividade antitumoral, como por exemplo *Anthocephalus cadamba* que obteve um resultado significativo na diminuição do carcinoma de Ehrlich , um carcinoma mamário de camundongo (DOLAI et al., 2012), e *Morinda citrifolia* que foi eficiente na inibição de células de melanoma de rato (CANDIDA et al., 2014). Ambas as plantas possuem em comum a presença de terpenos em sua composição, o que vai de encontro com o que foi identificado na espécie de estudo. No gênero *Duroia* foi relatado efeitos antitumorais apenas na espécie *Duroia macrophylla* (NUNEZ e VASCONCELOS, 2012). Não foi encontrada na literatura nenhuma referência para antitumoral da espécie *Duroia saccifera*, tornando de extrema relevância estudos mais aprofundados desta espécie.

5 CONCLUSÕES

- A germinação *in vitro* de sementes de *Duroia saccifera* foi obtida de modo satisfatório utilizando GA₃ na composição do meio de cultura, sendo que não é necessária uma desinfestação mais elaborada para o estabelecimento *in vitro*.
- Indução de calo em *Duroia saccifera* só ocorreu satisfatoriamente quando na presença combinada da auxina 2,4-D e da citocinina KIN.
- Multiplicação dos calos ocorreu de forma mais intensa também na presença de 2,4-D e KIN nas mesmas concentrações utilizadas na fase de indução, o que pode apontar uma boa estabilidade fisiológica das células.
- A extração dos calos só foi obtida após incluirmos na metodologia empregada a pulverização da massa de calo seca.
- A análise por CCDC e RMN de ¹H indicaram a presença de terpenos e substâncias alifáticas (“graxas”) nos extratos hexânico e acetato de etila dos calos, sendo maior a concentração de substâncias alifáticas no extrato hexânico e maior a de terpenos no extrato acetato de etila. No extrato metanólico há a presença majoritária de três açúcares, na proporção de 1:1,2:1,8, sendo que o majoritário foi identificado como sendo a β-glicose. Os demais não foram identificados até o fechamento deste trabalho.
- Os extratos hexânico e acetato de etila apresentaram atividade significativa na inibição da atividade fosfolipásica do veneno da serpente *Bothrops atrox*.
- O extrato hexânico apresentou atividade antimicrobiana contra microrganismos presentes na cavidade oral de serpentes.
- O extrato hexânico apresentou uma atividade mediana quando comparado com a doxorrubicina sobre a linhagem de adenocarcinoma de mama, e baixo potencial citotóxico sobre as demais linhagens celulares tumorais testadas e sobre a linhagem não tumoral. Enquanto que os extratos acetato de etila e metanólico apresentaram baixo potencial citotóxico sobre todas as linhagens testadas.

6 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R.J.; BYRNE, J.B.; GRIFFITHS, L.; KONIOTOU, R. ^1H chemical shifts in NMR: Part 22 – Prediction of the ^1H chemical shifts of alcohols, diols and inositols in solution, a conformational and solvation investigation. *Magn. Reson. Chem.*,43: 611–624, 2005.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211- 224, 1994.
- AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: *Plant tissue and cell culture*. 2 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications ed.H.E. Street, p.267-306, 1977
- ALI, M., ABBASI, B, H. Light-induced fluctuations in biomass accumulation, secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 140 (2014) 223–227.
- ALMEIDA, J.L.; DINIZ, J.D.N.; OLIVEIRA, A.B.; HERNANDEZ, F.F.F. Propagação *in vitro* de *Mussaenda* (*Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea). *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, v. 40, n. 2, p. 206-212, abr./jun., 2010.
- ARAÚJO, N. V. P. ; ALVES FILHO, E. G. ; SILVA, L. M. A. ; LIAO, L. M. ; ALCANTARA, G. B. . Quantificação de sacarose em xaropes pediátricos por RMN ^1H .. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.
- BASTOS, H.M. LOPES, L.F.L. GATTAMORTA, M.A. MATUSHIMA, E.R. Prevalence of enterobacteria in *Bothrops jararaca* in São Paulo State: microbiological survey and antimicrobial resistance standards, *Acta Sci. Biol. Sci. Maringá*, v. 30, n. 3, p. 321-326, 2008.
- BLAYLOCK, R.S.M. Normal oral bacterial flora from some Southern african snakes, Onderstepoort *Journal of Veterinary Research*, 68:175-182, 2001.
- CANDIDA, T. FRANÇA, J.P. CHAVES, A.L.F. LOPES, F.A.R. GAIBA, S. SACRAMENTO, C.K. FERREIRA, L.M. FRANÇA, L.P. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil, *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 29 (supl. 2)* 2014.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, S. A.; HADDAD, V. J. In: *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Ed. Sarvier. 2003.
- CETIN, E.S. BABALIK, Z. HALLAC-TURK, F. GOKTURK-BAYDAR, N. The effects of cadmium chloride on secondary metabolite production in *Vitis vinifera* cv. cell suspension cultures, *Biological Research*, 47:47, 2014.
- CETIN, E.S. Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis Vinifera* L. Öküzgözü callus cultures. *Biological Research*, 47:37, 2014.

- CHOUHDURY, K. D. CHOUHDURY, M. D. BARUAH, M. "Antibacterial activity of some plants belonging to the family Rubiaceae: a review," World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 1, no. 3, pp. 1170–1192, 2012.
- CID, L.P.B.; TEIXEIRA, J.B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cultivo *in vitro* de plantas, Cid, L.P.B.; editor técnico. – 2. ed. – Brasília, DF : Embrapa, 2012.
- COMINI, L.R. NÚÑEZ MONTOYA, S.C. ,PÁEZ, P.L. ARGÜELLO, G.A. ALBESA, I. CABRERA, J.L. Antibacterial activity of *anthraquinone derivatives* from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae), Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 102, 108–114, 2011.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, 15(3):183-205, 2001.
- COSTA, P., GONÇALVES. S., VALENTÃO. P., ANDRADE, P. B., COELHO, N., ROMANO, A. Thymus lotocephalus wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*. v. 135, p1253-1260, 2012.
- CUSIDO, R. M.; ONRUBIA, A.; SABATER-JARA, A. B.; MOYANO, E. BONFILL, M. GOOSSENE, A.; PEDREÑO, M. A.; PALAZON, J. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp *Biotechnology Advances* 32, 1157–1167. 2014.
- DAVIES, K. M.; DEROLE, S. C. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 26:133–140. 2014.
- DEEPTHI, S., SATHEESHKUMAR, K. Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 124:483–493. 2016.
- DIAS, M. I. ; SOUSA, M. J.; ALVES, R. C.; FERREIRA, I.C.F.R., Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review, *Industrial Crops and Products*. 82 9–22. 2016.
- DOLAI, N. KARMAKAR, I. SURESH KUMAR, R.B. KAR, B. BALA, A. HALDAR, P.K. Evaluation of antitumor activity and in vivo antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice, *Journal of Ethnopharmacology* 142, 865–870, 2012.
- DORMAN, H.J.D. AND DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology* , 88, 308–316, 2000.
- DOS-SANTOS, M. C.; MARTINS, M.; BOECHAT, A. L.; SÁ-NETO, R. P.; OLIVEIRA, M. E. Serpentes de interesse médico da Amazônia, UFAM/SESU: Manaus, 1995.
- DOS-SANTOS, M.C. Serpentes peçonhentas e ofidismo no Amazonas. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD JR., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes* 2. Sarvier, São Paulo, pp. 115–125, 2009.
- ELOFF, J., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica* 64: 711-713.

- FATIMA, S., MUJIB, A., TONK, D. NaCl amendment improves vinblastine and vincristine synthesis in *Catharanthus roseus*: a case of stress signalling as evidenced by antioxidant enzymes activities. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 121:445–458. 2015.
- FERREIRA, R.; VARELLA, T.L.; HUNHOFF, V.L.; SILVA, M.L. Germinação *in vitro* de sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.) *Biodiversidade - V.15, N1, pág. 46, 2016.*
- FIGUEIREDO, D.A.; VALE, P.A.A; MESQUITA, A.G.G.; FARIA, F.S.E.D.V. ; RODRIGUEZ, A.F.R. ; EGITO, E. S. T. *In vitro* Micropropagation and Callus Induction of Mulateiro (*Calycophyllum Spruceanum*) Seeds Collected from the Amazon Basin. *The International Journal of Science & Technoledge*, v. 2, p. 1-3, 2014.
- Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 13 Jul. 2016.
- FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUSA, I. M. O., RODRIGUES, R. A. F., 2006. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Construindo a História dos Produtos Naturais. http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm, acesso em abril de 2016.
- FONSECA, C.R. Amazonian ant-plant interactions and the nesting space limitation hypothesis. *Journal of Tropical Ecology*, 15:807-825, 1999.
- FONSECA, C.R. AND GANADE, G. Asymmetries, Compartments and Null Interactions in an Amazonian Ant-Plant Community. *Journal of Animal Ecology*, Vol. 65, No. 3, pp. 339-347, 1996.
- FRAGA, R. LIMA, A.P. PRUDENTE, A.L.C. MAGNUSSON, W.E. Guia de cobras da região de Manaus - Amazônia Central = Guide to the snakes of the Manaus region - Central Amazonia, texto bilíngue, Manaus: Editora Inpa, 303 p., 2013.
- FREDERICKSON, M.E. AND GORDON, D.M. The intertwined population biology of two Amazonian myrmecophytes and their symbiotic ants, *Ecology*. Jun;90(6):1595-607, 2009.
- FREDERICKSON, M.E. GREENE, M.J. GORDON, D.M. Ecology: 'Devil's gardens' bedevilled by ants, *Nature* 437, 495-496, 2005.
- FUKUYAMA, T. D., OHASHI-KANEKO, K., WATANABE, H. Estimation of Optimal Red Light Intensity for Production of the Pharmaceutical Drug Components, Vindoline and Catharanthine, Contained in *Catharanthus roseus* (L.) *Environ. Control Biol.*, 53 (4), 217-220, 2015.
- GARG, A. SUJATHA, S. GARG, J. ACHARYA, N.S. PARIJA, S.C. Wound infections secondary to snakebite, *J Infect Developing Countries*, 3(3):221-223, 2009.
- GBIF Secretariat: GBIF Backbone Taxonomy. doi:10.15468/39omei Accessed via <http://www.gbif.org/species/2892137> on 2016-07-31.
- GEORGIEV, M. I.; EIBL, R.; ZHONG, J. Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3787–3800 DOI 10.1007/s00253-013-4817-x, 2013.

- GONÇALVES, S., ROMANO, A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* Mar-Apr;31(2):166-74. 2012.
- GRANDTNER, M.M. CHEVRETTE, J. Dictionary of Trees, Volume 2: South America: Nomenclature, Taxonomy and Ecology, 2013.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, v. 1, . p.183-260. 1998.
- GRICE, E.A. SEGRE, J.A. The skin microbiome, *Nat Rev Microbiol.* April ; 9(4): 244–253, 2011.
- GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*, v. 50, p. 377-394, 2002.
- GUTIÉRREZ, J. M., AVILA, C., ROJAS, E., CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced, *Toxicon*, Vol . 26, No. 4, pp. 411-413, 1988.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD JR., V. (Eds.), *Animais peçonhentos No Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes 2*. Sarvier, São Paulo, pp. 352–375, 2009.
- HARTMANN, H.T.; KOFRANEK, A.M.; RUBATZKY, V.E. & FLOCKER, W.J. *Plant Science: growth, development and utilization of cultivated plants*. 2nd ed. New Jersey: Regents/Prentice Hall, 674p. 1988.
- HEITZMAN, M. E.; NETO, C. C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66(1):5-29, 2005.
- HU, S.-H., WANG, J.-C., KUNG, H.-F., WANG, J.-T., LEE, W.-L., YANG, Y.-H. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 20: 591-599, 2004.
- JORGE, M.T. MENDONÇA, J.S. RIBEIRO, L.A. DA SILVA, M.L.R. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada, *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 32(1): 6-10, janeiro-fevereiro, 1990.
- JORGE, M.T. NISHIOKA, DE OLIVEIRA, S.A.R.B. RIBEIRO, L.A. SILVEIRA, P.V.P. *Aeromonas hydrophila* soft-tissue infection as a complication of snake bite: report of three cases, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Vol. 92, No. 2, 213±217, 1998.
- JORGE, M.T. RIBEIRO, L.A. DA SILVA, M.L.R. Kusano, E.J.U. MENDONÇA, J.S. MICROBIOLOGICAL STUDIES OF ABSCESSSES COMPLICATING *BOTHROPS* SNAKEBITE IN HUMANS: A PROSPECTIVE STUDY, *Toxicron*, Vol 32, No. 6, pp. 743-718, 1994.
- KOKOTKIEWICZ, A., LUCZKIEWICZ, M. SOWINSKI, P. GLOD, D. GORYNSKI, K. BUCINSKI, A. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and in vitro cultures. *Food Chemistry*, v. 133, 2012.

- LAM, K.K. CROW, P. LEUNG NG, K.H. SHEK, K.H.C. FUNG, H.T. ADES, G. GRIONI, A. TAN, K.S. YIP, K.T. LUNG, D.C. QUE, T.L. LAM, T.S.K. SIMPSON, I.D. TSUI, K.L. KAM C.W. A cross-sectional survey of snake oral bacterial flora from Hong Kong, SAR, China, *Emerg Med J*, 28:107e114, 2011.
- LAVAGNINI, C.G.; DI CARNE, C.A.V.; CORREA, F.; TOKUMO, F.H.L.E.; SILVA, M.H.; SANTOS, P.C.S. Fisiologia vegetal – hormônio giberilina. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia – FAEF - Garça/SP - v.25 - n.1 - p.48-52 - jun. 2014.*
- LOPEZ, N. LOPERA, C. RAMÍRES, A. Características de los pacientes com accidente ofídico y complicaciones infecciosas atendidos em el hospital Pablo Tobón Uribe entre los años 2000 y 2006, *Acta médica colombiana*, vol. 33 n° 3, julio a septiembre, 2008.
- MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. Cv. Obatã. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, 2003.
- MACIEL, M.A.M.; GOMES, F.E.S.; PINTO, A.C.; CÓLUS, I.M.S.; MAGALHÃES, N.S.S.; Grynberg, N.F.; Echevarria, A. Aspectos sobre Produtos Naturais na Descoberta de Novos Agentes Antitumorais e Antimutagênicos *Revista Fitos Vol.3 Nº01 março 2007.*
- MARTINS, D. CARRION, L.L. RAMOS, D.F. SALOMÉ, K.S. SILVA, P.E.A. BARISON, A. NUNEZ, C.V. Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) Volume 2013, Article ID 605831, 7 p, 2013.
- MARTINS, D. FACHIN-ESPINARA, M.T. OLIVEIRA, T.A. LIMA, K.C.S. CAVALCANTI, R.M. TELES, B.R. NUNEZ, C.V. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *J Pharm Pharmacogn Res* 2(6): 158-171, 2014.
- MARTINS, D., FACHIN-ESPINAR, M. T., OLIVEIRA, T. A., LIMA, K. C. S., CAVALCANTE, R. M., TELES, B. R., NUNEZ, C. V. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2 (6), 158-171. 2014.
- MARTINS, D., NUNEZ, C. V. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules*, 20, 13422-13495. 2015.
- MATTHEW, REBECCA., SANKAR, P. DEEPA. COMPARISON OF MAJOR SECONDARY METABOLITES QUANTIFIED IN ELICITED CELL CULTURES, NON-ELICITED CELL CULTURES, CALLUS CULTURES AND FIELD GROWN PLANTS OF *Ocimum*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 6 Issue 2, 2014.
- MESQUITA, D.W.O.; MESQUITA, A.S.S.; CURSINO, L.M.C.; SOUZA, E.S.; OLIVEIRA, A.C.; PINHEIRO, C.C.S.; NOVAES, J.A.P.; OLIVEIRA, J.A.A.; NUNEZ, C.V. Atividades biológicas de espécies amazônicas de Rubiaceae. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.4, p.604-613, 2012.
- MOERKERCKE, A. V., FABRIS, M., POLLIER, J., GINO J.E. BAART, G. J. E., ROMBAUTS, S., HASNAIN, G., RISCHER, H., MEMELINK, J., OKSMAN-CALDENTY, K., GOOSSENS, A. CATHACYC. A Metabolic Pathway Database Built from *Catharanthus roseus* RNA-Seq Data. *Plant Cell Physiol*. 54(5): 673–685. 2013.

- MORAIS, T.P., LUZ, J.M.Q., SILVA, S.M., RESENDE, R.F., SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. Botucatu, v.14, n.1, p.110-121, 2012.
- MORS, W.B., NASCIMENTO, M.C., PEREIRA, B.M.R., PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snake bite-the molecular approach. Phytochemistry 55, 627–642, 2000.
- MOURA, V. M., BEZERRA, A. N. S., MOURÃO, R. H. V., LAMEIRAS, J. L. V., RAPOSO, J. D. A., SOUSA, R. L., BOECHAT, A. L., OLIVEIRA, R. B., CHALKIDIS, H. M., DOS-SANTOS, M. C. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (*Melastomataceae*) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. Toxicon. 85, 59-68, 2014.
- MOURA, V.M. DE, MOURÃO, R.H.V., DOS-SANTOS, M.C. Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécies vegetais como tratamento alternativo e complementar à soroterapia. Scientia Amazonia, v. 4, n.1, 73-74, 2015.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 15 (3): 473-497, 1962.
- MURTHY, H.N.; GEORGIEV, M.I.; PARK, S.Y; DANDIN, V.S.; PAEK. K.Y. The safety assessment of food ingredients derived from plant cell, tissue and organ cultures: A review Food Chemistry, v. 176 p. 426–432. 2015.
- NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacognosy Reviews, 1, 69–79. 2007
- NARAYANASWAMY, S. Plant cell and tissue culture. Nova Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. 1994.
- NIÑO, J. NARVÁEZ, D.M. MOSQUERA, O.M. CORREA, Y.M. antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight asteraceae and two rubiaceae plants from colombian biodiversity, Brazilian Journal of Microbiology, 37:566-570, 2006.
- NOSOV, A. M. Application of Cell Technologies for Production of Plant Derived Bioactive Substances of Plant Origin. Applied Biochemistry and Microbiology. v.48, n.7, p. 609–624. 2012.
- NUNES, E. C.; PILATTI, F. K.; RESCAROLLI, C. L. S.; GERBER, T.; BENSON, E. E.; VIANA, A. M. The in vitro conservation of plants native to the Brazilian Amazon and Atlantic Forests. p 347-372. In. NORMAH, M.N., CHIN, H.F.; REED, B.M. Conservation of Tropical Plant Species, Springer Science+Business Media, New York. 528 p. 2013.
- NUNEZ, C. V.; MARTINS, D.; RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A. Uso de composto, método *ex-vivo*, processo e extrato purificado. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140308636, data de depósito: 09/12/2014, título: “Uso de composto, método *ex-vivo*, processo e extrato purificado”, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição financiadora: CNPq.

- NUNEZ, C.V. SANTOS, P.A. ROUMY, V. HENNEBELLE, T. SAHPAZ, S. MESQUITA, A.S.S. BAILLEUL, F. Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). 57th International Congress and Annual Meeting of the GA | Geneva, Switzerland August 16 – 20, 2009.
- NUNEZ, C.V., VASCONCELOS, M. C. Novo alcaloide antitumoral de *Duroia macrophylla*. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012, título: "novo alcaloide antitumoral de *Duroia macrophylla*" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- OTERO, R. R. J. FONNEGRA & JIMÉNEZ, S. L. Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes en Antioquia y Chocó, Colombia. Universidad de Antioquia. Medellín, p. 402, 2000.
- PAGE, J. E., MADRIÑÁN, S., TOWERS, G. H. N. Identification of a plant growth inhibiting iridoid lactone from *Duroia hirsuta*, the allelopathic tree of the 'Devil's Garden'. *Experientia*, V. 50, Issue 9, pp 840-842. 1994.
- PASSMORE, H.A. BRUNA, E.M. HEREDIA, S.M. VASCONCELOS, H.L. Resilient Networks of Ant-Plant Mutualists in Amazonian Forest Fragments. *PLoS ONE* 7(8): e40803. doi:10.1371/journal.pone.0040803, 2012.
- PEIRANO G, SOUZA F.D.S. RODRIGUES, D.D.P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella spp.* from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, n. 3, p. 245-250, 2006.
- PEREIRA, R.C.A.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; CORRÊA, R.M.; BERTOLLUCI, S.K. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J.F. GMEL. (Unha de gato). *Plant Cell Culture and Micropropagation*, v.3, n.2, p.69-77, 2007.
- PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A.; Micropropagação e Metabólitos Secundários in vitro de Plantas Medicinais. Lavras: UFLA/FAEPE, 102 p. 2001.
- PISTELLI, L., GIOVANNINI, A., RUFFONI, B., BERTOLI, A. Hairy Root Cultures for secondary Metabolites Production. ISBN: 978-1-4419-7346-7, 2010.
- PRAKASH, P., GHOSLIYA, GUPTA, D. V. Identification of conserved and novel microRNAs in *Catharanthus roseus* by deep sequencing and computational prediction of their potential targets. *Gene* 554, 181–195. 2015.
- RAZAFIMANDIMBISON, S.G. MOOG, J. LANTZ, H. MASCHWITZ, U. BREMER, B. Re-assessment of monophyly, evolution of myrmecophytism, and rapid radiation in *Neonauclea s.s.* (Rubiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34, 334–354, 2005.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L.; LOHMANN, L.; ASSUNÇÃO, P.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke, Guia de identificação das plantas em uma floresta de terra firme na Amazônia central, Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA) e Department for International Development (DFID), 1999.
- ROBERTO, T.; FRANCESCA, M. Sustainable sourcing of natural food ingredients by plant cell cultures. *Agro Food Industry Hi Tech*, v.22(2), p. 26-28. 2011.

- SAIMAN, M. Z., MUSTAFA, N. R., POMAHOCŤOVA, B., VERBENE, M., VERPOORTE, R., CHOI, H., ELISABETH, A. Analysis of metabolites in the terpenoid pathway of *Catharanthus roseus* cell suspensions *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 117:225–239. 2014.
- SANDOVAL, G.A., MENDOZA, J. ROLDÁN, W. ESPINOZA, Y. SOLIS, H. YARLEQUÉ, A. Inmunogenicidad del veneno de *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae) y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos. *Revista Peruana de Biología*, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 335 - 341, feb. 2012.
- SILVA, G.A. DOMINGOS, T.F. FONSECA, R.R. SANCHEZ, E.F. TEIXEIRA, V.L. FULY, A.L. The red seaweed *Plocamium brasiliense* shows anti-snake venom toxic effects *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 10;21:2, 2015.
- SILVA, I.D.D. ARAGÃO, C.F.S. Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona Vahl* por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos *Rev. bras. farmacogn.* vol.19 no.3 João Pessoa July/Sept. 2009.
- SILVA, T.P. MOURA, V.M. SOUZA, M.C.S. SANTOS, V.N.C. SILVA, K.A.M.M. MENDES, M.G.G. NUNEZ, C.V. ALMEIDA, P.D.O. LIMA, E.S. MOURÃO, R.H.V. DOS-SANTOS, M.C. *Connarus favosus* Planch.: An inhibitor of the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom and a potential antioxidant and antibacterial agent. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 183, 13, P. 166–175, 2016.
- SOARES, A.M. TICLI, F.K. MARCUSSI, S. LOURENÇO, M.V. JANUÁRIO, A.H. SAMPAIO, S.V. GIGLIO, J.R. LOMONTE, B. PEREIRA, P.S. Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2625-2641, 2005.
- SOARES, O.E. (Ed.). Ações em saúde indígena amazônica, o modelo do alto rio Negro Federação das Organizações Indígenas do Rio Negro – FOIRN, 2006.
- SOUZA, J.S.I. PEIXOTO, A.M. TOLEDO, F.F. *Enciclopédia agrícola brasileira*, Volume 1, EdUSP, 508 p., 1995.
- STAFFORD, A.; WARREN, G. *Plant cell and tissue culture*. Melksham: Red Wood Press, 251p., 1991.
- SUBRAMANI, P. MADAPPA, B.P. NARASIMHAMURTHY, G.B. ASHOKAN, B. *Serratia marcescens*: an unusual pathogen associated with snakebite cellulitis, *J Infect Dev Ctries*, 7(2):152-154, 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4ª Ed., Artmed, Porto Alegre, 2013.
- TAKAYAMA, H. Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceous plant, *Mitragyna speciosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(8):916-928, 2004.
- TARIQ, U., ALI, M., ABBASI, B. H. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 130, 264–271. 2014.
- TAYLOR, C.M.J.A.; STEYERMARK, P.G.; DELPRETE, A.; VINCENTINI, R.; CORTÊS, D.; ZAPPI, C.; PERSSON, C.B.; COSTA, E.J.A.; STEYERMARK, J.S.; STEYERMARK, P.E.; BERRY, B.K. Rubiaceae.

Flora of the Venezuelan Guayana. Annals of the Missouri Botanical Garden, 8: 497-848, 2004.

TERMIGNONI, R. R. Cultura de Tecidos Vegetais. Editora da UFRGS, Porto Alegre. 182p. 2005.

VALSAN, C. RAO, T. SATHIAVATHY, A. A case of Snakebite complicated by *Morganella morganii* subspecies *morganii* Biogroup I infection, The Internet Journal of Infectious Diseases Volume 6 Number 2, 2007.

VENTURIERI, G.A. VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). Acta Amazonica. VOL. 34(4): 507 – 511, 2004.

VIJAYASREE, N., UDAYASRI, P., ASWANI, K. Y., RAVI, B. B., PHANI, K.Y., VIJAY, V. M. Advancements in the Production of Secondary Metabolites. J. Nat. Prod. 3: 112-123, 2010.

VILAR, J.C.; CARVALHO, C. M.; FURTADO, M.F.D. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. *Biologia Geral e xperimental*, v. 6, n . 1, p. 3 – 36, 2005.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 288, n, 21,p. 369–376, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Animal bites [Internet]. Geneva: World Health Organization; [Fact sheet N°373, February 2013]. Available from: Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs373/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO highlights critical need for life-saving antivenoms [Internet]. Geneva: World Health Organization; [Note for the media, 2010.]Available from: http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2010/antivenoms_20100504/en/