

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

TRITERPENOS DE CALOS DE *Deguelia duckeana* A. M. G.
AZEVEDO (FABACEAE)

Cristine Luciana de Souza Rescarolli

MANAUS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

Cristine Luciana de Souza Rescarolli

TRITERPENOS DE CALOS DE *Deguelia duckeana* A. M. G.
AZEVEDO (FABACEAE)

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.

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

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

R429t Rescarolli, Cristine Luciana de Souza
Triterpenos de calos de *Deguelia duckeana* A. M. G. Azevedo
(Fabaceae) / Cristine Luciana de Souza Rescarolli. 2018
90 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Cultura de tecidos vegetal. 2. Fitoquímica. 3. *Deguelia duckeana*. 4. Triterpenos. 5. Calo in vitro. I. Nunez, Cecilia Veronica
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

227ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 28 de março (quarta-feira) de 2018, às 14hs, na sala de apoio do CPPN-INPA situada na Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis- INPA. **Cristine Luciana de Souza Rescarolli** defendeu sua Tese de Doutorado intitulada: "Triterpenos dos calos de *Deguelia duckeana* A. M. G. Azevedo (Fabaceae)."

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez - Presidente	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 21967472890
Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao - UFAM	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 823206189-53
Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit - INPA	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 148.079.648-44
Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura - INPA	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 05758659894
Profa. Dra. Eva Maria Alves Cavalcante Atroch - UFAM	Aprovada (X) Reprovada ()	Assinatura: CPF: 433.895.514-34

Manaus, 28 de março de 2018.

Resultado Final: Aprovado(a) (X)
Reprovado(a) ()

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade
Coordenador

Coordenador PPGBIOTEC/UFAM.

Dedico aos meus pais, Romalino e Márcia

Sem vocês nada disso seria possível

Com todo amor do mundo!

*“É a ação que torna um ser humano grandioso. Seja grandioso pela sua prática diária, por seu serviço, por seu sacrifício”
(Shrii Shrii Anandamurti)*

AGRADECIMENTOS

“... lembrando sempre que é mais importante agradecer do que pedir!”

Gratidão ao Universo e toda essa energia suprema e sagrada que move tudo!

Agradeço à Profa. Dra. Cecilia, por ter me recebido de braços abertos em Manaus, ter vibrado com cada vitória, por todos os seus “Calma! Vai dar tudo certo!” (*Foram muitos!*). Pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, através das palavras e ações, por sua dedicação, paciência, compreensão. Pode ter certeza que tudo isso me faz uma pessoa cada dia melhor.

À minha família que soube entender a distância e ausência, é por vocês que acordo todas as manhãs para transformar o mundo num lugar melhor! Pai, mãe, sem vocês nada disso seria possível!

Aos amigos Maria Carolina e Julio que me encorajaram a viver tudo isso, pelo apoio, por podermos crescer juntos há tanto tempo (já faz seis anos, que faz seis anos, que fez seis anos...), por nunca me deixarem desistir, compreender cada gota de sangue, suor e lágrimas, minha gratidão eterna!

Aos amigos, anjos, salvadores da pátria, parceiros do ‘primeiro grito ao último suspiro’, Maytê e Weison. Chegaram de mansinho ofereceram a mão, e me ajudaram a passar os meus obstáculos químicos. Se não fosse por vocês as coisas seriam muito mais difíceis, não tenho palavras para descrever o tamanho da gratidão que tenho e sempre que puder vou retribuir! (Deus lhes pague, porque estou sem bolsa!)

Prisciiiila!!! “Prestenção!” Agradeço por ser a pibic que puxa a orelha de doutorando, por trabalhar até tarde, por vir no feriado, por não tomar café (sobra mais), por ser o meu lado organizado, fazemos uma dupla dinâmica. O seu futuro é brilhante, e eu nem preciso ver isso numa bola de cristal. *Vai Mestranda!*

Aos amigos “*Pós-graduando com a lua em CAPES*”, por todas as palavras de apoio, trocas de experiências nacionais e internacionais! Vocês são sensacionais!

Aos colegas do LABB (Fabianne, David, Andrei, Bel, Aline, Ana...) por todos os ensinamentos, solventes, bancadas e conversas compartilhadas!

À Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais, principalmente ao técnico Magno por sua compreensão, rapidez e eficiência, agradeço imensamente!

Aos amigos das longas horas de conversa na mesa de bar, ou no tapete de Yoga. Impossível nomear cada um, mas estarão sempre comigo!

Com certeza o mundo é um lugar melhor com a presença de cada um de vocês!

Aos membros da banca pela disponibilidade e compreensão.

Ao PPPGBiotec – UFAM pelos valiosos ensinamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa e apoio financeiro para o projeto.

Ao INPA pela infraestrutura e amparo que permitiram a realização desta pesquisa.

“...agradecemos pouco, deveríamos expressar nossa gratidão todos os dias...”

RESUMO

A obtenção de substâncias bioativas originárias de produtos naturais é uma preocupação da medicina moderna. Para isso a biotecnologia fornece algumas ferramentas como o cultivo de calos *in vitro*, com a finalidade de obter substâncias de interesse. Estudos atuais com *Deguelia duckeana* revelaram potencial anticâncer de flavonoides isolados a partir das raízes da espécie. Neste trabalho, objetivamos inicialmente realizar o estabelecimento e o cultivo *in vitro* da espécie vegetal. Uma vez obtidos os calos, estes foram secos e extraídos com hexano e acetato de etila. Os extratos foram fracionados, a fim de isolar as substâncias produzidas pelos calos. Como resultados obtidos estão que: o estabelecimento de calos *in vitro* dessa espécie foi possível, as culturas assépticas se deram a partir de folhas jovens de *D. duckeana* que passaram por um processo de desinfestação, seguido de indução e multiplicação em meio MS adicionado de 3 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2 mg.L⁻¹ de ácido 1-naftaleno acético (ANA) + 2 mg.L⁻¹ de cinetina (Kin). Os calos foram secos em liofilizador e a combinação de 1:1 dos solventes hexano/acetato de etila se mostrou a melhor para extrair os metabólitos presentes. O fracionamento do extrato hexano/acetato de etila 1:1 dos calos permitiu isolar os triterpenos 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) e lupeol. Suas estruturas foram confirmadas através da análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, e mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC.

ABSTRACT

Obtaining bioactive substances from natural products is a concern of modern medicine. For this, biotechnology provides some tools such as calli *in vitro* culture, to obtain substances of interest. Current studies with *Deguelia duckeana* revealed anticancer potential of flavonoids isolated from the roots of the species. In this work, we initially aimed to establish and *in vitro* culture of the plant species. Once callus obtained, they were dried and extracted with hexane and ethyl acetate. The extracts were fractionated to isolate the substances produced by the callus. As results obtained are that: *in vitro* callus establishment of this species was possible, aseptic cultures were obtained from young leaves of *D. duckeana* that underwent a disinfestation process, followed by induction and multiplication in MS medium added of 3 mg.L⁻¹ of BAP + 2 mg.L⁻¹ of NAA + mg.L⁻¹ of 2 Kin. The calli were dried in lyophilizer and the 1: 1 combination of the hexane/ethyl acetate solvents proved to be the best for extracting the present metabolites. Fractionation of hexane/ethyl acetate 1:1 extract from callus allowed to isolate the triterpenes 3β-hydroxy-20(29)-lupen-28-al (betulinaldehyde) and lupeol. Their structures were confirmed by analysis of ¹H and ¹³C NMR spectra, and COSY, HSQC and HMBC contour maps.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécie <i>Deguelia duckeana</i> mantida no viveiro do LABB-INPA. A: Planta jovem. B: Planta adulta apresentando padrão escandente	5
Figura 2. Substâncias isoladas por Lima (2012), e testadas frente ao potencial anticâncer por Cursino (2015)	7
Figura 3. Substâncias isoladas e testadas frente ao potencial anticâncer por Cursino (2015)	7
Figura 4. Fases da indução de calos <i>in vitro</i> . A: seleção do explante, observando características da planta mãe. B: Indução, seleção da melhor formulação do meio. C: multiplicação	10
Figura 5. Esquema geral da biossíntese de intermediários de terpenos (ROBERTS, 2007)	16
Figura 6. Fluxograma geral da preparação dos extratos	25
Figura 7. Fluxograma da obtenção de extratos e substâncias	27
Figura 8. Calos de <i>D. duckeana</i> apresentando diferentes padrões de contaminação por fungos A: Folha completamente contaminada após uma semana de cultivo. B: Início de contaminação ocorrendo após uma semana de cultivo	36
Figura 9. Indução de calo de <i>Deguelia duckeana</i> a partir de folhas em meio de cultura semi-sólido. A: Indução de calo em segmento foliar aos 30 dias de cultivo. B: Calo de <i>Deguelia duckeana</i> completamente formado, após o primeiro repique.....	38
Figura 10. Calos frescos coletados em frascos para congelamento, secagem e posterior extração.....	39
Figura 11. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações DDC0F35 da coluna realizada a partir do extrato bruto hexano/acetato dos calos de <i>D. duckeana</i>	41
Figura 12. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações 9 a 13 da coluna realizada a partir das frações 25 a 30.	42
Figura 13. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações 13 a 17 da coluna realizada a partir das frações 25 a 30	42
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do extrato hexano/acetato 1:1 de calos de <i>D. duckeana</i>	44

Figura 15. Expansão de espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) do extrato hexano/acetato 1:1 de calos de <i>D. duckeana</i>	45
Figura 16. Expansão de espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) do extrato hexano/acetato 1:1 de calos de <i>D. duckeana</i>	46
Figura 17. Estrutura betulinaldeído obtido dos calos de <i>D. duckeana</i>	48
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).	50
Figura 19. Expansão de espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído)	51
Figura 20. Expansão de espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído)	52
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).....	53
Figura 22. Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído)	54
Figura 23. Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído)	55
Figura 24. Mapa de contorno HSQC da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído)	56
Figura 25. Expansão do mapa de contorno HSQC da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído). A: Carbono 29 com deslocamento de δ_c 110,18 ppm acoplado com hidrogênios δ_H 4,61 e 4,74 ppm. B: C-28, δ_c 206,77 acoplado com δ_H 9,68 ppm, típico de aldeído.....	56
Figura 26. A: Mapa de contorno COSY da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído). B: Expansão nos acoplamentos, δ_H 1.70, 4.75; δ_H 1.35, 1.78 ppm, δ_H 1.44, 2.08; δ_H 1.60, 3.19.....	57

Figura 27. Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído). A: C-17 com deslocamento de δ_c 59,35 ppm acoplado com hidrogênios δ_H 9,68 ppm.; C-19, δ_c 47,53 ppm com δ_H 1,72 ppm; C-3, δ_c 79,9 ppm δ_H 0,96 ppm. B: C-22 δ_c 29,85 acoplado com δ_H 2,87 ppm e δ_H 1,44 ppm.	58
Figura 28. Correlações encontradas nos mapas de contorno HMQC e COSY na molécula de 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).	59
Figura 29. Estrutura do lupeol isolado a partir de calos de <i>D. duckeana</i>	60
Figura 30. Espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) da substância lupeol do extrato DDC2F11-12.	62
Figura 31. Espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) da substância lupeol do extrato A: DDC2F16-17.	63
Figura 32. Expansão do espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância lupeol do extrato DDC2F11-12.	64
Figura 33. Expansão do espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância lupeol do extrato DDC2F11 – 12.	65
Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) da substância lupeol do extrato DDC2F11-12.	66
Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância lupeol do extrato DDC2F11-12.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Combinações e tempos de imersão em agentes desinfestantes e porcentagem de contaminação e sobrevivência de explantes foliares de <i>D. duckeana</i> submetidas à diferentes desinfestações, e inoculadas em meio sólido de Murashige & Skoog (1962) (MS), após 14 dias de cultivo <i>in vitro</i> (n = 40)..	34
Tabela 2. Combinações e concentrações (mg.L ⁻¹) de auxinas e citocininas e porcentagem de indução de calos em explantes foliares de <i>Deguelia duckeana</i> , após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> (n = 20).	38
Tabela 3. Rendimentos de massa seca de calos de <i>D. duckeana</i> e Teor de água em porcentagem de água, nos 5 ^o , 7 ^o , 11 ^o , 12 ^o e 15 ^o repiques.	39
Tabela 4. Resultados da avaliação da capacidade antioxidante da substancia testada obtidos pelas metodologias de DPPH e Fe ³⁺ /Fenantrolina.	70
Tabela 5. Porcentagem de inibição de crescimento de micro-organismos testados em seis concentrações do extrato Hex/AcOEt 1:1 de calos de <i>D. duckeana</i>	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Combinações e tempos de imersão em agentes desinfestantes utilizados em explantes foliares de <i>Deguelia duckeana</i>	22
Quadro 2. Combinações e concentrações (mg.L ⁻¹) de auxinas e citocininas adicionadas ao meio de cultura MS para a Indução de calos em <i>Deguelia duckeana</i>	23
Quadro 3. Sistema de eluição do fracionamento do extrato Hex/AcOEt dos calos de <i>D. duckeana</i>	27
Quadro 4. Sistema de eluição do fracionamento da amostra 11-14 obtidas do extrato Hex/AcOEt dos calos de <i>D. duckeana</i>	28
Quadro 5. Sistema de eluição do fracionamento da amostra 25-30 obtidas do extrato Hex/AcOEt dos calos de <i>D. duckeana</i>	29
Quadro 6. Sistema de eluição do fracionamento da amostra 40-42 obtidas do extrato Hex/AcOEt dos calos de <i>D. duckeana</i>	29
Quadro 7. Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante (Martins, et. al., 2014)	32
Quadro 8. Dados de RMN de ¹³ C do 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) isolados do extrato DdC0F35 dos calos de <i>Deguelia duckeana</i> , em CDCl ₃ (75 MHz) e comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; MONACO & PREVITERA, 1984).	49
Quadro 9. Dados de RMN de ¹³ C do lupeol isolado do extrato DdC2F11-12 e DdC2F16-17 dos calos de <i>Deguelia duckeana</i> , em CDCl ₃ (75 MHz) e comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994)	61

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AcOEt – Acetato de Etila
AIA – Ácido indolilacético
ANA – Ácido α -naftalenoacético
BAP – 6-Benzilaminopurina
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa
DCM – Diclorometano
DD – Desinfestação de *Deguelia duckeana*
DDC0 – Coluna 0. A partir do extrato bruto.
DDC0F0 – Fração 0 da coluna 0
DDC0F35 – Fração 35 da coluna 0
DDC0F8 – Fração 8 da coluna 0
DDC2F11-12 – frações 11 e 12 reunidas, da coluna 2
DDC2F16-17 – frações 16 e 17 reunidas, da coluna 2
DDC1 – Coluna cromatográfica aberta 1
DDC2 – Coluna cromatográfica aberta 2
DDC3 – Coluna cromatográfica aberta 3
DDI – Indução de *Deguelia duckeana*
DMSO – Dimetilsulfóxido
EM – Espectrometria de Massas
Hex – Hexano
Kin - Cinetina
MS – Meio de cultura Murashige & Skoog
MeOH – Metanol
Pic – Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico)
RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C - Ressonância magnética nuclear de Carbono
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Lista de figuras.....	III
Lista de tabelas.....	VI
Lista de Quadros.....	VII
Lista de Abreviaturas.....	VIII
1. Introdução.....	1
1.1 Fabaceae.....	2
1.1.1. <i>Deguelia duckeana</i>	5
1.1.2 Metabólitos secundários no gênero <i>Deguelia</i>	5
1.3 Biotecnologia Vegetal.....	8
1.3.1 Cultura de tecidos e células vegetais <i>in vitro</i>	9
1.3.2 Metabólitos secundários em Cultura de Calos.....	11
1.3.2.1. Terpenos.....	15
1.3.2.1.1. Triterpenos.....	16
1.4 Atividade antimicrobiana.....	18
2. Objetivos.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. Material e Métodos.....	21
3.1. Estabelecimento do cultivo de calos <i>in vitro</i>	21
3.1.1. Material Vegetal.....	21
3.1.2. Desinfestação.....	21
3.1.3 Indução e multiplicação de calo.....	22
3.1.3.1 Suspensão celular.....	23

3.1.4	Determinação do Teor de Água dos Calos	24
3.1.5	Análises Estatísticas para cultura de tecidos	24
3.2.	Estudo fitoquímico dos Calos de <i>D. duckeana</i>	24
3.2.1	Preparação e concentração dos extratos	24
3.2.2	Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCDC) dos extratos e Frações.....	26
3.2.3	Espectrometria de Massas	26
3.2.4.	Análise Espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H e ¹³ C dos extratos	26
3.3.	Fracionamento dos Extratos	26
3.3.1	Fracionamento do Extrato Hexano/Acetato de etila.....	26
3.4.	Ensaio Biológico e Químico	30
3.4.1.	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	30
3.4.2	Atividade antioxidante	31
4.	Resultados e Discussão	33
4.1.	Obtenção de Calos de <i>Deguelia duckeana</i>	33
4.1.1.	Desinfestação dos Explantes de <i>D. duckeana</i>	33
4.1.2.	Indução de calo.....	37
4.2.	Fitoquímica de Calos de <i>D. duckeana</i>	40
4.2.1	Análise em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos das frações a partir da coluna 0 (DDC0)	40
4.2.2	Análise em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos das Frações da coluna 2 (DDC2).....	41
4.2.3.	Análise em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos das Frações da coluna 3 (DDC3).....	42
4.3.	Identificação de triterpenos de calos de <i>D. duckeana</i>	43
4.3.1.	3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) (I).....	47
4.3.2.	Lupeol	59

4.4 Atividades biológicas e químicas do Extrato Hex/AcOET	69
4.4.1 Atividade antioxidante	69
4.4.2 Atividade Antimicrobiana	69
5. Conclusão	72
6. Referências.....	73
7. Anexos.....	83

1. INTRODUÇÃO

A demanda por produtos de origem natural no mundo é alta e vem crescendo ainda mais ao longo dos anos (MURTHY *et al.*, 2015), desta forma, a obtenção de substâncias bioativas originárias de produtos naturais é uma preocupação da medicina moderna (NOSOV, 2012). As plantas, através de seu metabolismo, são capazes de produzir e acumular substâncias orgânicas com atividade biológica, tais como: substâncias aromáticas, óleos essenciais, alcaloides, entre outros. Sendo assim, a pesquisa fitoquímica é fundamental para conhecer os constituintes químicos e determinar quais são as substâncias que constituem os organismos investigados (SIMÕES *et al.*, 2010), a etapa da elucidação estrutural do princípio ativo de uma planta medicinal é indispensável para a compreensão do seu mecanismo de ação (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

A obtenção de produtos oriundos da biodiversidade com a finalidade de se extrair valor econômico para as indústrias farmacêutica, alimentícia, agropecuária, entre outras, é denominada bioprospecção. Esta ferramenta tem como objetivo encontrar recursos biológicos, ou derivados, para a comercialização dos mesmos, garantindo o uso sustentável, sendo possível utilizar estratégias para a conservação dos recursos naturais (SACCARO JÚNIOR, 2011).

Até algum tempo atrás, as substâncias bioativas de plantas medicinais ou aromáticas eram obtidas a partir de plantas selvagens ou cultivadas, sendo que a maior parte, cerca de 80 a 90%, advinha de extrativismo. No fim dos anos 90, a coleta anual realizada na Europa de plantas aromáticas ou medicinais oscilava entre 20.000 a 30.000 toneladas, levando a uma superexploração dos recursos naturais (LANGE, 1998), prejudicando assim, a população natural de muitas espécies. No mundo todo, diversas espécies estão ameaçadas de extinção como: *Podophyllum hexandrum*, fonte de podofilotoxina e *Pilocarpus jaborandi*, fonte de pilocarpina, espécies selvagens de *Dioscorea* e populações naturais de *Panax ginseng* também correm risco de desaparecer (FAOSTAT, 2013).

Apesar dos dados apresentados pelo Ministério do Meio Ambiente serem imprecisos, é sabido que o Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo. O Projeto Re flora estima que atualmente sejam conhecidas 46497 espécies para a flora brasileira sendo que destas, 33101 são espécies de Angiosperma (Flora do Brasil 2020 em Construção, 2018). Parte destas espécies é endêmica do nosso país, sendo que grande parte dessas espécies se encontram nas florestas ombrófilas densas, representadas pela Floresta Amazônica e Floresta Atlântica (DINIZ & FERREIRA, 2000).

O bioma amazônico é rico em recursos naturais e, segundo os dados do Museu Paraense Emílio Goeldi em 2015 possuía mais de trinta mil espécies vegetais catalogadas, 10% da flora mundial com cinco mil espécies de árvores (MUSEU-GOELDI, 2018). Entre estas espécies podemos destacar as pertencentes à família Fabaceae, que apresenta uma distribuição abrangente, e representada como uma das maiores famílias de angiospermas e com grande interesse econômico (SOUZA & LORENZI, 2012).

1.1 FABACEAE

A família Fabaceae, anteriormente conhecida como Leguminosae, possui 650 gêneros e 19.000 espécies. Destes, 200 gêneros e 2.700 espécies ocorrem no Brasil, representando assim uma das maiores famílias de Angiospermas (SOUZA & LORENZI, 2012).

A família possui uma relevância global para a alimentação e nutrição humana e animal, por apresentarem alto teor de proteína, possuindo o dobro ou triplo de peptídeos quando comparado aos cereais, os frutos são ricos em carboidratos, fibras dietéticas, e fornecem micronutrientes como vitaminas, ácidos graxos, ácido fólico e minerais, que são altamente benéficos para a saúde humana e animal (JACOB *et al.*, 2016).

A maior parte das Fabaceae possui a capacidade de gerar interações simbióticas com bactérias chamadas *Rhizobium* fixando nitrogênio atmosférico (N₂) em troca fornece carbono para a bactéria (PAGAN *et al.* 1975; HEATH & TIFFIN 2009; PEIX *et al.* 2015), e liberando nitratos no solo de forma que fique disponível para ser utilizado pelas plantas.

Sendo assim, as Fabaceae se destacam para o uso em sistemas de produção sustentáveis e reabilitação de solos, reduzindo o custo de produção e risco de poluição do meio ambiente pelo uso de fertilizantes com nitrogênio sintético (MENDES *et al.*, 2003; HUNGRIA *et al.*, 2006; SALVAGIOTTI *et al.*, 2008, SOUZA, 2012).

No entanto muitas espécies dessa família correm risco de extinção por conta da fragmentação das florestas. Havendo apelo principalmente para as utilizadas industrialmente. A produção de leguminosas gera em torno de 785 milhões de toneladas anualmente em produtos para consumo humano e animal (FAOSTAT, 2013). A cultura mais importante é a de soja (*Glycine max*) considerada principal fonte de proteína para a alimentação animal e segunda maior fonte de óleo vegetal mundial (ERS, 2012). A contribuição da família Fabaceae na alimentação também é atribuída a outras espécies como alfafa (*Medicago sativa*), trevo (*Trifolium spp.*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), amendoim (*Arachis hypogaeae*), ervilha (*Pisum sativum*), grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e lentilha (*Lens culinaris*), entre outros; os produtos destas espécies podem ser utilizados de diferentes formas tanto em sua forma natural, como processados.

Existem inúmeras espécies de Fabaceae que despertam interesse econômico para o uso ornamental, devido às belas inflorescências e capacidade de reabilitação de solos áridos, fornecimento de madeira para construção civil e combustível (SOUZA, 2012). Além disso, mais de 4000 flavonoides foram descritos para plantas vasculares, sendo que, grande parte destes flavonoides foi descrito em espécies da família Fabaceae e estariam envolvidos na especificidade de interação com bactérias nitrificantes (PERRET *et al.*, 2000).

Além de serem descritas por possuírem algum efeito biológico, tais como anticonvulsivante em *Bauhinia outimouta* (QUINTANS-JÚNIOR *et al.* 2008), antimicrobiana, antiparasitária, inseticida, antitumoral, hepatoprotetora e laxativa em *Senna occidentalis* (LOMBARDO *et al.*, 2009) e *Deguelia duckeana*, que possui atividade antimicrobiana comprovada frente a *Staphylococcus aureus* (LIMA *et al.*, 2012) e potencial anticâncer (CURSINO *et al.*, 2016).

No entanto, é sabido que sementes de Fabaceae possuem conhecida natureza recalcitrante, sendo que algumas das espécies apresentam

tegumento rígido, o que impede a entrada de água e/ou oxigênio e a emergência da radícula. Algumas técnicas são utilizadas com sucesso para que ocorra a germinação destas sementes, como a escarificação química, mecânica e física destas (CENKCI *et al.*, 2008).

A *Cassia siamea* (cassia amarela ou cassia-de-Sião), é uma Fabaceae de grande importância econômica é resistente a variações climáticas, possui crescimento rápido e fixação de nitrogênio polivalente, apresenta atividades biológicas de grande interesse para a indústria farmacêutica como ação laxativa, purgativa, hepatoprotetora, agente no combate a urticária e remédio para a perda de apetite por problemas gastrointestinais e rinite. Sendo tradicionalmente propagada por sementes, no entanto, é ameaçada pela contaminação por fungos, brocas e o parasita *Dendrophthoe falcata*, que causam grande dano e morte da planta. Parveen e colaboradores (2010) estabeleceram uma rápida multiplicação *in vitro* da espécie garantindo a qualidade fitossanitária, produção de biomassa e conservação de germoplasma desta espécie a partir do nó cotiledonar de plantas assépticas germinadas *in vitro*.

A biotecnologia vegetal apresenta técnicas para que a germinação, multiplicação e obtenção de biomassa vegetal de espécies de Fabaceae seja possível. Um exemplo do que já vem sendo desenvolvido são os protocolos de germinação e multiplicação de *Cassia angustifolia* (Sene-da-Índia), planta medicinal amplamente estudada por possuir antraquinona, um poderoso laxativo natural, foram desenvolvidos para suprir a demanda mundial (AGRAWAL & SARDAR, 2003; AGRAWAL & SARDAR, 2006; RAMCHANDER *et al.*, 2017).

Dentro da família Fabaceae está o gênero *Deguelia*, que contém apenas 20 espécies, encontradas na América do Sul tropical. No Brasil estas espécies são encontradas principalmente nos estados do Amazonas e Pará, possuem hábito lianescente, raramente arborescente, encontrada geralmente em locais abertos, de pleno sol. Além de descrições taxonômicas, tem sido sugerido que os perfis fitoquímicos de espécies desse gênero possam auxiliar a elucidação da separação filogenética para gêneros dessa família (MAGALHÃES *et al.*, 2001).

1.1.1. *Deguelia duckeana*

Dentre as espécies do gênero, a espécie *Deguelia duckeana* (figura 1), conhecida popularmente como timbó, timborana e canambi, é reconhecida por ser um arbusto escandente, pequeno, rasteiro de lugares abertos, secos ou alagados, na floresta pode atingir grandes dimensões e por ser uma liana, subir em árvores muito altas. Suas flores são na cor róseas-violáceas (SILVA *et al.*, 1977). Sendo as folhas com 7 ou 9 folíolos (raramente 5 ou 11), estípulas ausentes, pecíolo estriado no geral com um sulco ventral, raquis semelhante ao pecíolo, sub-angular. Inflorescência ereta, pseudo-racemosa, auxiliar, multiflora e bractéola (TOZZI, 1989).

Figura 1. Espécie *Deguelia duckeana* mantida no viveiro do LABB-INPA. A: Planta jovem. B: Planta adulta apresentando padrão escandente.



A espécie possui ação tóxica sobre peixes, sendo utilizada desde a época pré-colombiana e, no entanto o uso das raízes maceradas para a pesca está proibida (TOZZI, 1989). A atividade tóxica desta espécie foi comprovada em ensaios de toxicidade em *Artemia salina* realizados por Lima e colaboradores (2012), onde até a menor concentração testada se mostrou tóxica para os microcrustáceos (5,0 µg/mL).

1.1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO GÊNERO *DEGUELIA*

Quimicamente, o gênero *Deguelia* é uma fonte promissora de flavonoides e outros metabólitos secundários, sendo que o gênero se caracteriza pela presença de isoflavonoides, com predominância de rotenoides (MORAES, 2000).

Os flavonoides são metabólitos secundários amplamente distribuídos nas plantas, onde mais de 8000 substâncias são conhecidas. Possuindo diversas funções nas plantas, com destaque para a proteção contra herbivoria. Podendo ser encontrados em todas as partes da planta ou ser encontrados somente em determinados órgãos vegetais, como é o caso das antocianidinas que conferem a cor vermelha, rosa e azul, ocorrem somente nas flores, assim como as chalconas e flavonóis conferem a cor amarela (BUCHANAN *et al.*, 2000; DEWICK, 2009; XIE, 2011).

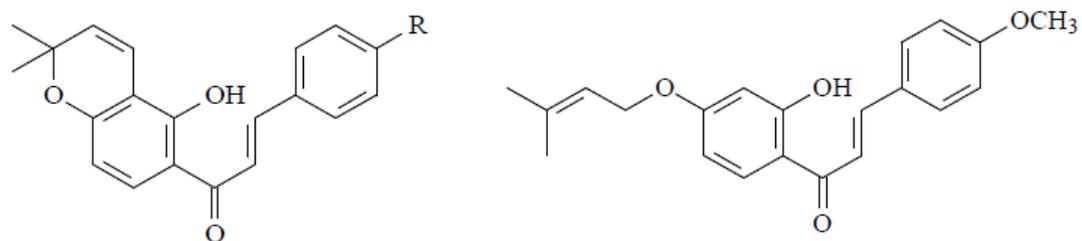
Os flavonoides estão relacionados a diversos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, e também são ativos na relação entre planta e micro-organismo agindo na rizosfera, como na simbiose das espécies da família Fabaceae e *Rhizobium* (ROMERO & SIQUEIRA, 1996), sendo possível observar, em algumas espécies desta família, grande quantidade de flavonoides nas raízes (WESTON & MATHESIUS, 2013). Estudos relacionam a presença de flavonoides com a germinação e crescimento micelial de fungos micorrízicos (SOARES *et al.*, 2005; AIKAWA *et al.*, 2000; ROMERO & SIQUEIRA, 1996).

De acordo com a literatura, são descritas para o gênero *Deguelia*, chalconas, flavonoides, isoflavonoides, estilbenos, rotenoides e triterpenos (CURSINO, 2015). Para a espécie *Deguelia duckeana* foram identificados estilbenos e chalconas por Lima e colaboradores (2012) (fig. 2).

Outro estudo relatou a atividade antimicrobiana frente à cepa *Mycobacterium tuberculosis* em concentrações acima de 200 µg/mL (CARRION *et al.*, 2013).

Em outro estudo realizado por Cursino e colaboradores (2016), foram identificadas nove substâncias e além de comprovar a atividade tóxica de alguns flavonoides isolados de *D. duckeana* (fig. 3), apresentando resultados inéditos que revelam o potencial antitumoral de flavonoides isolados de extratos obtidas das raízes da espécie.

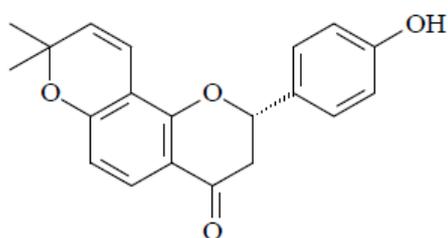
Figura 2. Substâncias isoladas de *D. duckeana* por Lima (2012), e testadas frente ao potencial antitumoral por Cursino (2015).



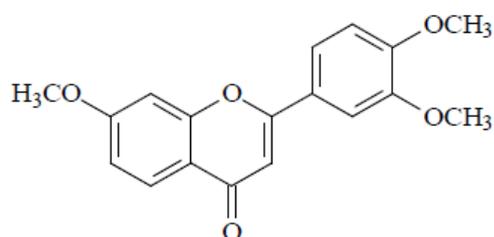
(R = H) lonchocarpina

4-metoxiderricidina

(R = OH) 4-hidroxi-lonchocarpina

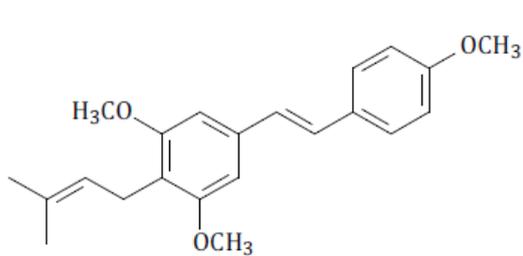


4'-hidroxi-isolonchocarpina

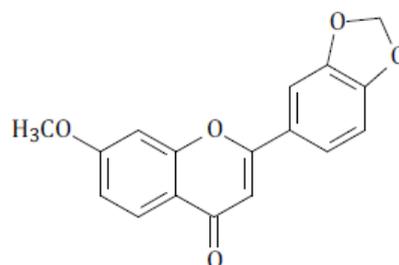


3',4',7-trimetoxiflavona

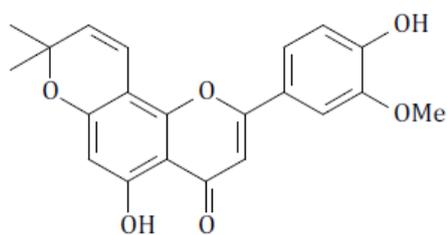
Figura 3. Substâncias isoladas *D. duckeana* e testadas frente ao potencial antitumoral por Cursino (2015).



3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno (IV)



3',4'-metilenodioxi-7-metoxiflavona (VII)



racemoflavona (X)

1.3 BIOTECNOLOGIA VEGETAL

O cultivo em campo de plantas medicinais pode ser uma alternativa viável, no entanto, estas culturas ocupam um espaço físico amplo e algumas espécies levam muitos anos para produzirem a quantidade de biomassa necessária, o que eleva o valor final da matéria prima produzida (WU *et al.*, 2015).

Além disso, a obtenção de metabólitos de interesse a partir de plantas depende de fatores como sazonalidade, idade da planta e tecido do qual o metabólito é produzido e/ou armazenado, além da possibilidade de contaminação e infestação, leis de proteção de áreas e espécies, entre outros. Em alguns casos, o metabólito de interesse se encontra nas raízes, por exemplo, onde, para obtê-lo deve ser sacrificada a planta inteira, levando algumas espécies ao risco de extinção (VERPOORTE *et al.*, 1999; VERPOORTE *et al.*, 2000; TREJO-TAPIA & RODRÍGUEZ-MONROY, 2007).

Outra problemática de culturas em campo é a incapacidade de remoção completa de contaminantes químicos externos, presentes na irrigação ou adubação, que podem afetar o metabolismo vegetal e qualidade do produto final (WU *et al.*, 2015).

A quantidade de produção de substâncias bioativas é muito baixa, como é o caso do taxol, utilizado no tratamento do câncer, onde são necessárias cascas de três árvores de aproximadamente cem anos de idade para produzir a quantidade suficiente para o tratamento de uma pessoa (NOSOV, 2012).

O cultivo *in vitro* de *Taxus* spp. já foi estabelecido e foi comprovado que através do uso de elicitores, engenharia genética e metabólica, é possível que a produção em larga escala de taxanos seja conseguida em biorreatores (JAZIRI *et al.*, 1996; ZHAO *et al.*, 2005; CUSIDO *et al.*, 2014), além deste método o taxol já vem sendo obtido a partir do cultivo dos fungos endofíticos. A produção de taxol a partir de fungos endofíticos se iniciou no ano de 1993 com Stierle e colaboradores, que conseguiram isolar o princípio ativo a partir do fungo *Taxomyces andreanae*, reduzindo, assim, a exploração da planta (STIERLE *et al.*, 1993).

Entre estas linhas de pesquisa, a biotecnologia fornece três alternativas para a produção de substâncias bioativas: cultivo de células vegetais *in vitro*,

cultivo de tecidos e órgãos de plantas (incluindo raízes transformadas) *in vitro*, engenharia genética aplicada ao cultivo de microrganismos eucariotos (levedura) e procariotos (bactérias) (NOSOVIĆ, 2012).

1.3.1 CULTURA DE TECIDOS E CÉLULAS VEGETAIS *IN VITRO*

O cultivo de tecidos, células e órgãos vegetais *in vitro*, se tornou uma ferramenta para a produção em larga escala de biomassa vegetal para obtenção de substâncias de interesse, a fim de atender as necessidades industriais na fabricação de drogas. Esta técnica foi desenvolvida tendo em vista a crescente demanda por produtos de origem natural e crescente conscientização sobre a ameaça da perda de populações e diversidade genética vegetal, juntamente com a preocupação com a atual degradação do meio-ambiente (ROBERTO & FRANCESCA, 2011; YUE *et al.*, 2016, ISAH, 2016).

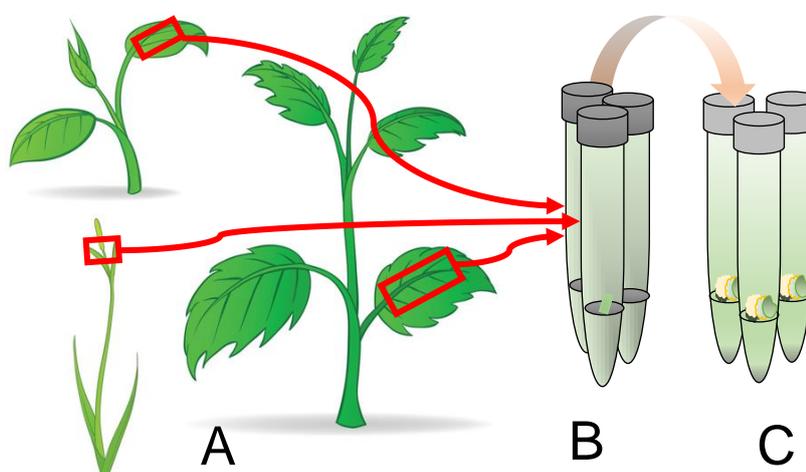
Esta técnica tem sido amplamente empregada desde o início do século XX, inicialmente utilizada a fim de compreender as rotas metabólicas primárias e secundárias, além de auxiliar estudos relacionados à morfogênese vegetal, com a finalidade de aumentar a produção sustentável de madeira e produtos florestais não-madeireiros, incluindo a caracterização genética, manipulação e melhoramento de espécies. No entanto, o potencial medicinal e nutracêutico de plantas oriundas da cultura de tecidos vegetais vêm sendo mais profundamente estudado nos últimos de 50 anos (THORPE, 2006; NUNES *et al.*, 2013; DAVIES & DEROLE, 2014; MURTHY *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2016).

A cultura de células, tecidos e órgão vegetais *in vitro*, permite a produção em larga escala de biomassa vegetal, de alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo e pequeno espaço físico (AITCHINSON *et al.*, 1977). Pois, como descrito por diversos autores, qualquer espécie vegetal pode dar origem a estas culturas, onde cada célula viva e nucleada do tecido vegetal tem todos os genes necessários para todas as funções da planta, a isso se dá o nome de totipotência e, pode vir a desenvolver crescimento e/ou diferenciação celular induzida pelo meio, incluindo a produção de metabólitos secundários (AITCHINSON *et al.*, 1977; VERPOORTE *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2005; TREJO-TAPIA & RODRÍGUEZ-MONROY, 2007).

Após uma sinalização correta ao tecido do explante, as células estabelecem um processo de mitose, que ocorre primeiramente na periferia do explante e, de forma gradativa, em pontos internos do tecido, onde camadas e regiões de crescimento ativo passam a se formar, e dependendo do balanço dos fitohormônios utilizados no meio de cultura, diferentes tipos celulares do explante poderão se desdiferenciar, caracterizando assim um novo sistema que passa a ser chamado de calo (TERMIGNONI, 2005).

Aitchinson e colaboradores (1977) caracterizaram a existência de três fases durante a formação de um calo (figura 4), sendo a primeira fase chamada de *indução*, onde há uma ativação metabólica que levará as células à mitose, ou seja, há a preparação do tecido isolado para iniciar a fase de divisão (segunda fase). A segunda fase se inicia pela divisão das células periféricas do explante, posteriormente ocupando a região central. Logo após inicia a terceira fase, caracterizada pela desdiferenciação, quando o tecido perde sua identidade histológica.

Figura 4. Fases da indução de calos *in vitro*. A: seleção do explante, observando características da planta mãe. B: Indução, seleção da melhor formulação do meio. C: multiplicação.



O calo pode ser produzido em resposta a uma injúria física ou química, ou a mudança nos balanços endógenos de fitohormônios. No entanto 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, os tecidos jovens são mais adequados que os adultos (PINTO & LAMEIRA, 2001).

1.3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURA DE CALOS

Diversos autores relatam que as principais vantagens da obtenção de metabólitos secundários a partir de culturas de calo *in vitro* são: a independência de fatores ambientais, o aumento do controle da produção, possibilidade do uso de linhagens que garantam uma qualidade consistente do produto, simplificação dos métodos de processamento e extração dos metabólitos de interesse, aproveitamento de novas rotas de síntese a partir de linhagens mutantes ou não, a utilização de elicitores, manipulação do meio de cultura no direcionamento da produção de metabólitos, aproveitamento de biotransformações que podem ocorrer durante o cultivo de células vegetais *in vitro*, uso da metabolômica para otimizar o processo, entre outras (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; DiCOSMO & MISAWA 1995; VERPOORTE *et al.*, 1999; VERPOORTE *et al.*, 2002; KOLEWE 2011; HUSSAIN *et al.* 2012; ISAH *et al.* 2017).

A produção de metabólitos secundários *in vitro*, muitas vezes pode ser menor do que a obtida por planta em campo ou até nula. A desdiferenciação pode levar à perda da capacidade de produção dos metabólitos de interesse, mas a obtenção destes a partir de tecidos diferenciados *in vitro* pode ser igual ao obtido na planta. No entanto, a produção em larga escala de tecido diferenciado (raízes fasciculadas, microplantas, embriões somáticos, etc.), se torna economicamente inviável por necessitar de maior área e mais gasto com insumos para a produção (VERPOORTE *et al.*, 1999; SAIMAN *et al.*, 2015).

A vantagem de se obter biomassa vegetal a partir de calos está na possibilidade de se conseguir maior quantidade de material vegetal, além de haver a possibilidade de manipulação dos fatores que influenciam a produção dos metabólitos secundários (VERPOORTE *et al.*, 2002; TREJO-TAPIA & RODRÍGUEZ-MONROY, 2007).

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 atividade biológica. Estudos de atividade antioxidante realizados com a espécie *Thymus lotocephalus* revelou que extratos hidroalcoólicos de calos da espécie apresentam maior concentração de substâncias antioxidantes do que das plantas coletadas, particularmente o

ácido rosmarínico, apresentando assim, um maior potencial antioxidante do que extratos obtidos de plantas de campo (COSTA *et al.*, 2012).

Quando realizados estudos comparativos com o gênero *Cyclopia*, que possui atividade biológica comprovada como antioxidante, antimutagênico, anticancerígeno, fitoestrogênico, antidiabética e redutor de colesterol, identificaram diversas substâncias polifenólicas nos extratos a partir de plantas de campo e calo, onde três substâncias diferentes dos encontrados em plantas de campo foram identificadas no calo, sendo a primeira vez que derivados de benzofenona e dihidrochalcona foram encontrados no gênero *Cyclopia* (KOKOTKIEWICZ *et al.*, 2012).

Há inúmeros estudos sendo realizados com a otimização e seleção da formulação dos meios de cultura, assim como, das fontes de sacarose, combinações e concentrações de fitohormônios, naturais e/ou sintéticos, além do uso de diversos agentes físicos ou químicos como elicitores. Todas essas variações têm sido estudadas com a finalidade de obter mudanças morfogênética, além da possibilidade de manipular a produção, acúmulo e extração de metabólitos de interesse, podendo levar a um aumento na produção de 20 a 30 vezes (VERPOORTE *et al.*, 1999; VERPOORTE *et al.*, 2002; NAMDEO, 2007; ISAH *et al.*, 2017).

Fitohormônios 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 destes adicionados ao meio de cultura é necessária para garantir que o objetivo do estudo seja alcançado (TAIZ & ZEIGER, 2013).

As duas classes de reguladores de crescimento mais utilizadas em estudos com cultivo vegetal *in vitro* são as auxinas e as citocininas. Sendo que as auxinas possuem diversas funções no desenvolvimento vegetal na natureza, entre as quais, o alongamento do caule, dominância apical e o enraizamento, são amplamente utilizadas nas culturas de células e tecidos por induzir a divisão celular (KERBAUY, 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013).

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 à parte aérea (HARTMANN *et al.*, 1988; NARAYANASWAMY, 2004; KERBAUY, 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Além dessas variáveis, embora o uso de biorreatores para a cultura de células e tecidos de plantas seja recente, 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 (VERPOORTE *et al.*, 1999; VERPOORTE *et al.*, 2002; GEORGIEV *et al.*, 2013; MURTHY *et al.*, 2015; YUE *et al.*, 2016).

Neste ambiente também é possível manipular outras variáveis, como a aeração e forma de fornecimento do meio de cultura, podendo ocorrer de forma constante ou não, além do fornecimento de elicitores, como estressores ou precursores da biossíntese de metabólitos secundários (FIGUEIREDO *et al.*, 2000; CUSIDO *et al.*, 2014; SAIMAN *et al.*, 2015).

A classe de metabólitos secundários mais estudada na cultura de tecidos *in vitro*, tem sido os alcaloides, classe química que possui cerca de 12.000 substâncias, e é restrita a algumas famílias (FACCHINI & DE LUCA, 2008; NEWMAN & CRAGG, 2016).

Todos os fatores manipulados em laboratório que a plântula, embrião ou calo sofrem no meio de cultura, como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fitohormônios, além de tipo de fonte luminosa, ou ausência de luz, podem ser responsáveis pela produção e acúmulo de diferentes metabólitos secundário (CIÓC *et al.*, 2017; ISAH *et al.*, 2017).

Um exemplo é o estudo realizado sobre o efeito dos fatores nutricionais sobre a produção de colchicina em *Gloriosa superba*, presença dos íons sulfato e nitrato de amônio (40 mM cada) promoveram a produção do metabólito de interesse nas culturas de calo, o uso do precursor tirosina também influenciou no aumento da produção de colchicina, enquanto uma alta concentração de

fosfato e cálcio inibiram a biossíntese do alcaloide (BHARATHI & PHILOMINA, 2010),

A produção de alcalóides indólicos monoterpênicos (Vincristina e Vinblastina) em culturas *in vitro* de *Catharanthus roseus* é estudada há muitos anos, por diversos grupos de pesquisa, o uso de elicitores para o aumento da produção por cultura de células *in vitro* é de grande importância para a indústria farmacêutica. No entanto em conjunto com os ensaios de elicitação diversas análises foram realizadas, utilizando métodos espectroscópicos, espectrométricos, genéticos, metabolômicos e outros.

Entre os elicitores utilizados estão o uso dos precursores triptamina e loganina em conjunto com os fitohormônios ácido 2,4 diclorofenoxiacético, ácido salicílico, metil jasmonato e ácido abscísico, onde o metil jasmonato se mostrou eficiente no aumento da produção alcalóides indólicos monoterpênicos, nessas condições (EL-SAYED & VERPOORTE; 2002)

O conhecimento das rotas biossintéticas dos metabólitos secundários é de grande importância para o desenho experimental, este fato pode ser de grande restrição, parte das vias são conhecidas apenas ao nível dos intermediários (VERPOORTE *et al.*, 1999).

Paz e colaboradores (2017) revelaram o perfil proteômico de *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) cultivada *in vitro*, a fim revelar as rotas biossintéticas dos metabólitos secundários de interesse nessa cultura, este estudo revelou a presença de enzimas precursoras de triterpenos quinometídeos, conhecidos por possuir alta e ampla atividade antitumoral.

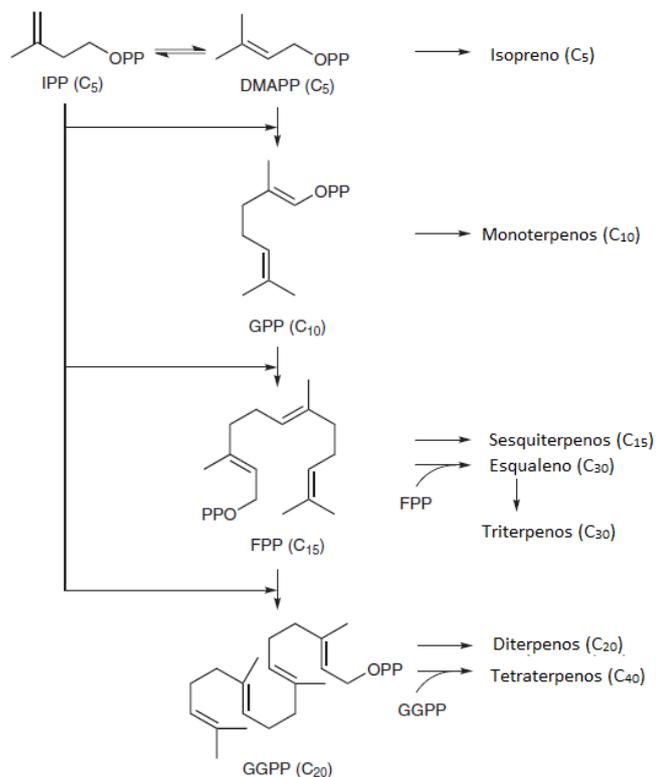
Outra possibilidade, através do conhecimento da rota biossintética da classe química desejada, utilizar precursores para a indução da produção do metabólito desejado, como o realizado com a espécie *Centella asiatica* por Kiong e colaboradores (2005), que utilizaram quatro precursores que, direta ou indiretamente, estão envolvidos na rota biossintética de triterpenos, foram eles: esqualeno, farnesil pirofosfato (FPP), isopentenil pirofosfato (IPP) e leucina, estes foram adicionados a culturas de calo, os autores revelam que os calos tratados com esqualeno foram os que mais produziram os triterpenos de interesse, bem como produziram a maior biomassa entre os calos tratados com precursores.

1.3.2.1. TERPENOS

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários de plantas, e sua biossíntese se dá através de duas rotas diferentes, a rota do ácido mevalônico, também conhecida como a rota do mevalonato, que ocorre no citosol. A rota do mevalonato é responsável pela formação de sesquiterpenos (C_{15}) e triterpenos (C_{30}), tendo como precursores acetil CoA e piruvato. A outra rota biossintética é a rota do metileritriol fosfato (MEP), o qual origina os monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) e tetraterpenos (C_{40}), ocorrendo nos cloroplastos e outros plastídeos (CROTEAU *et al.*, 2000; VERPOORTE *et al.*, 2000; AHARONI *et al.*, 2003; TAIZ & ZEIGER, 2013).

A rota do MEP tem como precursores o gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato. Ambas as rotas produzem o isopentenil difosfato (IPP) com cinco carbonos, sendo convertido em seu isômero difosfato de dimetilalil (DMAPP) nos plastídeos pela isopreno sintase (ISPS). Os precursores IPP e DMAPP são ainda condensados formando os intermediários prenil difosfato, que servem como substrato para a formação de compostos terpenoides (fig. 5) (DUDAREVA *et al.*, 2006; NAGEGOWDA *et al.*, 2010; PULIDO *et al.*, 2012; VRANOVA *et al.*, 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Figura 5. Esquema geral da biossíntese de intermediários de terpenos (ROBERTS, 2007)



O difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP) se condensam para formar precursores de terpenos de ordem superior, incluindo o precursor de monoterpénos, difosfato de geranila (GPP), o precursor dos sesquiterpenos, difosfato de farnesila (FPP) e o precursor de diterpenos difosfato de geranilgeranila (GGPP). Duas moléculas de FPP condensadas formam o esqualeno, precursor dos triterpenos e duas moléculas de GGPP condensadas formam os tetraterpenos (ROBERTS, 2007).

1.3.2.1.1. TRITERPENOS

As subunidades de isopreno (C₅) se condensam formando precursores para diferentes classes de isoprenóides. A biossíntese dos triterpenóides é iniciada a partir da união de seis unidades de isopreno para formar o esqualeno (C₃₀). O esqualeno serve de precursor para esteróis, brassinoesteróides e triterpenos (VERPOORTE & ALFERMANN, 2000; DEWICK, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2006; ROBERTS, 2007; VRANOVA *et al.*, 2012).

A formação dos triterpenos se dá pela ciclização do oxidoesqualeno, pela ação da oxidoesqualeno ciclase (OSC) também chamada de triterpeno sintase. Phillips e colaboradores (2006) clonaram mais de 40 OSC a partir de plantas superiores, relatando a obtenção de produtos distintos conforme os diferentes dobramentos da molécula de oxidoesqualeno, o que contribui para a diversidade estrutural dos triterpenos encontrados na natureza (XU *et al.*, 2004; PHILLIPS *et al.*, 2006; ROBERTS, 2007; WANG, 2010; VRANOVA *et al.*, 2012).

Os triterpenos são constituintes estruturais importantes das membranas vegetais, os triterpenos livres servem para estabilizar a bicamada lipídica das membranas celulares vegetais quando estas sofrem injúrias físicas ou químicas. Por possuir estruturas hidrofóbicas têm a capacidade de interagir com porções hidrofóbicas de proteínas e/ou lipídios que podem ser expostos pelas células quando estas sofrem injúria (LIBY *et al.*, 2007). Roberts (2007) relata a importância dos triterpenos onde mais de 40.000 estruturas já foram isoladas de micro-organismos, plantas e animais. Onde, além da função estrutural, permeabilidade de membrana, fotoproteção, também possui função para crescimento, desenvolvimento das plantas.

Os triterpenos possuem apelo econômico, sendo utilizados como realçadores de cor e sabor, além de ter apelos pelas atividades biológicas. As atividades biológicas incluem a capacidade de imunoestimulação, atividade anticâncer, anti-inflamatórias entre outras. Diversas espécies vegetais, de importância econômica, vêm sendo estudadas quanto ao seu conteúdo e ação de triterpenos, como é o caso da *Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, *Mangifera indica*, *Olea europaea* (CONNOLLY & HILL, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2006; LIBY *et al.*, 2007; ROBERTS, 2007).

Por possuir grande interesse econômico, diversos estudos quanto à produção destes metabólitos de forma confiável, renovável e sem que haja prejuízo para meio-ambiente, têm sido realizados. Entre eles a síntese total, semi-síntese a partir de precursores isolados, uso de engenharia genética da via metabólica de plantas em micro-organismos e a cultura de tecidos (ROBERTS, 2007; FRENSE, 2007). Todas as formas de produzir triterpenos possui vantagens e desvantagens, a síntese e a semi-síntese, podem ser as

formas mais seguras de se obter a substância de interesse, no entanto pode tornar o produto final muito caro.

A produção de terpenos e derivados de terpenos para a indústria farmacêutica, através da cultura de tecidos vegetais *in vitro* está sendo produzidos através de suspensões celulares. Algumas substâncias estão sendo produzidas em suspensões de célula vegetal, é o caso da shikonina de *Lithospermum erythrorhizon*, berberina de *Coptis japonica*, camptotecina de *Camptotheca acuminata* e *Nothapodytes foetida*, além da hipericina de *Hypericum perforatum* (ROBERTS, 2007).

Espécies brasileiras da família Fabaceae também têm sido estudadas quanto à presença de triterpenos, como é o caso da espécie do cerrado, tóxica para o gado *Enterolobium contortisiliquum* que, em estudo fitoquímico dos seus frutos foram isolados sete triterpenos (MIRANDA *et al.*, 2015). Além da espécie amazônica, *Diploptropis purpurea*, da qual foram isolados 3 triterpenos lupeol, taraxerol e β -amirina (CURSINO, 2015). Braz Filho e colaboradores (1975) isolaram os triterpenos lupenona e lupeol a partir das raízes de *Deguelia amazonica*. Até o momento não foi relatado nenhum triterpeno para a espécie *Deguelia duckeana*.

1.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A busca por novos antibióticos é constante, e as plantas tem sido grande fonte de substâncias para estes estudos. O aumento da hipervirulência e resistência a antibióticos por bactérias como *Staphylococcus aureus*, tem aumentado a preocupação com a busca de novos antibióticos (CHUNG *et al.*, 2014).

A família Fabaceae tem demonstrado potencial antibiótico, como é o caso da *Pterodon emarginatus*, onde os extratos metanólicos foram ativos contra cepas de bactérias como *Rhodococcus equi*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobactercloacae* e também foi eficiente contra o fungo *Candida albicans* (BUSTAMANTE *et al.*, 2010).

Em estudo realizado anteriormente com a planta *D. duckeana* revelou potencial antibacteriano para extratos dos galhos da planta frente a

Staphylococcus aureus (Lima *et al.* 2012), além disso, os terpenos possuem atividades antimicrobianas bem descritas, sendo que a classe dos triterpenos é amplamente utilizada e relatada como eficiente como antibiótico (CARVALHO & FONSECA, 2006; HANSON, 2008). Triterpenos pentacíclicos como os hopanos e lupanos, tem apresentado diversas atividades biológicas, como atividade anticâncer, anti-inflamatória, antibacteriana, entre outras (PATOČKA, 2003; LIU *et al.*, 2014).

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*.

Assim, *Deguelia duckeana* foi selecionada para este estudo a fim de produzir calos *in vitro* visando à obtenção dos metabólitos de interesse e aprimorar o processo, através da manipulação de meios de cultura com composição específica e usando diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Obter calos de *Deguelia duckeana* e estudar a sua composição química.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo para obtenção de biomassa vegetal a partir de calos de *D. duckeana*;
- Obter os extratos hexano/acetato de etila dos calos de *D. duckeana*;
- Avaliar o potencial antioxidante de extratos, frações e substâncias isoladas frente aos ensaios químicos como o radical DPPH e o íon de Fe^{3+} /Fenantrolina;
- Avaliar a atividade biológica dos extratos dos calos obtidos frente a micro-organismos patogênicos;
- Fracionar os extratos dos calos de *D. duckeana*;
- Identificar as estruturas das substâncias isoladas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ESTABELECIMENTO DO CULTIVO DE CALOS *IN VITRO*

3.1.1. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados como fonte de explantes folhas de diferentes entre nós de plantas jovens de *Deguelia duckeana* mantidas no viveiro do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, originárias da Praia Dourada, ambos localizados no município de Manaus, AM.

3.1.2. DESINFESTAÇÃO

Para a fase inicial da cultura de tecidos foram estabelecidas culturas assépticas *in vitro*, onde os explantes foram submetidos a 21 tratamentos (quadro 1) de desinfestação na presença ou ausência solução fungicida contendo Mancozeb® e detergente Tween 20, etanol 70%, hipoclorito de cálcio 4%, hipoclorito de sódio nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0%, em diferentes combinações e tempos de imersão, com três lavagens em água destilada e esterilizada entre cada agente desinfestante. Os explantes passaram por uma pré-desinfestação que consistiu em lavagem suave com sabão neutro e água corrente. Os tratamentos de desinfestação foram nomeados como DD01 a DD21

Posteriormente, os explantes (1 cm x 0,5 cm) foram inoculados em meio de Murashige e Skoog (1962) (MS) com 100% dos nutrientes, preparação comercial em pó produzida pela Sigma Chemical Co., suplementado com 87,6 mM de sacarose, utilizando como agente geleificante 8 g.L⁻¹ de ágar.

Quadro 1. Combinações e tempos de imersão em agentes desinfestantes utilizados em explantes foliares de *Degueliaduckeana*.

TRATAMENTO	FUNGI - CIDA (T, H)*	ETANOL 70% (T, MIN)	NACLO 0,5% (T, MIN)	NACLO 1,0% (T, MIN)	NACLO 2,5% (T, MIN)	CA(OCL) ₂ 4% (T, MIN)
DD 01	-	3	15'	-	-	
DD 02	-	3	-	-	-	15
DD 03	-	3	7'	-	-	7
DD 04	-	3	-	-	10	10
DD 05	-	3	-	-	-	10
DD 06	-	3	30	-	-	-
DD 07	-	4	20	-	-	10
DD 08	-	4	-	-	40	8
DD 09	17	3	-	-	6	10
DD 10	17	3	-	-	15	-
DD 11	17	3	-	-	5	5
DD 12	17	3	-	-	10	-
DD 13	17	3	-	-	-	10
DD 14	17	3	-	-	5	-
DD 15	17	3	-	-	10	-
DD 16	17	3	-	-	-	15
DD 17	17	3	-	-	10	10
DD18	48	3	-	-	10	-
DD19	48	3	-	15	-	-
DD20	23	3	-	15	-	-
DD21	23	3	-	-	10	-

Legenda: *(t) = tempo; DD = Desinfestação dos explantes da espécie *Deguelia duckeana*.

3.1.3 INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE CALO

Após o estabelecimento das culturas assépticas, os explantes foram transferidos para meios de cultura MS com 100% dos nutrientes, preparação comercial em pó produzida pela Sigma-Aldrich, adicionados de reguladores de crescimento em combinações e concentrações variadas (quadro 2), conforme pesquisas bibliográficas, visando promover a indução e multiplicação dos calos,

suplementado com 87,6 mM de sacarose, utilizando como agente geleificante 8 g.L⁻¹ de ágar.

Quadro 2. Combinações e concentrações (mg.L⁻¹) de auxinas e citocininas adicionadas ao meio de cultura MS para a Indução de calos em *Deguelia duckeana*.

TRATAMENTO	[AUXINA] (mgL ⁻¹)	[CITOCININA] (mgL ⁻¹)
DDI 01	2 ANA	3 BAP
DDI 02	10 Pic	2 Kin
DDI 03	15 Pic	2 Kin
DDI 04	2 ANA	6 BAP
DDI 05	2 2,4-D	-
DDI 06	4 2,4-D	2Kin
DDI 07	4 2,4-D	-
DDI 08	2 ANA	3 BAP + 2Kin

Legenda: DDI = Indução de calos da espécie *Deguelia duckeana*. 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ANA: ácido α -naftalenoacético; BAP 6-benzilaminopurina; Kin: Cinetina; Pic: picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico)

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16:8 horas (claro/escuro), provido por lâmpadas fluorescentes. Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos. Após 30 e 60 dias do início dos experimentos, amostras dos calos foram coletadas para as análises dos metabólitos secundários. Foram utilizadas no mínimo 20 repetições por tratamento.

3.1.3.1 SUSPENSÃO CELULAR

Para as suspensões celulares, foram coletados calos provenientes do meio de cultura semissólido MS adicionado de 2 mgL⁻¹ ANA + 3 mgL⁻¹ BAP + 2 mgL⁻¹ Kin, suplementado com 87,6 mM de sacarose, aparentemente friáveis de 10 tubos de ensaio, onde 10 foram seccionados ao meio, e 10 foram mantidos inteiros e transferidos para 20 frascos, devidamente identificados, contendo meio de cultura MS com 100% dos nutrientes, preparação comercial em pó produzida pela Sigma-Aldrich, adicionado de 2 mgL⁻¹ ANA + 3 mgL⁻¹ BAP + 2 mgL⁻¹ Kin, suplementado com 87,6 mM de sacarose, sem o uso de agente geleificante.

3.1.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DOS CALOS

Para determinação do teor de água na massa fresca total dos calos, estes foram pesados imediatamente após serem retirados do meio de cultura em seguida congelados e posteriormente liofilizados até retirada completa água, até atingir o peso constante. O teor de água foi expresso em porcentagem de água contida na massa fresca em relação à massa seca.

3.1.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA CULTURA DE TECIDOS

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Quando necessário, os resultados obtidos foram analisados através de análise de variância simples ou multifatorial, seguido do teste de separação de médias de Tukey, considerando um intervalo de confiança de 99% e nível de significância de 1% ($p < 0,01$). Os cálculos foram realizados com o auxílio do software Microsoft Excel®, com planilha desenvolvida para análise estatística do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural da Universidade Federal de São Carlos.

3.2. ESTUDO FITOQUÍMICO DOS CALOS DE *D. DUCKEANA*

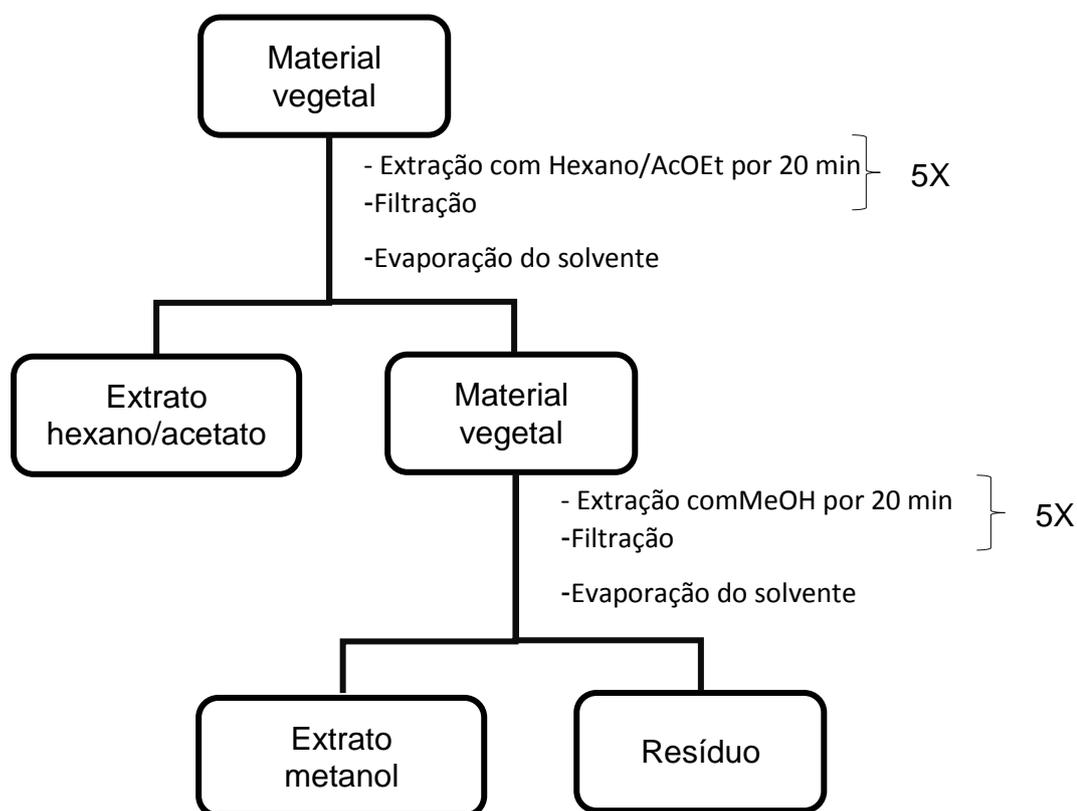
Para os estudos fitoquímicos, foram utilizados calos obtidos das culturas *in vitro*, do 5º, 7º, 11º, 12º e 15º repiques, foram coletados, pesados, nomeados e acondicionados separadamente em frascos de vidro, onde foram congelados em seguida secos em liofilizador para a retirada completa da água, após isso foi realizada a pulverização com ajuda de cadinho e pistilo.

3.2.1 PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS

Para a extração dos metabólitos secundários foi feito primeiro um teste extraíndo os calos dos 5º e 7º repiques com hexano, seguido de extração com acetato de etila e finalmente com metanol, utilizando banho de ultrassom por 20 min e o procedimento foi feito 5 vezes para cada solvente. Os extratos foram concentrados em rota-evaporador e comparados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e por ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H. Observou-se que os extratos hexânicos e acetato de etila eram iguais. Por esta razão, optou-se por extrair os demais na mistura dos solventes hexano/acetato de etila 1:1.

Assim, o material vegetal obtido de calos provenientes de culturas *in vitro* dos 11^o, 12^o e 15^o repiques, previamente secos (item 3.3), foram reunidos e extraídos com a mistura dos solventes hexano/acetato de etila (AcOEt) 1:1 seguido de extração com metanol (MeOH) (fig. 6), onde, para cada 1 g de massa seca foi utilizado 10 mL do solvente. Foram realizadas cinco extrações para o sistema hexano/AcOEt 1:1 utilizando ultrassom durante 20 minutos para cada extração, posteriormente o material foi filtrado e seco em ambiente controlado de laboratório +/- 24 °C, foi realizado o mesmo procedimento para obtenção do extrato metanólico. Para a concentração dos extratos foram utilizados o evaporador rotativo sob pressão reduzida, em temperatura < 50 °C.

Figura 6. Fluxograma geral da preparação dos extratos



Para o presente estudo somente os extratos hexano/acetato de etila 1:1 do 11^o, 12^o e 15^o repiques foram utilizados.

3.2.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCDC) DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Os extratos obtidos a partir da extração hexano/AcOEt 1:1 dos calos, bem como as frações obtidas a partir das colunas cromatográficas abertas (CCA) foram analisados em CCDC em cromatofolhas de sílica com indicador de fluorescência UV 254 nm, utilizando solventes orgânicos em gradiente crescente de polaridade como eluente das amostras.

Foram reveladas com luz UV (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), e químicos (iodo, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio).

3.2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo UltrOTOFG (ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics), operando no modo positivo ou negativo.

3.2.4. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ^1H E ^{13}C DOS EXTRATOS

Os extratos e frações foram analisados no espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de ^1H e em 75 MHz para o núcleo de ^{13}C , uni e bidimensionais. Foram utilizados solventes deuterados para solubilizar as amostras e TMS como padrão interno.

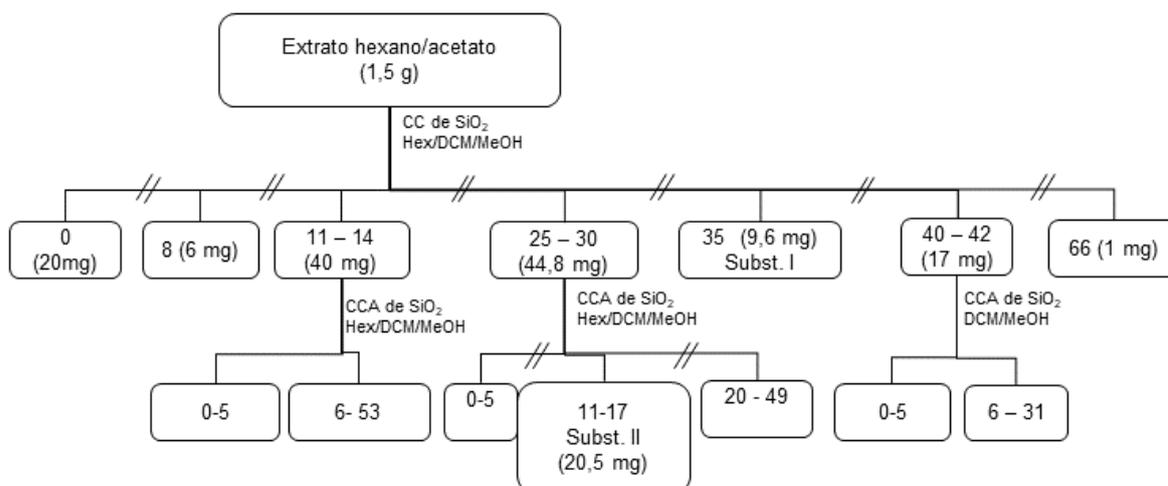
3.3. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

3.3.1 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXANO/ACETATO DE ETILA

Visando purificar as substâncias presentes nos extratos dos calos, foi realizado o fracionamento do extrato hexano/AcOEt (fig. 7), dos 1,63 g de extratos obtidos, 1,5 g foi destinado ao fracionamento e 0,13 g para ensaios biológicos.

O fracionamento foi realizado em coluna cromatográfica aberta de 26 cm de altura da sílica por 2,5 cm de diâmetro, com 105 g de sílica gel 60 (CCA de SiO_2 , 200-400 Mesh), usando gradiente de DCM em hexano, DCM 100%, MeOH em DCM até MeOH 100% (quadro 3).

Figura 7. Fluxograma da obtenção de extratos e substâncias.



Quadro 3. Sistema de eluição do fracionamento do extrato Hex/AcOEt dos calos de *D. duckeana*.

FRAÇÕES COLETADAS	SISTEMA DE ELUIÇÃO
DDC0F0 – DDC0F06	Hex/DCM 1:1
DDC0F06 – DDC0F11	Hex/DCM 3:7
DDC0F12 – DDC0F17	DCM 100%
DDC0F18 – DDC0F23	DCM/MeOH 98:2
DDC0F24 – DDC0F29	DCM/MeOH 95:5
DDC0F30 - DDC0F35	DCM/MeOH 9:1
DDC0F36 – DDC0F41	DCM/MeOH 8:2
DDC0F42 – DDC0F50	DCM/MeOH 7:3
DDC0F51 – DDC0F56	DCM/MeOH 1:1
DDC0F57 - DDC0F66	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica foi de 250 mL. Foram obtidas 66 frações, analisadas em cromatografia em camada delgada comparativa conforme item 3.5.

A partir da observação das cromatoplasmas eluídas e reveladas com reveladores físicos e químicos, foram selecionadas e reunidas, as frações 11 a 14 (40 mg) (DDC01); 25 a 30 (44,8 mg) (DDC02) e 40 a 42 (17 mg) (DDC03), para serem refracionadas. As frações DDC0F0, DDC0F08, DDC0F19-20,

DDC0F23-24 e 35 foram analisadas por espectrometria de massas conforme item 3.6.

O processo de purificação das frações reunidas DDC0F11- DDC0F14 (40 mg) foi realizado em coluna cromatográfica aberta de 10 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro, com 400 mg de sílica gel 60 (200-400 mesh), usando gradiente de DCM em hexano, DCM 100%, MeOH em DCM até MeOH 100%. Conforme o quadro 4. O volume de cada eluição adicionada à coluna cromatográfica foi de 30 mL, rendendo 53 frações.

Quadro 4. Sistema de eluição do fracionamento da amostra - DDC0F11-- DDC0F14 obtidas do extrato Hex/AcOEt dos calos de *D. duckeana*.

FRAÇÕES COLETADAS	SISTEMA DE ELUIÇÃO
DDC1F0 – DDC1F08	Hex/DCM 1:1
DDC1F9 – DDC1F15	Hex/DCM 4:6
DDC1F16 – DDC1F20	Hex/DCM 3:7
DDC1F21 – DDC1F25	DCM 100%
DDC1F26 – DDC1F30	DCM/MeOH 99:1
DDC1F31 – DDC1F35	DCM/MeOH 98:2
DDC1F36 – DDC1F40	DCM/MeOH 9:1
DDC1F41 - DDC1F53	MeOH 100%

O fracionamento das frações reunidas DDC0F25- DDC0F30 (44,8 mg) foi realizado em coluna cromatográfica aberta de 12 cm de altura da sílica por 1,5 cm de diâmetro, com 448 mg de sílica gel 60 (200-400 mesh), usando gradiente de DCM em hexano, DCM 100%, MeOH em DCM até MeOH 100%, (quadro 5). O volume de cada sistema de eluição foi de 30 mL, o que rendeu 49 frações.

Quadro 5. Sistema de eluição do fracionamento da amostra 25-30 obtidas do extrato Hex/AcOEt dos calos de *D. duckeana*

FRAÇÕES COLETADAS	SISTEMA DE ELUIÇÃO
DDC2F0 – DDC2F10	Hex/DCM 4:6
DDC2F11 – DDC2F15	Hex/DCM 3:7
DDC2F16 – DDC2F20	Hex/DCM 2:8
DDC2F21 – DDC2F25	DCM 100%
DDC2F26 – DDC2F30	DCM/MeOH 98:2
DDC2F31 – DDC2F35	DCM/MeOH 95:5
DDC2F36 – DDC2F40	DCM/MeOH 9:1
DDC2F41 - DDC2F49	MeOH 100%

O processo de purificação das frações reunidas DDC0F40-DDC0F42 (17 mg) foi realizado em coluna cromatográfica aberta de 16 cm de altura de sílica por 0,5 cm de diâmetro, com 105 g de sílica gel 60 (200-400 Mesh), usando gradiente DCM 100%, MeOH em DCM até MeOH 100%(quadro 6), O volume de cada eluição adicionada a coluna cromatográfica foi de 10 mL, rendendo 31 frações.

Quadro 6. Sistema de eluição do fracionamento da amostra DDC0F40-42 obtidas do extrato Hex/AcoEt dos calos de *D. duckeana*.

FRAÇÕES COLETADAS	SISTEMA DE ELUIÇÃO
DDC3F0 – DDC3F04	DCM 100%
DDC3F5 – DDC3F8	DCM/MeOH 99:1
DDC3F9 – DDC3F12	DCM/MeOH 98:2
DDC3F13 – DDC3F16	DCM/MeOH 97:3
DDC3F17 – DDC3F20	DCM/MeOH 9:1
DDC3F21 – DDC3F25	DCM/MeOH 8:2
DDC3F26 - DDC3F31	MeOH 100%

As frações obtidas foram analisadas por meio de CCDC e reveladas com luz UV (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), iodo, sulfato cérico e cloreto férrico.

3.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS

3.4.1. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de micro diluição em placas de 96 poços e a determinação do crescimento microbiano foi dada por leitura em espectrofotômetro, metodologia adaptada de CLSI, 2012. Os inóculos foram preparados com o auxílio de uma alça calibrada descartável, onde colônias bacterianas provenientes de culturas puras, reativadas e crescidas por 24 horas foram inoculadas em caldo Müller Hinton e homogeneizadas.

A turvação do inóculo foi comparada e ajustada à turvação do tubo 0,5 da escala de MacFarland, que corresponde a uma suspensão contendo aproximadamente $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Em seguida, cada microrganismo-teste foi diluído na proporção de 1:20 e 10 µL de cada foi inoculado nas placas. Foram feitas diluições sucessivas do extrato (1000, 500, 250, 125, 62,25, 31,12 e 15,5 µg/mL), e em seguida, 100 µL de cada diluição foram adicionados em cada poço da placa.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e após esse período, lidas em espectrofotômetro a 625 nm e os valores de crescimento das bactérias obtidos e analisados. 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 entre essas duas leituras.

Os micro-organismos testados foram: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Candida albicans* ATCC 10231, CBS 6431, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, CBS 604, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Edwardsiella tarda* ATCC 15947, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Morganella morganii* ATCC 00082, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (NCTC 10038), *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Serratia marcescens* ATCC 13880 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12600.

O controle positivo utilizado foi o antibiótico oxitetraciclina a $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e como controle negativo, o próprio meio de cultura. Os microrganismos utilizados foram doados pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, 2016).

3.4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliação da atividade antioxidante utilizando o método com DPPH foi preparada uma solução de DPPH solubilizando 28 mg do DPPH em 1 mL de DCM e adicionando MeOH até atingir o volume de 100 mL. Também foi preparada uma solução do ácido ascórbico com água deionizada em uma concentração de $900 \mu\text{g}/\text{mL}$ a partir da qual foram preparadas diluições resultando nas seguintes concentrações: 0, 90, 180, 360, 540 e $720 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Posteriormente foram preparadas as curvas com DPPH, adicionando-se em seis micro-tubos $990 \mu\text{L}$ de DPPH mais $10 \mu\text{L}$ da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações. Após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm . Após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, foi adicionada uma solução dos extratos na concentração de $0,5 \text{ mg}/\text{mL}$ nas soluções de DPPH, em triplicata. Foi realizada a leitura da absorbância (517 nm) no espectrofotômetro das soluções após 30 minutos de reação.

Para avaliação da atividade antioxidante utilizando o método com Fe^{3+} a curva foi feita adicionando em seis novos micro-tubos $10 \mu\text{L}$ da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações, mais $10 \mu\text{L}$ da solução padrão de Fe^{3+} e $980 \mu\text{L}$ da solução 1,10-fenantrolina 0,25%. Após 1 hora foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 508 nm .

Após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, foram adicionadas uma solução dos extratos na concentração de $0,5 \text{ mg}/\text{mL}$ nas soluções de Fe^{3+} /fenantrolina, em triplicata. Foi realizada a leitura da absorbância (508 nm) no espectrofotômetro das soluções após 1 h de reação.

Para ambos os testes os resultados obtidos são expressos em equivalência com o ácido ascórbico, e comparados com os valores do quadro 7.

Quadro 7. Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante (Martinet. *al.*, 2014).

Análise da atividade antioxidante (mg de extrato/ mg de ac. ascórbico)	Escala de comparação
Menor que 1,0	Muito ativo
Entre 1,1 e 2,0	Ativo
Entre 2,1 e 3,0	Atividade moderada
Maior que 3,1	Inativo

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DE CALOS DE *Deguelia duckeana*

4.1.1. DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES DE *D. duckeana*

Para o tratamento de desinfestação foram testadas 21 combinações de agentes desinfestantes (tabela 1), utilizando ou não imersão prévia em solução fungicida. Imersão em etanol 70% por 3 minutos, em todos os tratamentos, e variando apenas as concentrações e combinações dos hipocloritos de sódio e cálcio.

Sendo que apenas quatro combinações apresentaram resultados considerados satisfatórios, a elas foram dados os códigos de DD18, DD19, DD20 e DD21. Os quatro tratamentos foram realizados com maiores tempos de imersão em solução fungicida, quando comparado aos outros 17 tratamentos.

Onde DD18 e DD21 apresentam os mesmos tempos de imersão em etanol 70% e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 4% (3 e 10 minutos respectivamente), e os tratamentos DD19 e DD20 os mesmos tempos de imersão em etanol 70% e NaClO 2,5% (3 e 15 minutos respectivamente).

Nos tratamentos DD18 e DD19, as folhas ficaram em solução fungicida por 48 horas, no entanto, apesar de não apresentarem contaminação, estas folhas sofreram morte celular, apresentando necrose após 3 dias da inoculação. Os tratamentos DD20 e DD21, com imersão prévia em fungicida Mancozeb® por 23 horas, apresentaram sucesso em 75 e 90% das culturas, respectivamente. Ambos os tratamentos foram repetidos para a confirmação dos resultados.

Na cultura de tecido a utilização de etanol 70% na assepsia é muito difundida. Um dos motivos é que este grau de hidratação do álcool é o ideal para a desinfestação, por permitir que este agente penetre na membrana dos micro-organismos e desnature proteínas, levando à morte. Concentrações maiores de etanol podem desnaturar a célula e também apresentar efeito bacteriostático. Além da sua ação germicida, o etanol 70% remove as ceras superficiais dos tecidos e, se aplicado inicialmente, facilita a ação de outros

agentes desinfestantes (PELCZAR *et al.*, 1980; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Recomenda-se ainda que o etanol seja utilizado em conjunto com outros agentes desinfestantes, principalmente à base de cloro, como o hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio.

Tabela 1. Combinações e tempos de imersão em agentes desinfestantes e porcentagem de contaminação e sobrevivência de explantes foliares de *D. duckeana* submetidas a diferentes desinfestações, e inoculadas em meio sólido de Murashige & Skoog (1962) (MS), após 14 dias de cultivo *in vitro* (n = 40).

TRATAMENTO	FUNGI-CIDA (T)	ETANOL 70%	NACIO 0,5%	NACIO 1,0%	NACIO 2,5%	CA(OCl) ₂ 4%	CONTAMINAÇÃO (%)	SOBREVIVÊNCIA* (%)
DD 01		3'	15'				100 f	0
DD 02		3'				15'	100 f	0
DD 03		3'	7'			7'	100 f	0
DD 04		3'			10'	10'	100 f	0
DD 05		3'				10'	100 f	0
DD 06		3'	30'				100 f	0
DD 07		4'	20'			10'	100 f	0
DD 08		4'			40'	8'	100 f	0
DD 09	17 h	3'			6'	10'	100 f	0
DD 10	17 h	3'			15'		100 f	0
DD 11	17 h	3'			5'	5'	100 f	0
DD 12	17 h	3'			10'		72,5 e	24,5
DD 13	17 h	3'				10'	100 f	0
DD 14	17 h	3'			5'		67,5 de	32,5
DD 15	17 h	3'			10'		40 bc	60
DD 16	17 h	3'				15'	50 cd	50
DD 17	17 h	3'			10'	10'	80 ef	20
DD18	48 h	3'			10'		5 a	0
DD19	48 h	3'		15'			7,5 a	0
DD20	23 h	3'		15'			25 ab	75
DD21	23 h	3'			10'		10 a	90

Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$); *Sobrevivência observada após duas semanas de cultivo.

Segundo Estrela (2002), os hipocloritos apresentam atividade antimicrobiana por sua reação complexa quando em contato com os microorganismos presentes no local a ser higienizado. Estes agem, primeiramente, degradando ácidos graxos em sais de ácidos graxos (detergente) e glicerol (álcool), o que reduz a tensão superficial da solução, permitindo que este penetre no tecido vegetal e então na membrana citoplasmática.

Após isso o hipoclorito neutraliza os aminoácidos formando água e sal, essa reação libera uma hidroxila. Neste momento o ácido hipocloroso presente na solução, quando em contato com tecido orgânico, age como solvente liberando cloro, que se combina com o grupo amino das proteínas, formando as cloraminas, e estas interferem no metabolismo celular das bactérias.

Sendo assim, o ácido hipocloroso e os íons de hipoclorito conduzem a degradação e hidrólise de aminoácidos, causando danos irreversíveis a membrana citoplasmática, interferências no metabolismo celular e inibições enzimáticas irreversíveis.

Essas ações também ocorrem em outros tecidos orgânicos, como da própria planta, por isso tratamentos com hipocloritos (sódio e cálcio) devem ser delineados experimentalmente em diferentes tempos e concentrações sendo cuidadosamente testados e avaliados, como foi demonstrado na tabela 1.

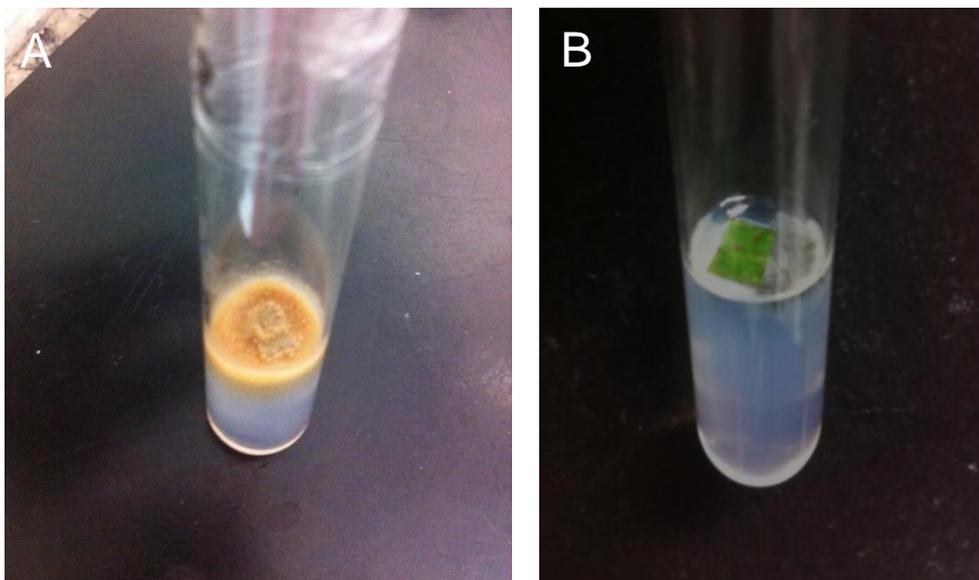
Como é possível observar que o tratamento DD08 que ficou imerso em hipoclorito de sódio a 2,5% por 40 minutos e 8 minutos em hipoclorito de cálcio a 4%, sem imersão prévia em solução fungicida, apresentou 100% de contaminação e morte do tecido vegetal (fig.8), sugere-se que o próprio tratamento levou à morte do tecido vegetal, não tendo nenhum tipo de ação sobre a contaminação fúngica do explante.

A utilização dos hipocloritos de sódio e cálcio é bastante difundida na cultura de tecidos, e o principal motivo da utilização do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ é a possibilidade de se obter tratamentos mais agressivos, com maiores concentrações de cloro, isso porque algumas culturas não respondem de forma satisfatória ao NaClO com concentrações comerciais.

A eficiência na desinfestação depende muito da condição fitossanitária da planta matriz determinando a dificuldade em descontaminar o explante durante o isolamento, é possível observar que os explantes que passaram pela pré-desinfestação com água e sabão, mas não foram imersos em solução

fungicida, não apresentaram sucesso na obtenção de culturas assépticas nem nos tratamentos que utilizaram maiores concentrações de hipoclorito de sódio e cálcio, e maiores tempos de imersão.

Figura 8. Calos de *D. duckeana* apresentando diferentes padrões de contaminação por fungos A: Folha completamente contaminada após uma semana de cultivo. B: Início de contaminação ocorrendo após uma semana de cultivo.



Apesar de serem conhecidamente tóxicas, as soluções fungicidas são comumente utilizadas na cultura de tecidos *in vitro*, e assim como outros agentes químicos, devem ser utilizados de forma controlada e equilibrada, evitando que causem danos aos tecidos vegetais. A pulverização sobre a planta matriz é o método mais recomendado (SONEGO & GARRIDO, 2014), no entanto, quando este método foi testado em nosso viveiro, desencadeou uma grande infestação de formigas (dados não publicados).

O uso de solução fungicida costuma ser por pequenos períodos de tempo, infelizmente poucos estudos científicos sobre a ação de fungicidas em cultura de tecidos foram encontrados. A maior parte se encontra em apostilas, guias e boletins técnicos.

Para o estabelecimento de culturas *in vitro* de *Mangifera indica* a partir de gemas laterais, o uso de fungicida por diferentes períodos de tempo aliado a banho em ultra-som foram eficientes para a eliminação da contaminação por fungos (ANDRADE *et al.*, 2005).

Alguns fungicidas causam danos à membrana celular pela inativação de enzimas ou proteínas essenciais, outros têm impactos específicos em vias do metabolismo fúngico, como na produção de esterol ou quitina. Como é o caso do mancozeb, fungicida da classe dos alquilenobis (ditiocarbamato), que causa disfunção geral celular por ação sobre a ligação do grupo hidrogênio-enxofre (SH) de proteínas como a cisteína, aminoácido presente na parede celular dos fungos, e metionina, um aminoácido essencial (FRAC, 2007; NELSON & COX, 2014).

Deste modo, a natureza de cada fungicida deve ser levada em conta. O mancozeb é um fungicida de contato que age somente na superfície da planta, e protege a planta de uma nova infecção, não tendo o poder de prevenir e nem evitar uma nova infecção (McGRATH, 2004). Fungicidas sistêmicos são os mais recomendados, pois estes penetram no tecido vegetal, agindo também nos fungos endofíticos, dificuldades para adquirir estes fungicidas para o nosso laboratório foram encontradas, impedindo que os mesmos fossem testados.

A possibilidade de se ter as plantas matrizes em viveiro diminui a necessidade de um grande número de testes de desinfestação, mesmo assim foi necessário testar 21 combinações de reagentes químicos.

A partir destes testes foi possível observar que a variação no tempo de imersão de fungicida foi o suficiente para aumentar a eficiência do processo de desinfestação e obter quantidade de material vegetal suficiente para que fossem realizadas as etapas posteriores.

4.1.2. INDUÇÃO DE CALO

Os explantes que se mantiveram assépticos foram transferidas para os meios de cultura com diferentes reguladores de crescimento, como demonstrado na tabela 2, DDI 01 (2 mg.L⁻¹ ANA + 3 mg.L⁻¹ BAP) resultou numa indução média de 30% de calos após duas semanas, assim como o meio de cultura DDI 04 (6 mg.L⁻¹ BAP + 2 mg.L⁻¹ ANA) e DDI 07 (4 mg.L⁻¹ 2,4-D) que também resultou em uma indução média de 30% de calos. Em DDI 03 (15 mg.L⁻¹ Pic + 2 mg.L⁻¹ Kin) induziu a formação de calos em apenas 15% dos explantes. A prospecção de melhores resultados levou à combinação destes reguladores de crescimento onde DDI 08 (3 mg.L⁻¹ BAP + 2 mg.L⁻¹ ANA + 2 Kin)

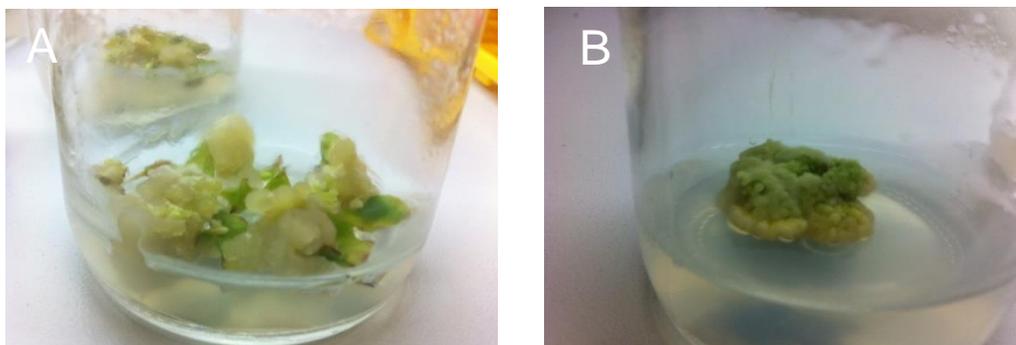
induziu calos em 75 % dos explantes avaliados, após 2 semanas de cultivo (fig. 9).

Tabela 2. Combinações e concentrações (mg.L⁻¹) de auxinas e citocininas e porcentagem de indução de calos em explantes foliares de *Deguelia duckeana*, após 30 dias de cultivo *in vitro* (n = 20).

TRATAMENTO	[] AUXINA (mg.L ⁻¹)	[] CITOCININA (mg.L ⁻¹)	% INDUÇÃO
DDI 01	2 ANA	3 BAP	30 b
DDI 02	10 Pic	2 Kin	0 c
DDI 03	15 Pic	2 Kin	15 bc
DDI 04	2 ANA	6 BAP	30 b
DDI 05	2 2,4-D	-	20 bc
DDI 06	4 2,4-D	2 Kin	20 bc
DDI 07	4 2,4-D	-	30 b
DDI 08	2 ANA	3 BAP+ 2 Kin	75 a

Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey($p \leq 0,01$).

Figura 9. Indução de calo de *Deguelia duckeana* a partir de folhas em meio de cultura semi-sólido. A: Indução de calo em segmento foliar aos 30 dias de cultivo. B: Calo de *Deguelia duckeana* completamente formado após o primeiro repique.



Embora a indução de calos seja possível apenas com a adição de uma auxina ao meio de cultura, muitas vezes a utilização de uma auxina combinada com uma ou duas citocininas pode ser necessária para se obter melhores resultados, como é o caso apresentado. Pois esta condição pode estar relacionada à manutenção do apropriado balanço endógeno entre auxinas e citocininas, que podem agir de forma sinérgica na regulação da divisão celular, processo essencial para a formação do calo (JOHRI & MITRA, 2001; ROY & BANERJEE, 2003).

Os calos obtidos foram multiplicados no meio de cultura que apresentou maior sucesso na indução (3 mg.L⁻¹ de BAP + 2 mg.L⁻¹ de ANA + 2 mg.L⁻¹ de Kin), sendo repicados a cada 30 dias para obtenção de biomassa para posterior extração. O material vegetal coletado (fig.10) para obtenção de extratos no 5º e 7º repiques para análise prévia do perfil fitoquímico, e 11º, 12º e 15º repiques para extração fracionamento e isolamento de substâncias, apresentavam características bastante diversas, deste modo não foram separados por morfologia, e sim agrupados por data de repique.

Figura 10. Calos frescos coletados em frascos para congelamento, secagem e posterior extração.



Tabela 3. Rendimentos de massa seca de calos de *D. duckeana* e Teor de água em porcentagem de água, nos 5º, 7º, 11º, 12º e 15º repiques.

Repique	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Teor de água (%)
5	95,40	10,40	89,09
7	189,13	21,40	88,68
11	209,00	22,91	89,04
12	296,61	25,79	91,30
15	299,81	31,55	89,48
Total	805,42	80,50	90,00

Na tabela 3 é possível observar os rendimentos de massa seca e porcentagem de água ao longo dos repiques, com estes valores é possível observar a constância na quantidade de massa seca obtida com a porcentagem de massa seca varia entre 9 e 11% de células.

Quando avaliado o crescimento celular em calos, a massa seca se apresenta como a medida mais precisa, pois, segundo Figueiredo e colaboradores (2000) pode ocorrer acúmulo de água nos vacúolos após o calo ter atingido o seu crescimento máximo, sendo assim, a massa total dos calos pode aumentar devido a absorção de água do meio, e/ou esteja sendo metabolizado os estoques de carbono da célula, quando o meio estiver se exaurindo, o que diminui o percentual de massa seca em relação massa fresca.

Pelos dados obtidos é possível observar que o tempo de 30 dias para o repique é um tempo bom quando se visa à constância na obtenção de biomassa para extrações de metabólitos secundários, não é possível afirmar que este é o tempo ideal, pois não foram realizados testes com outros tempos de coleta.

O estabelecimento das suspensões celulares não foi possível, após 3 semanas todas as culturas se encontravam escurecidas, aparentemente oxidadas e mortas, as tentativas de se obter suspensões foram repetidas por duas vezes, e o resultado foi o mesmo em ambas. Acredita-se que as culturas não estavam friáveis o suficiente, além disso, outros meios de cultura não foram testados.

4.2. FITOQUÍMICA DE CALOS DE *D. duckeana*

4.2.1 ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA DOS EXTRATOS DAS FRAÇÕES A PARTIR DA COLUNA 0 (DDC0)

As análises cromatográficas em camada delgada comparativa das frações foram realizadas com o intuito de verificar as possíveis classes químicas presentes na amostra, assim como o grau de pureza.

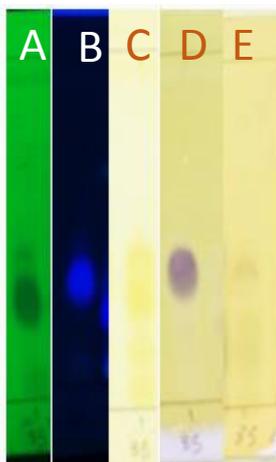
Ao analisar as 66 frações obtidas foi possível observar que as frações 0, 8 e 35 quando reveladas com luz U.V. no comprimento de onda de 254 nm e 365 nm, apresentavam manchas fluorescentes, sugerindo a presença de substâncias contendo ligações químicas com duplas conjugadas. Quando vaporizado por iodo foi possível observar manchas amarelas em todas as frações, sugerindo a presença de substâncias com ligação química insaturada (dupla ligação).

Foi possível observar que as três frações quando reveladas com sulfato cérico apresentaram uma coloração lilás indicando a possível presença de terpenos, ressaltando que a fração 08 (DDC0F08) apresentou coloração avermelhada quando em contato com sulfato cérico, antes desta ser aquecida.

Com cloreto férrico se observou uma coloração castanho escuro indicando a possível presença de flavonoides, ou outras substâncias aromáticas. Devido ao fato destas três frações apresentarem características interessantes assim como um aparente grau de pureza quando comparadas as outras frações, estas foram selecionadas para análise por EM e RMN de ^1H .

As análises por EM das frações DDC0F0 e DDC0F35 sugeriram fórmulas moleculares de triterpenos, e a fração DDC0F08 de flavonoide. No entanto tanto a fração DDC0F0 quanto a DDC0F08 quando analisadas por RMN uni e bidimensionais apresentaram um nível de mistura que não permitiu identificação das substâncias presentes. A partir da fração DDC0F35 foi possível identificar a substância I (fig. 11).

Figura 11. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações DDC0F35 da coluna realizada a partir do extrato hexano/acetato dos calos de *D. duckeana*.



Legenda: Reveladores A: luz ultravioleta 254 nm; B: luz UV 365 nm; C: iodo; D: sulfato cérico; E: cloreto férrico. Sistema de eluição: Hexano/DCM 2:8.

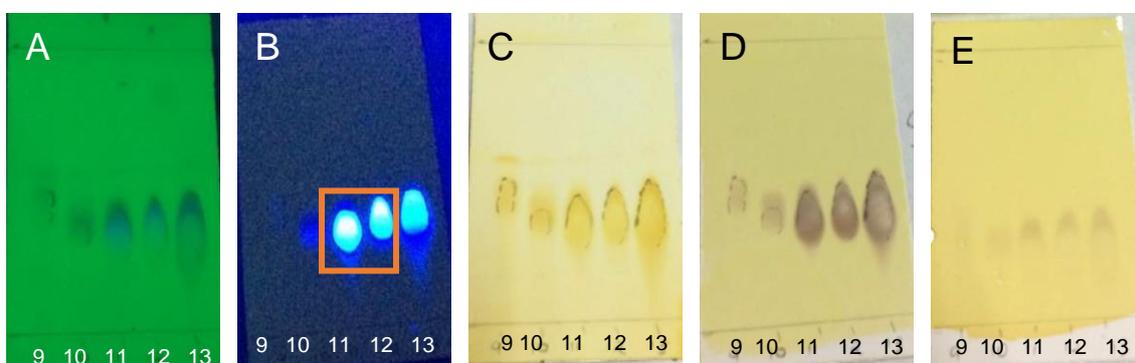
4.2.2 ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA DOS EXTRATOS DAS FRAÇÕES DA COLUNA 2 (DDC2)

As frações DDC0F25 a DDC0F30 foram reunidas e novamente fracionadas. Desta, as frações DDC2F11 a DDC2F16 quando reveladas com luz UV no comprimento de onda de 254 nm (A), revelaram manchas azul escuro com bordas azul claro, indicando a presença de grupos com ligações

duplas e/ou átomos com elétron livres. No comprimento de onda de 365 nm foi possível verificar fluorescência de cor azul muito intensa. As frações revelaram em cinza quando em sulfato cérico, e negra para cloreto férrico, que segundo a literatura sugere a presença de anéis aromáticos.

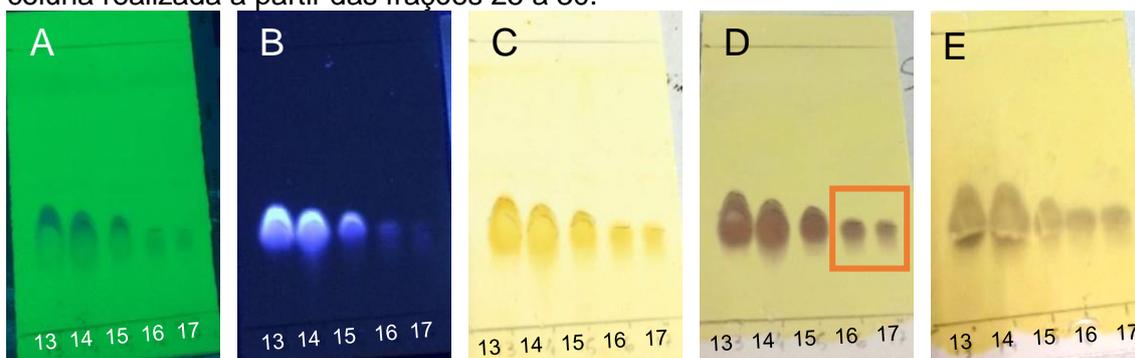
Devido à semelhança apresentada pelas frações DDC2F11-DDC2F12 e DDC2F16-DDC2F17 (fig. 12 e 13), as mesmas foram reunidas e enviadas para análise de EM, de ^1H e de ^{13}C RMN, onde foi possível identificar a substância II.

Figura 12. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações 9 a 13 da coluna realizada a partir das frações 25 a 30



Legenda: Reveladores A: luz ultravioleta 254 nm; B: luz UV 365 nm; C: iodo; D: sulfato cérico; E: cloreto férrico. Sistema de eluição: Hexano/DCM 4:6.

Figura 13. Cromatografia em camada delgada comparativa das frações 13 a 17 da coluna realizada a partir das frações 25 a 30.



Legenda: Reveladores A: luz ultravioleta 254 nm; B: luz UV 365 nm; C: iodo; D: sulfato cérico; E: cloreto férrico. Sistema de eluição: Hexano/DCM 3:7.

4.2.3. ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA DOS EXTRATOS DAS FRAÇÕES DA COLUNA 3 (DDC3)

As frações DDC3F09, DDC3F10-11, DDC3F13-14, DDC3F17, DDC3F18-19 foram selecionadas por apresentar absorção da luz quando revelado em UV 254 nm, o que sugere a existência de substâncias com duplas conjugadas e sistemas aromáticos, além de revelarem para sulfato cérico o que

sugere a presença de terpenos, sendo assim foram enviadas para análise de EM. No entanto observou-se que as mesmas estavam em mistura, não sendo possível a identificação ou elucidação estrutural. Motivo pelo qual não foram analisadas por RMN.

4.3. IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS DE CALOS DE *D. duckeana*

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H do extrato hexano/AcOEt de calos de *D. duckeana*, foi possível observar sinais na região de entre δ_{H} 0,76 e 1,6 referente as metilas (A), outro sinal interessante foi a presença de hidrogênios com deslocamento em δ_{H} 9 o que sugeriu a presença de aldeído (B) (fig. 15).

Devido ao fato do espectro do extrato mostrar sinais interessantes, indicando a possível presença de terpenos, o mesmo foi submetido a fracionamento sucessivo como mostrado no item 3.3.1 sendo possível isolar e identificar duas substâncias.

Figura 14. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato hexano/acetato 1:1 de calos de *D. duckeana*.

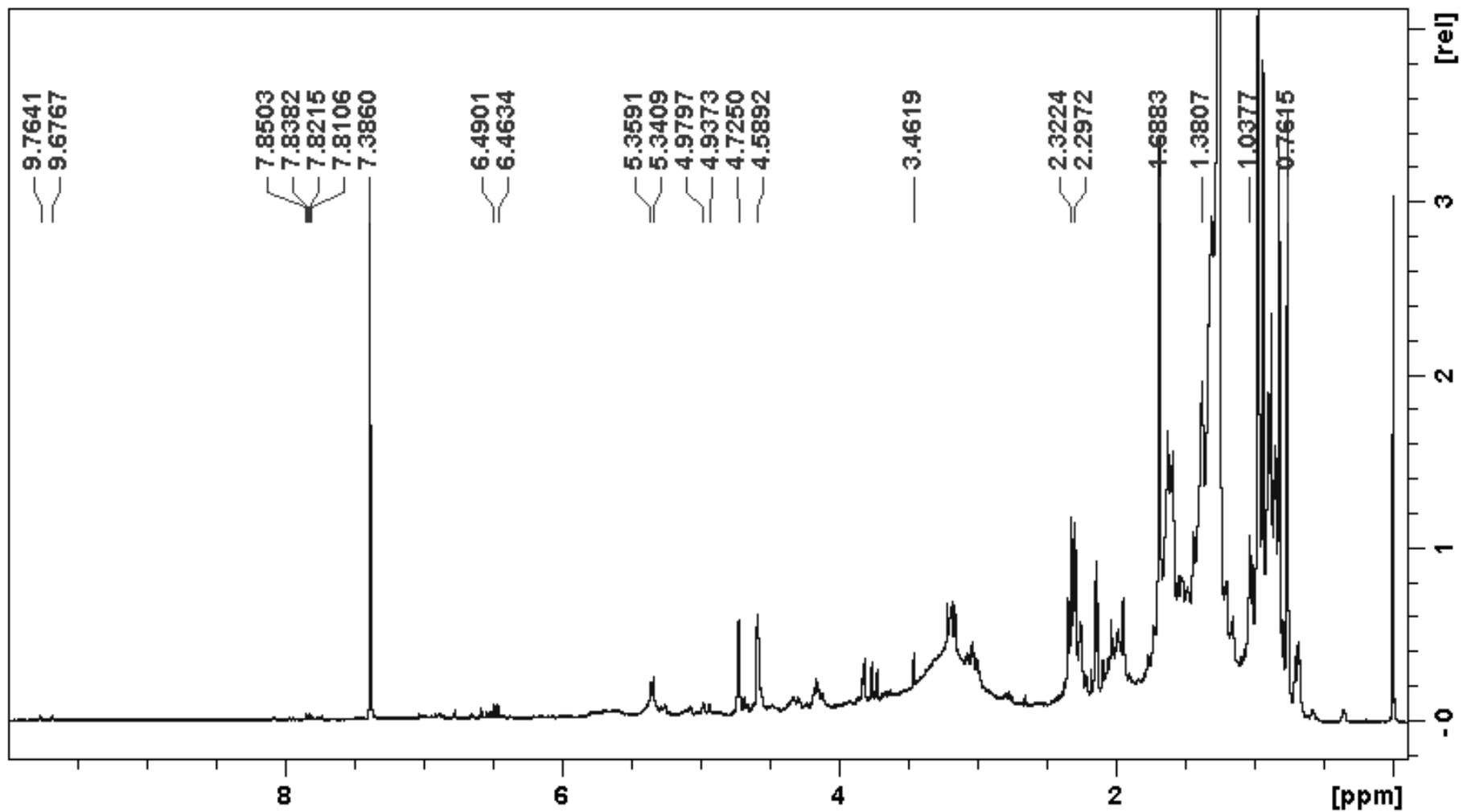


Figura 15. Expansão da região entre δ_H 0 a 5 do espectro de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) do extrato hexano/acetato 1:1 de calos de *D. duckeana*.

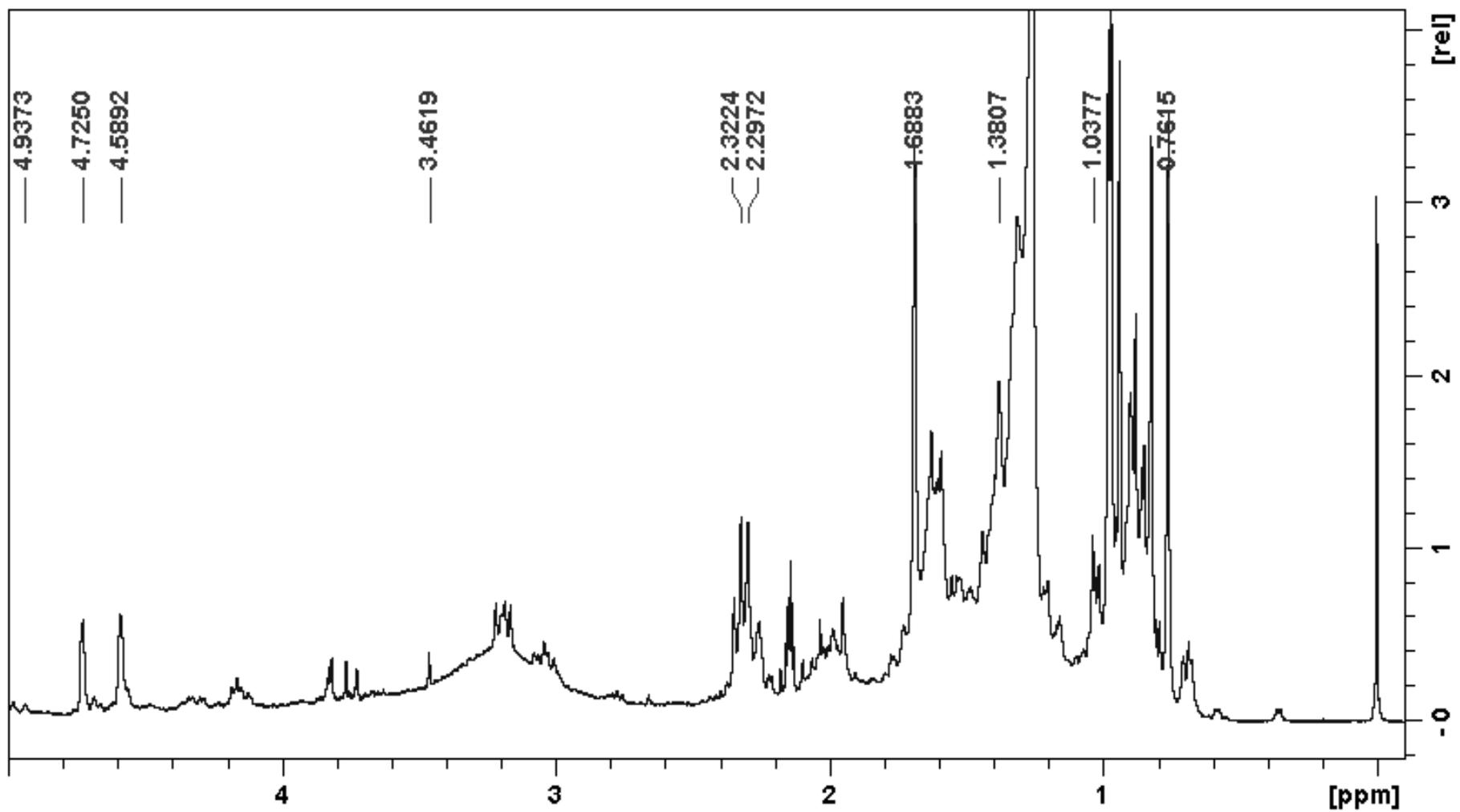
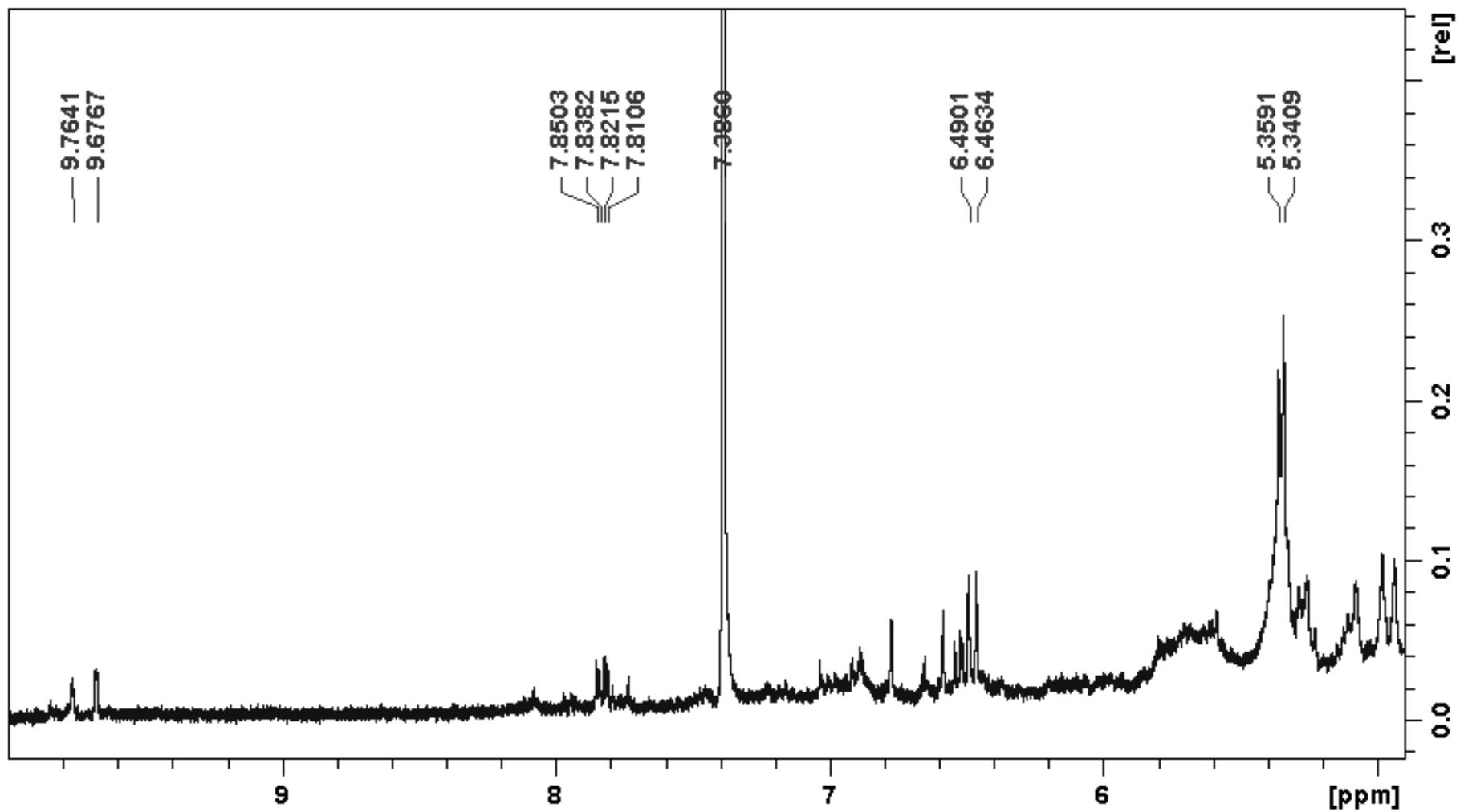


Figura 16. Expansão da região entre δ_H 5 a 10) de espectro de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) do extrato hexano/acetato 1:1 de calos de *D. duckeana*.



4.3.1. 3 β -HIDROXI-20(29)-LUPEN-28-AL (BETULINALDEIDO) (I)

A substância I (fração DDC0F35) foi obtida a partir da coluna realizada com o extrato hexano/acetato, na forma de cristais, solúvel com diclorometano. Quando analisado em EM apresentou o pico íon *quasi*-molecular em $[M+H]^+$ de 441,3705 m/z , consistente com a fórmula do triterpeno $C_{30}H_{48}O_2$.

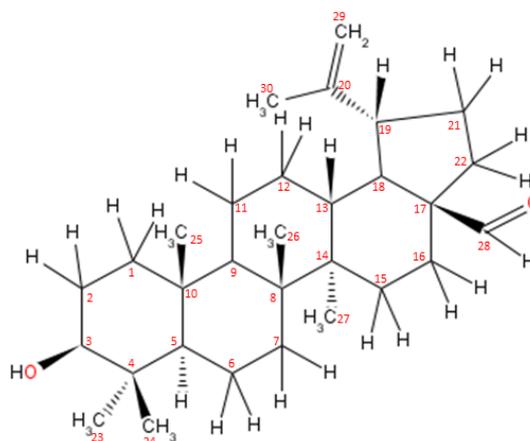
Quando analisados os espectros de RMN 1H e ^{13}C observaram-se os sinais entre δ_H 0,75 e 1,14 (fig. 18 e 19), referente às metilas de triterpenos, além disso, foi observado sinais típicos de moléculas de lupeol, dois singletos com deslocamento em δ_H 4,61 e 4,74 referentes aos dois hidrogênios da ligação dupla terminal (H-29) o qual foi confirmado pelo espectro de HSQC onde é possível observar que o carbono metilênico (C-29) com deslocamento em δ_C 110,18 se acopla com os hidrogênios referentes a ligação dupla (fig. 25).

No espectro de ^{13}C , além do sinal em δ_C 110,18 (C-29), foi observado também um carbono quaternário com deslocamento em δ_C 149,7 ppm correspondente ao C-20, ambos característicos do grupo olefínico (fig. 21).

Outro sinal característico observado foi no espectro de RMN de 1H (fig. 20), um singlete em δ_H 9,68 se correlacionando com o sinal de carbono quaternário com deslocamento em δ_C 206,77 (fig. 23) que indica a presença de um aldeído ligado ao C-28 na molécula, confirmado pelo mapa de contorno HSQC. Todos esses dados permitiram a identificação da molécula como sendo o 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (fig. 17).

Mahato e Kundu (1994) relatam o grande número de moléculas derivadas do lupeol ocorrendo de forma natural em diversas espécies vegetais, entre elas o 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al, também chamado de betulinaldeído. Esta substância teve seus dados de RMN ^{13}C relatados por Monaco e Previtera (1984) quando realizavam o estudo fitoquímico de folhas de *Quercus suber*.

Figura 17. Estrutura do betulinaldeído obtido dos calos de *D. duckeana*



3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) (I)

Quando analisados os mapas de contornos bidimensionais COSY, HMBC e HSQC desta substância foi possível observar que é necessária a correção da atribuição dos dados de RMN de ^{13}C da substância 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) entre os carbonos 15 e 22, e 25 e 26 (quadro 8), os autores Monaco e Previtera (1984) já relatavam a possibilidade de estes carbonos estarem em posições trocadas, estando marcados com a letra *a* e *b* no quadro 8. Essa afirmação é feita com base nas observações dos mapas de contorno (fig. 26 e 27).

Conforme pesquisa bibliográfica, a maioria dos estudos com extratos vegetais em que foi relatada a presença do betulinaldeído este aparece com seus análogos, lupeol, betulina e ácido betulínico (RIOS *et al.*, 2001; ZIEGLER *et al.*, 2004; DORR *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011).

Rios e colaboradores (2001) relatam a presença de betulinaldeído, lupeol, esqualeno, betulonaldeído, β-sitosterol em extratos não citotóxicos de *Phoradendron reichenbachia*, quando testados em linhagens de células de tumorais.

Assim como em estudo com ácido betulínico, betulina, betulinaldeído e lupeol não apresentaram ação fungicida frente a *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis obscurans* e *P. viticola* em ensaios de microdiluição, no entanto os

autores citam a possibilidade desses resultados serem negativos devido à natureza lipofílica das substâncias, e o ensaio ser realizado em meio aquoso.

Quadro 8. Dados de RMN de ^{13}C do 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) isolado do extrato DdC0F35 dos calos de *Deguelia duckeana*, em CDCl_3 (75 MHz) e comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; MONACO & PREVITERA, 1984).

3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al			
Posição	Literatura	Observado	Multiplicidade
1	38,7	38,85	CH ₂
2	27,3	27,38	CH ₂
3	78,9	78,99	CH
4	38,8	38,72	C
5	55,5	55,29	CH
6	18,2	18,26	CH ₂
7	34,3	34,31	CH ₂
8	40,8	40,81	C
9	50,4	50,46	CH
10	37,1	37,16	C
11	20,7	20,74	CH ₂
12	25,5	25,52	CH ₂
13	38,7	38,69	CH
14	42,5	42,55	C
15	29,2 ^a	33,23	CH ₂
16	28,8 ^a	28,80	CH ₂
17	59,3	59,35	C
18	48,0 ^b	48,04	CH
19	47,5 ^b	47,53	CH
20	149,7	149,7	C
21	29,8	29,24	CH ₂
22	33,2	29,85	CH ₂
23	27,9	27,98	CH ₃
24	15,4	15,36	CH ₃
25	15,9 ^b	16,15	CH ₃
26	16,1 ^b	15,89	CH ₃
27	14,2	14,27	CH ₃
28	205,6	206,77	C
29	110,1	110,18	CH ₂
30	19,0	19,00	CH ₃

Em estudo com ácido betulínico e seus análogos Ziegler e colaboradores (2004) comprovaram a ação antiplasmódica do betulinaldeído e lupeol, onde agem evitando o crescimento do *Plasmodium falciparum* em testes *in vitro*, estas substâncias modificam a membrana dos eritrócitos evitando a invasão e multiplicação de *P. falciparum*.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

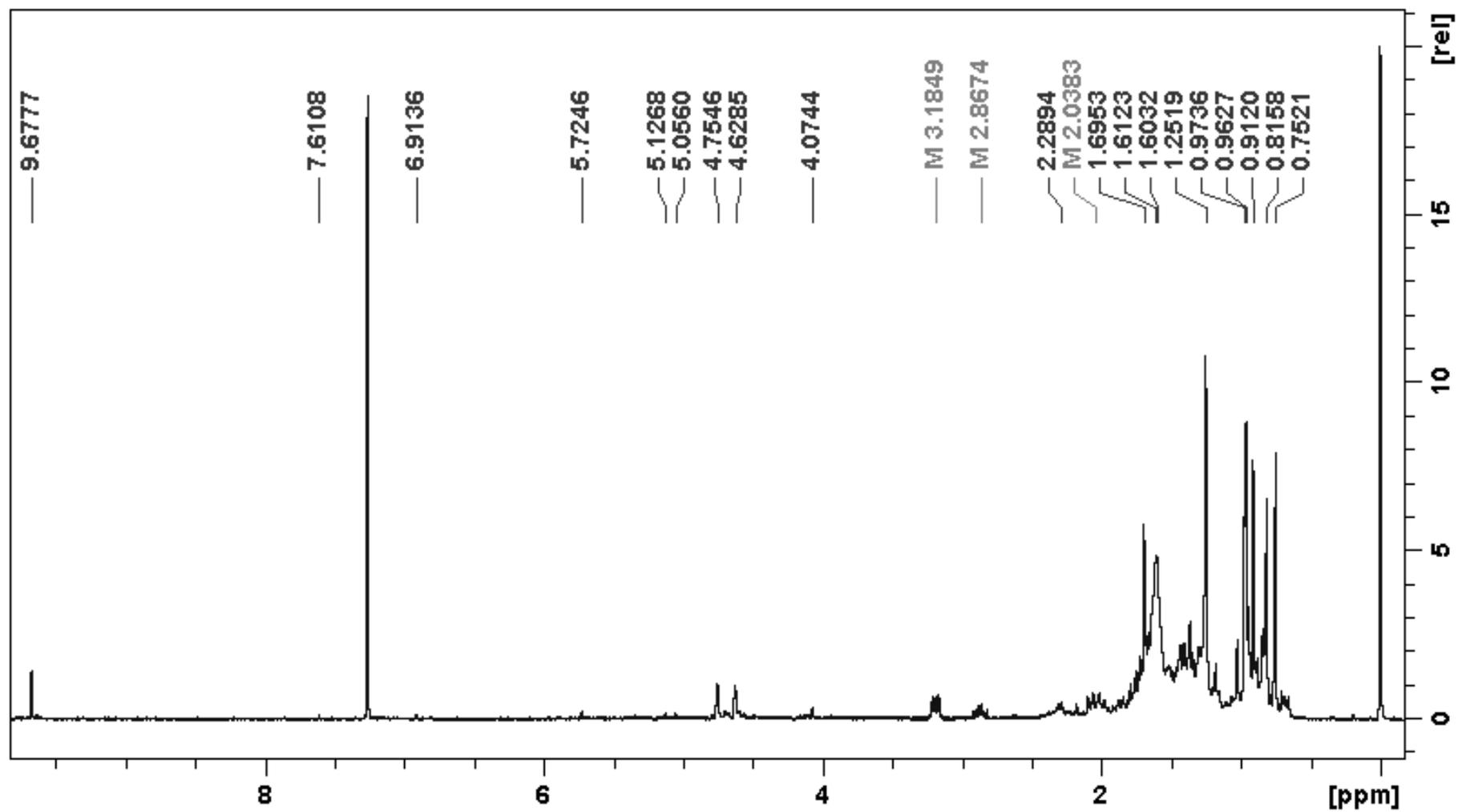


Figura 19. Expansão da região entre δ_H 0 a 5 ppm do espectro de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

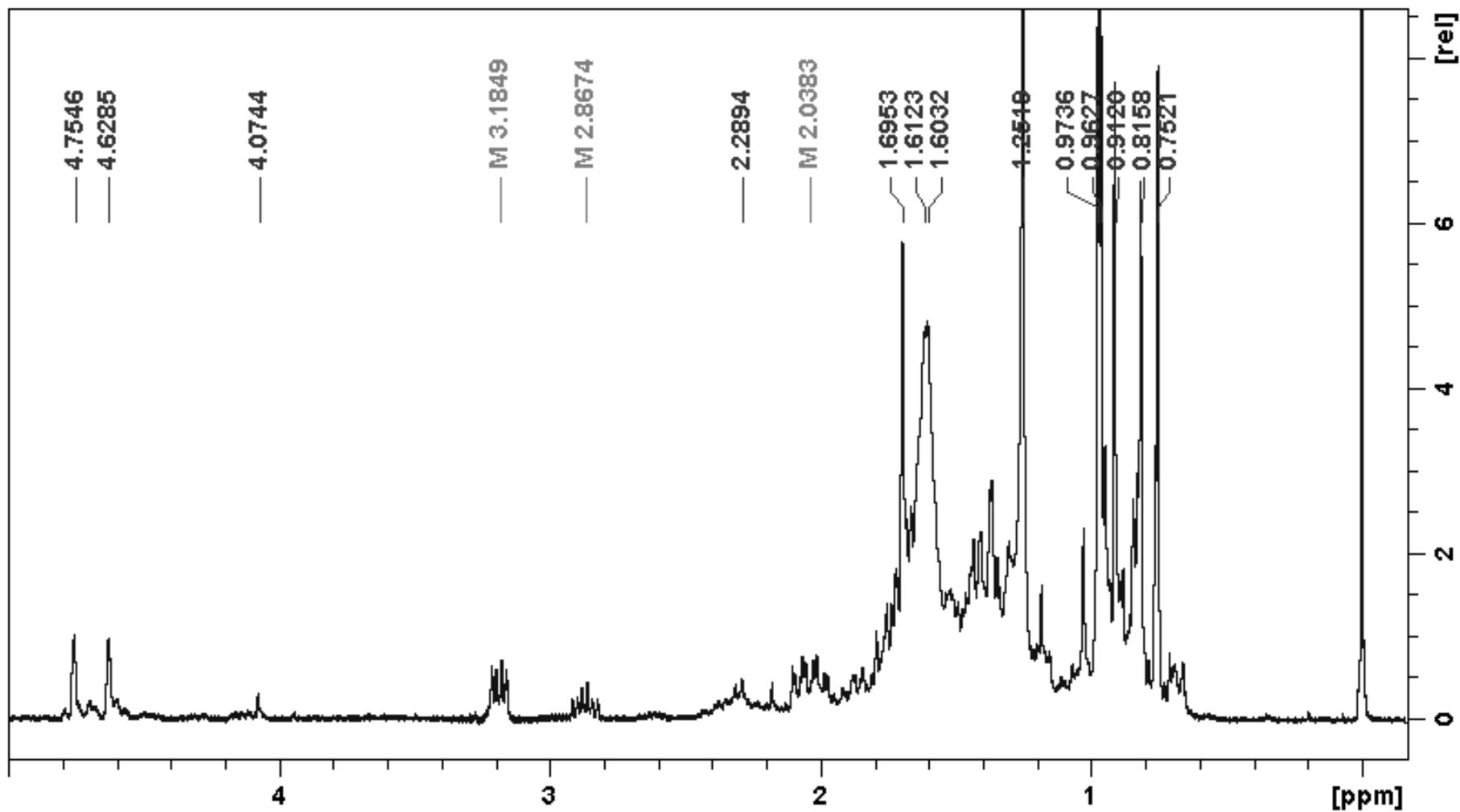


Figura 20. Expansão da região entre δ_H 5 a 10 do espectro de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

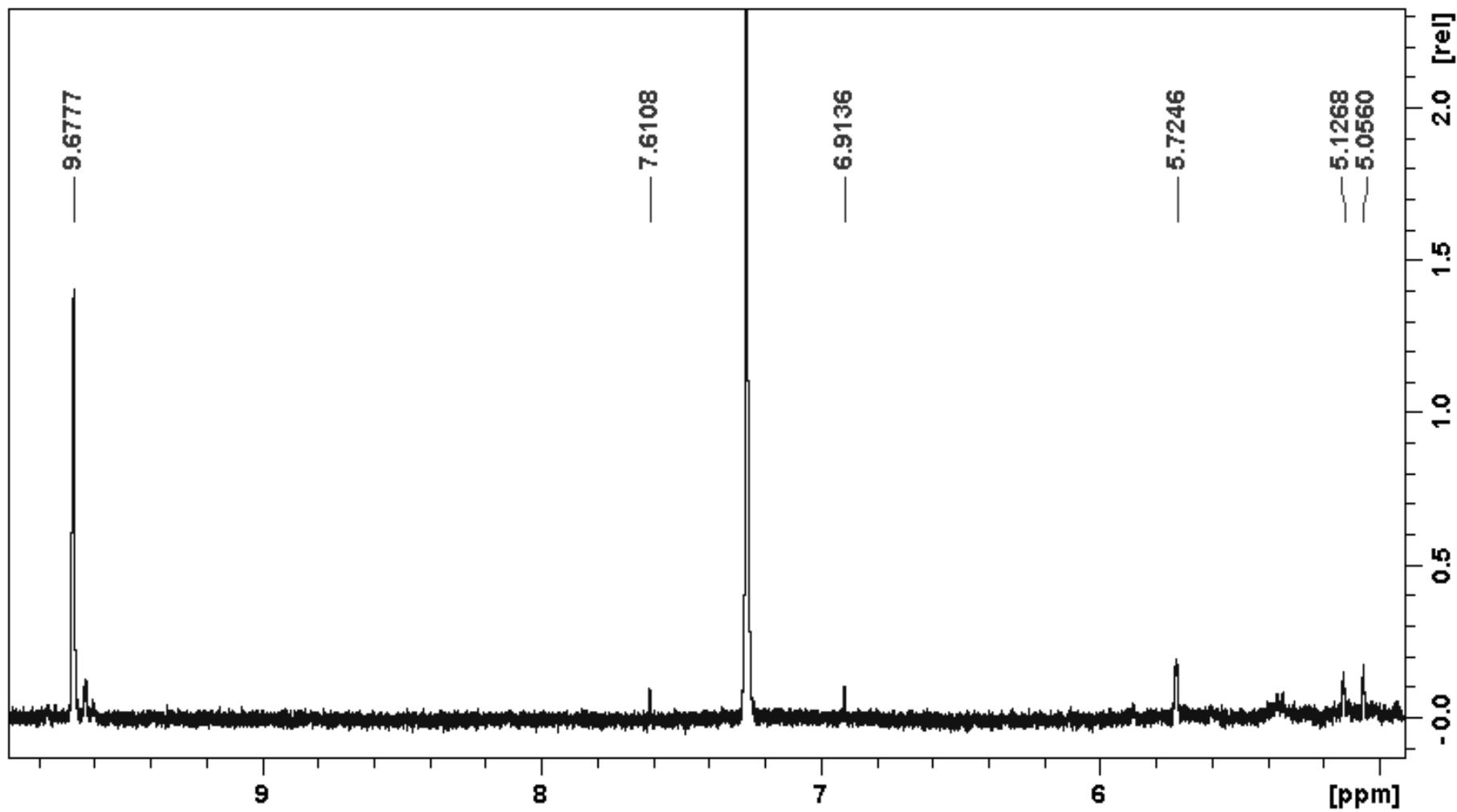


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da substância 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

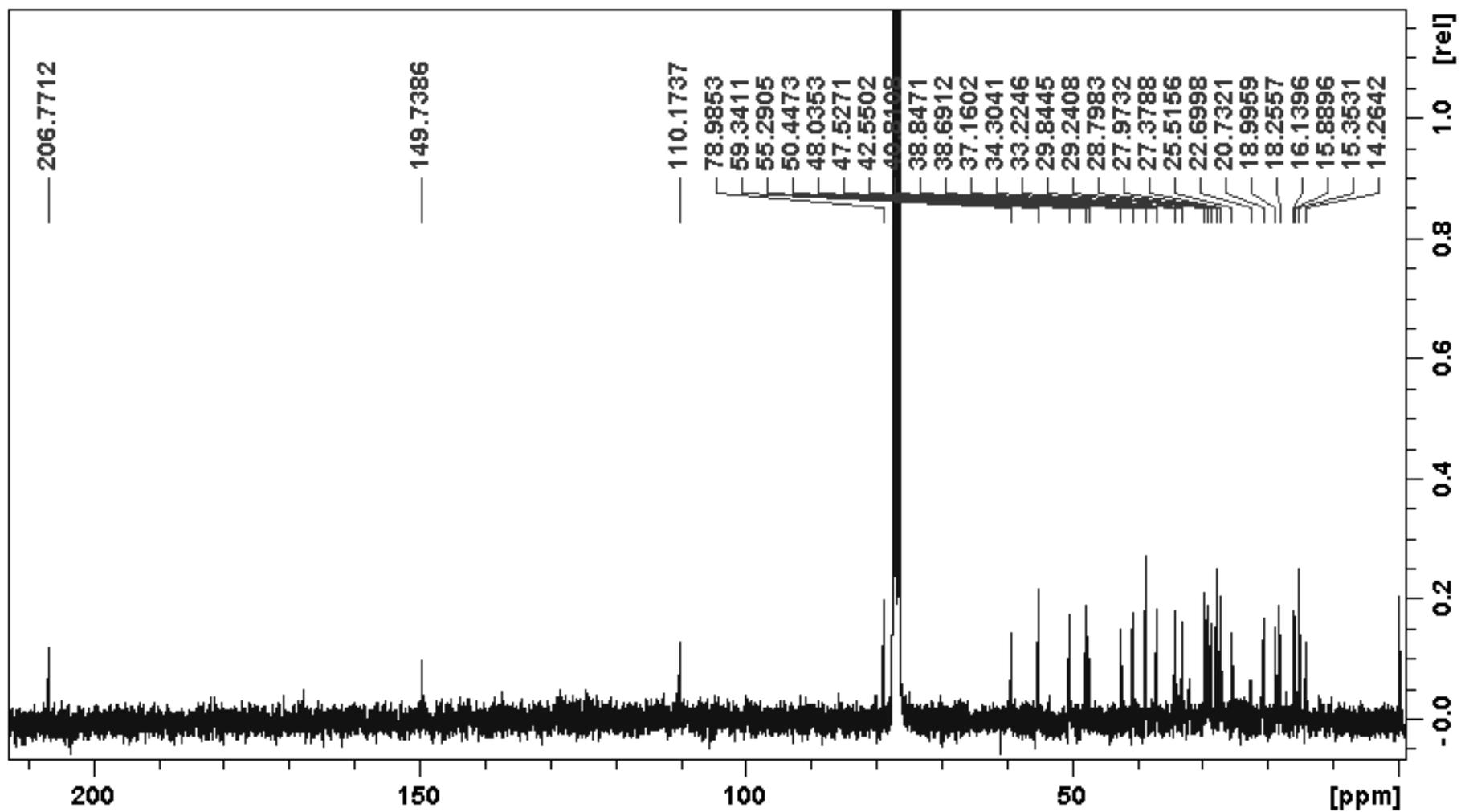


Figura 22. Expansão da região entre δ_C 14 a 79 do espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

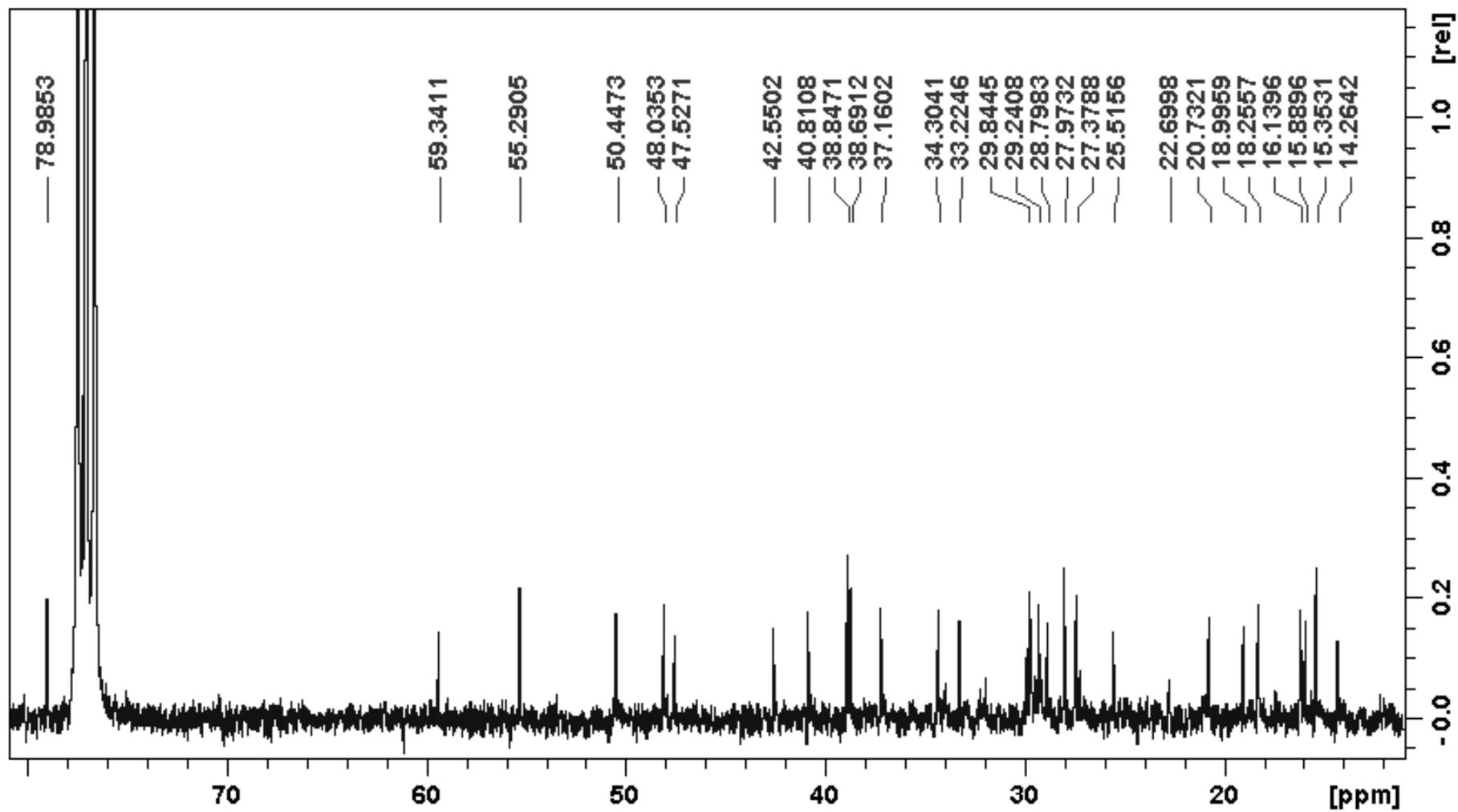


Figura 23. Expansão da região entre δ_C 109 a 207 do espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

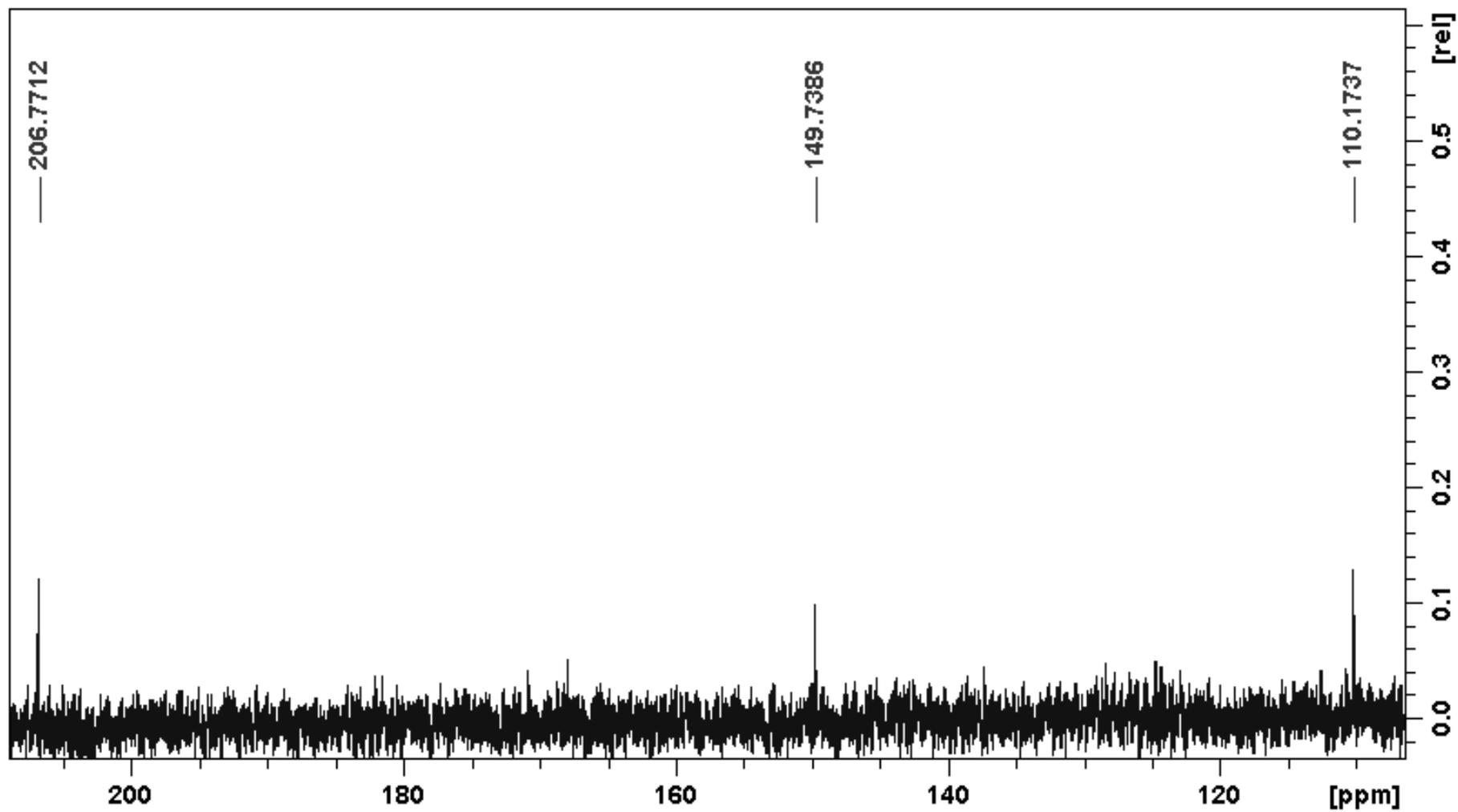


Figura 24. Mapa de contorno HSQC da substância 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

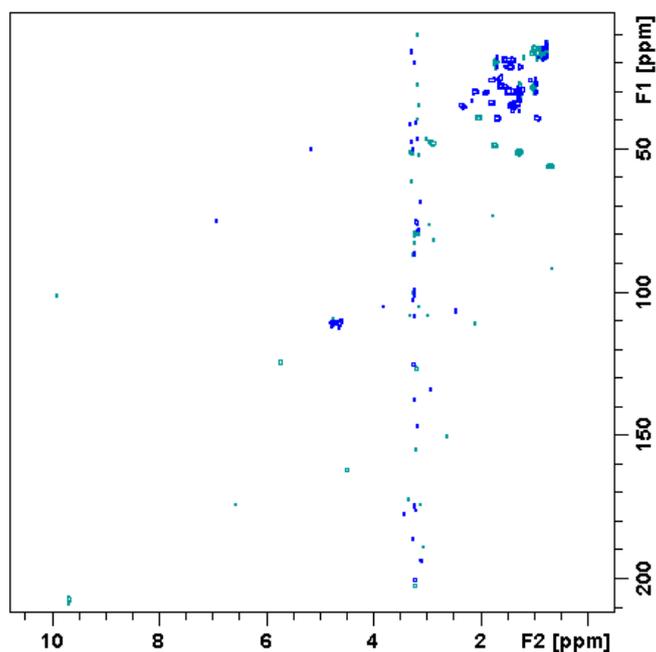


Figura 25. Expansão do mapa de contorno HSQC da substância 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído). A: Carbono 29 com deslocamento de δ_c 110,18 ppm acoplado com hidrogênios δ_H 4,61 e 4,74 ppm. B: C-28, δ_c 206,77 ppm acoplado com δ_H 9,68 ppm, típico de aldeído.

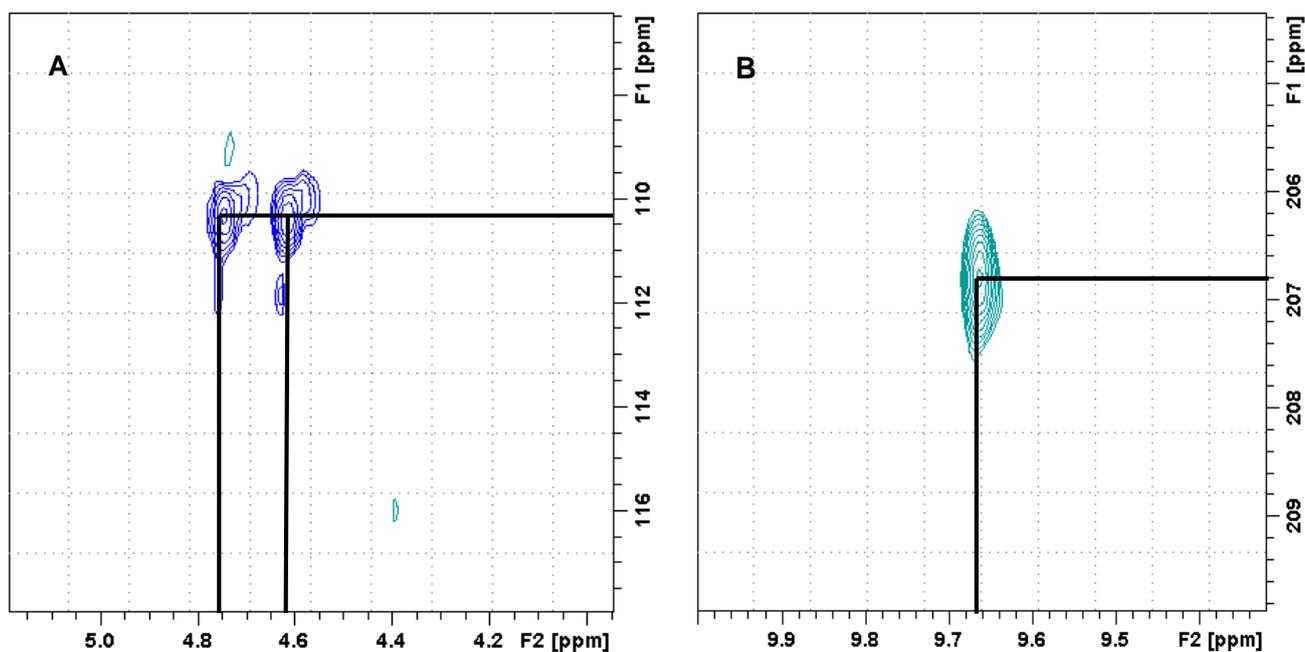


Figura 26. A: Mapa de contorno COSY da substância 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído). B: Expansão dos acoplamentos entre δ_H 1,70 com 4,75; δ_H 1,35 com 1,78 ppm; δ_H 1,44 com 2,08; δ_H 1,60 com 3,19

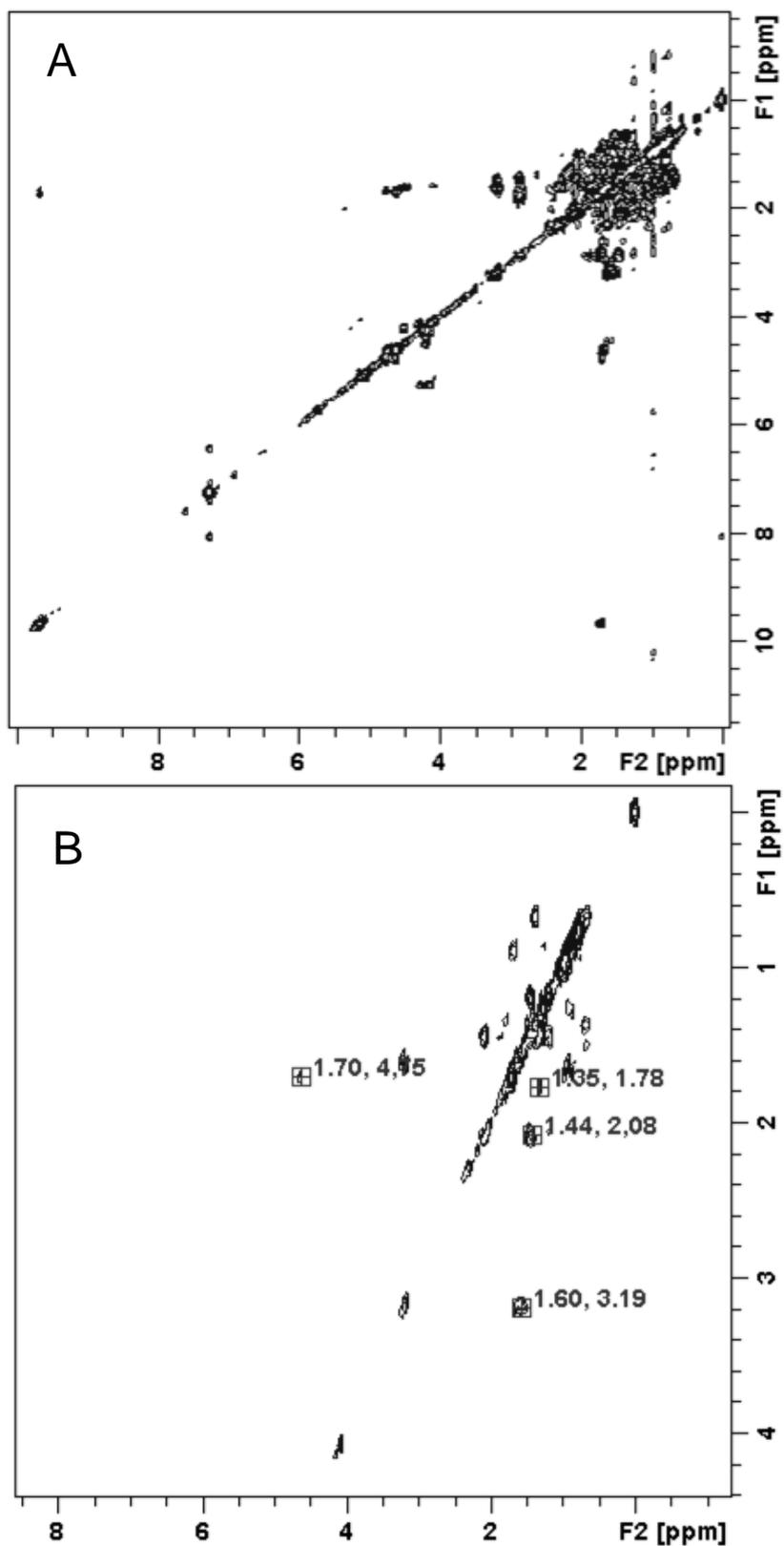
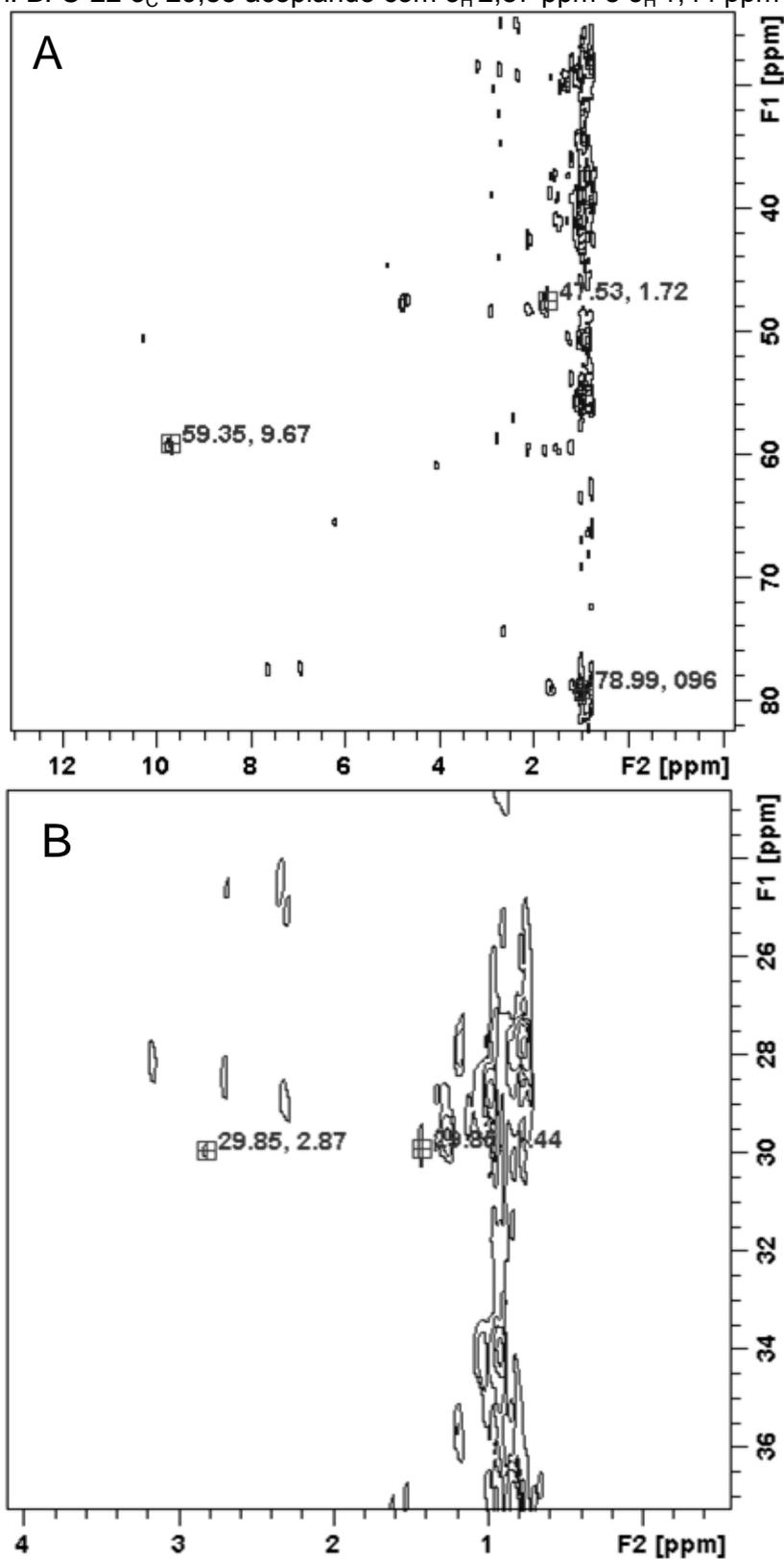


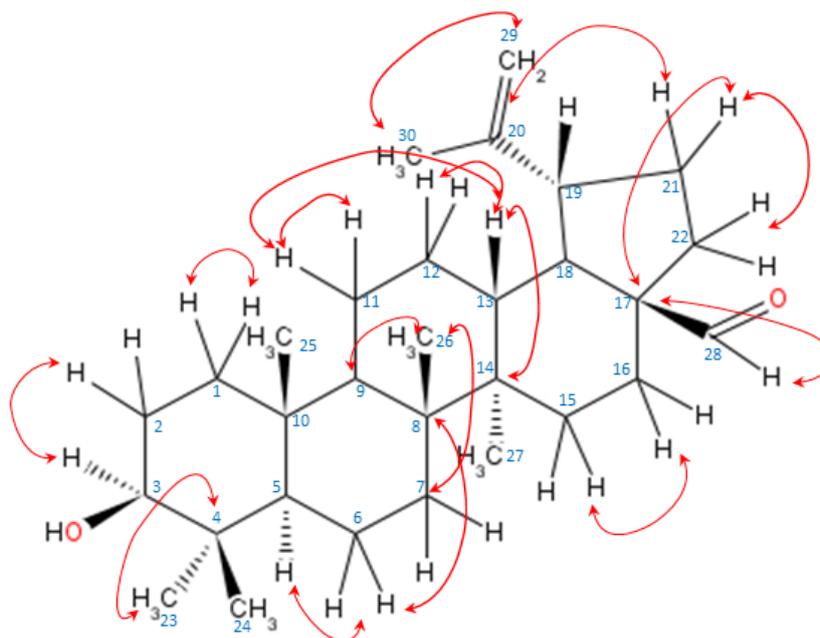
Figura 27. Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído). A: C-17 com deslocamento de δ_C 59,35 ppm acoplado com hidrogênios δ_H 9,68 ppm.; C-19, δ_C 47,53 ppm com δ_H 1,72 ppm; C-3, δ_C 79,9 ppm δ_H 0,96 ppm. B: C-22 δ_C 29,85 acoplando com δ_H 2,87 ppm e δ_H 1,44 ppm



Quando os triterpenos betulinaldeído, nitrila betulinica e ácido morolico foram utilizados como precursores na síntese de drogas, todas elas apresentaram atividade anti-HIV, inibindo a fase tardia da replicação do vírus, e provavelmente a maturação do mesmo, sendo uma promissora fonte alternativa para anti-retrovirais (DORR *et al.*, 2011).

A partir dos mapas de contorno COSY e HMBC foi possível confirmar a estrutura da substância isolada, bem como inferir o número dos carbonos demonstrados no quadro 8, os acoplamentos entre hidrogênios visíveis nas expansões demonstradas na figura 26 e acoplamentos entre carbonos e hidrogênios observadas nas figuras 27 permitiram determinar as correlações, como apresentado na figura 28.

Figura 28. Correlações encontradas nos mapas de contorno HMBC e COSY na molécula de 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).



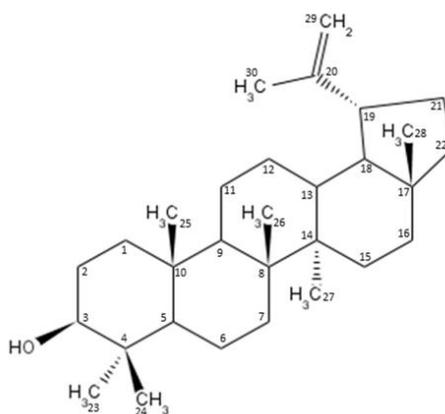
4.3.2. LUPEOL

As frações 11-12 e 16-17 reunidas, da coluna 02 (DDC2F11-12; DDC2F16-17) foram analisadas por RMN de ¹H (fig. 30 e 31) e ¹³C (fig. 34) e foi observado que apresentavam sinais típicos do triterpeno lupeol, com hidrogênios de ligação dupla terminal com deslocamento em δ_H 4,57 e 4,69 que em HSQC acopla com o carbono em δ_C 109,32, além da presença dos

sinais entre δ_H 0,7 e 1,25, típicos de metilas de triterpenos, pelos mapas de contorno e comparado com os dados encontrados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) foi possível determinar a estrutura como sendo o lupeol (fig. 29).

No espectro de RMN de 1H é possível notar também que há contaminação por acetona, que é evidenciado por um singleto em δ_H 2,17 (fig. 30), provavelmente resíduo da lavagem do tubo de RMN antes de se depositar a amostra no mesmo, essa contaminação foi comprovada quando analisados os mapas de contorno HMBC e COSY, onde o hidrogênio não se correlaciona com os hidrogênios e carbonos da molécula.

Figura 29. Estrutura do lupeol isolado a partir de calos de *D. duckeana*.



Quadro 9 - Dados de RMN de ^{13}C do lupeol isolado do extrato DdC2F11-12 e DdC2F16-17 dos calos de *Deguelia duckeana*, em CDCl_3 (75 MHz) e comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994).

Posição	Lupeol		Multiplicidade
	Literatura	Observado	
1	38,7	38,69	CH_2
2	27,4	27,40	CH_2
3	78,9	78,99	CH
4	38,8	38,85	C
5	55,3	55,28	CH
6	18,3	18,31	CH_2
7	34,2	34,26	CH_2
8	40,8	40,82	C
9	50,4	50,42	CH
10	37,1	37,15	C
11	20,9	20,92	CH_2
12	25,1	25,12	CH_2
13	38,0	38,03	CH
14	42,8	42,82	C
15	27,4	27,43	CH_2
16	35,5	35,57	CH_2
17	43,0	42,99	C
18	48,0	48,28	CH
19	47,9	47,98	CH
20	150,9	150,99	C
21	29,8	29,83	CH_2
22	40,0	39,99	CH_2
23	28,0	27,98	CH_3
24	15,4	15,37	CH_3
25	16,1	16,12	CH_3
26	15,9	15,97	CH_3
27	14,5	14,54	CH_3
28	18,0	17,99	CH_3
29	109,3	109,32	CH_2
30	19,3	19,30	CH_3

Figura 30. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância lupeol do extrato DDC2F11-12

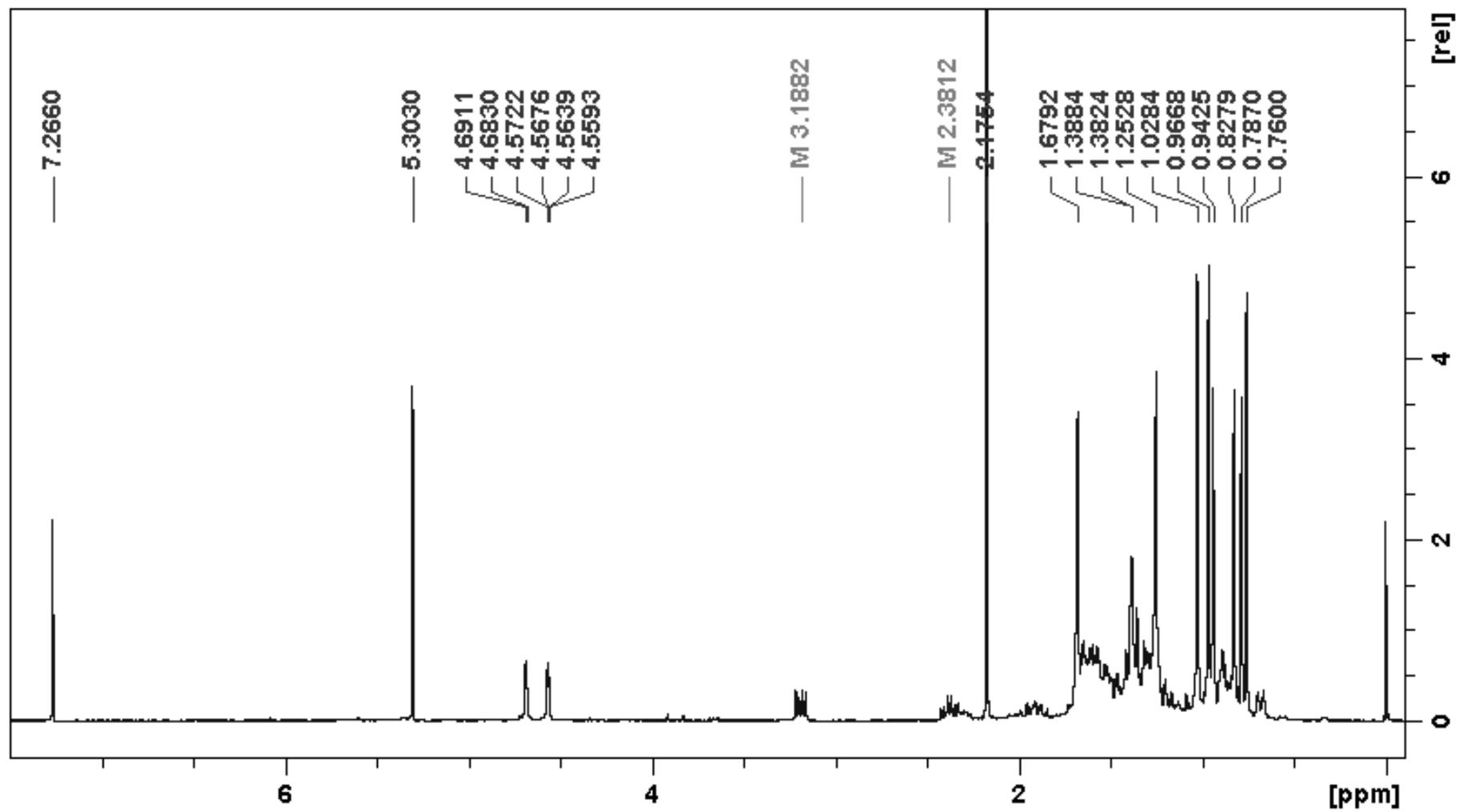


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância lupeol do extrato DDC2F16-17

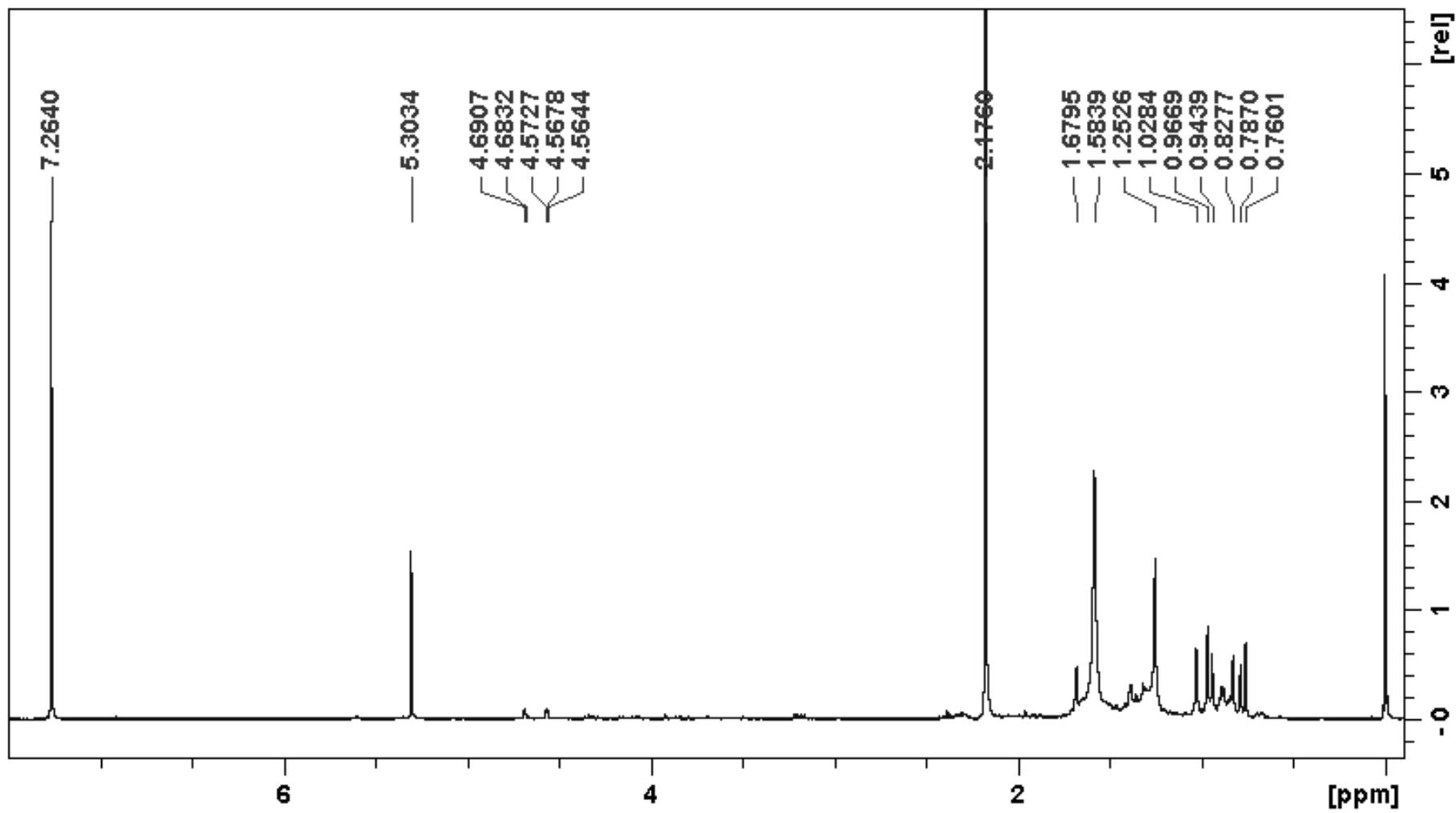


Figura 32. Expansão da região entre δ_H 0 e 3,5 do espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância lupeol do extrato DDC2F11-12.

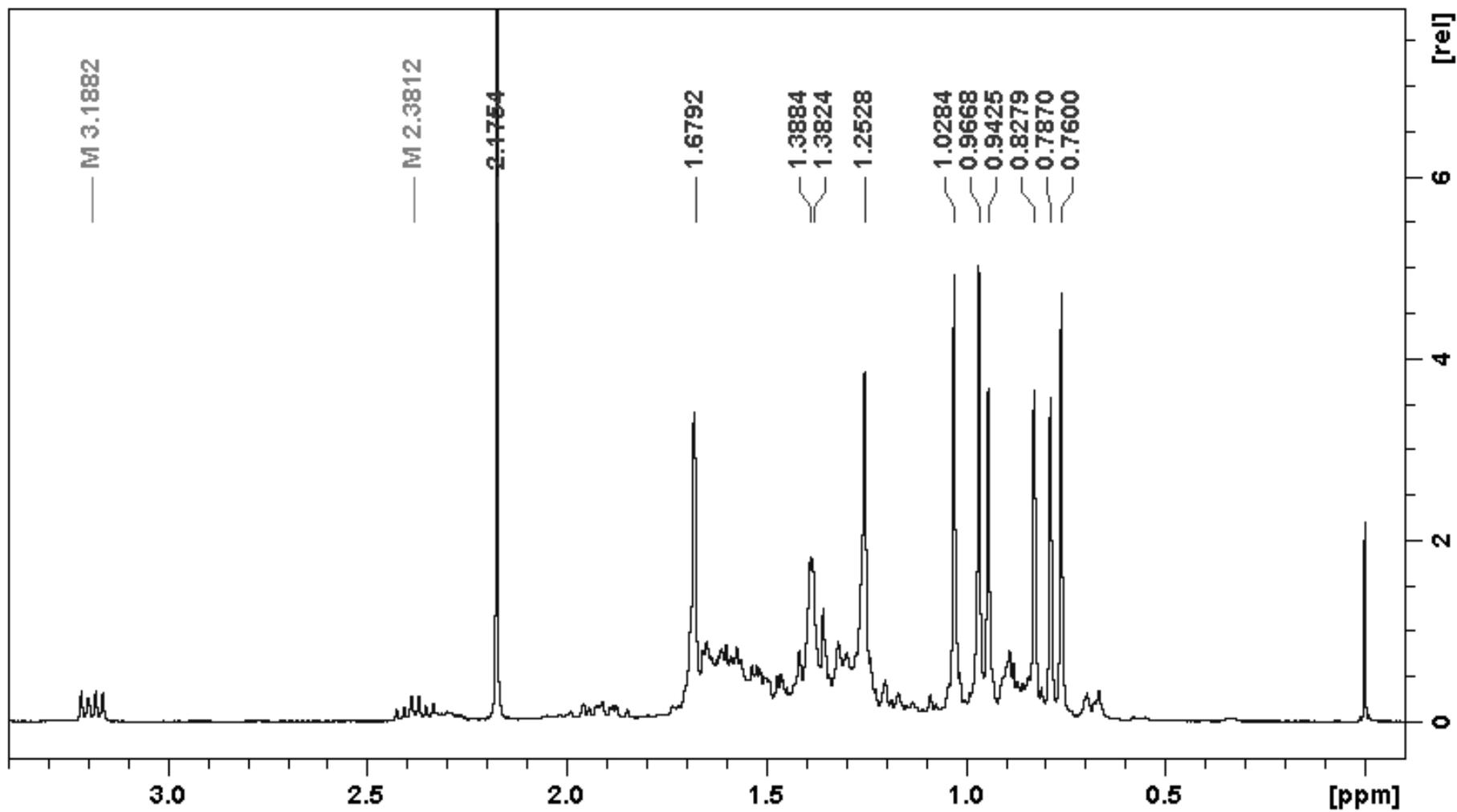


Figura 33. Expansão da região entre δ_H 4,4 e 7,4 do espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância lupeol do extrato DDC2F11 – 12.

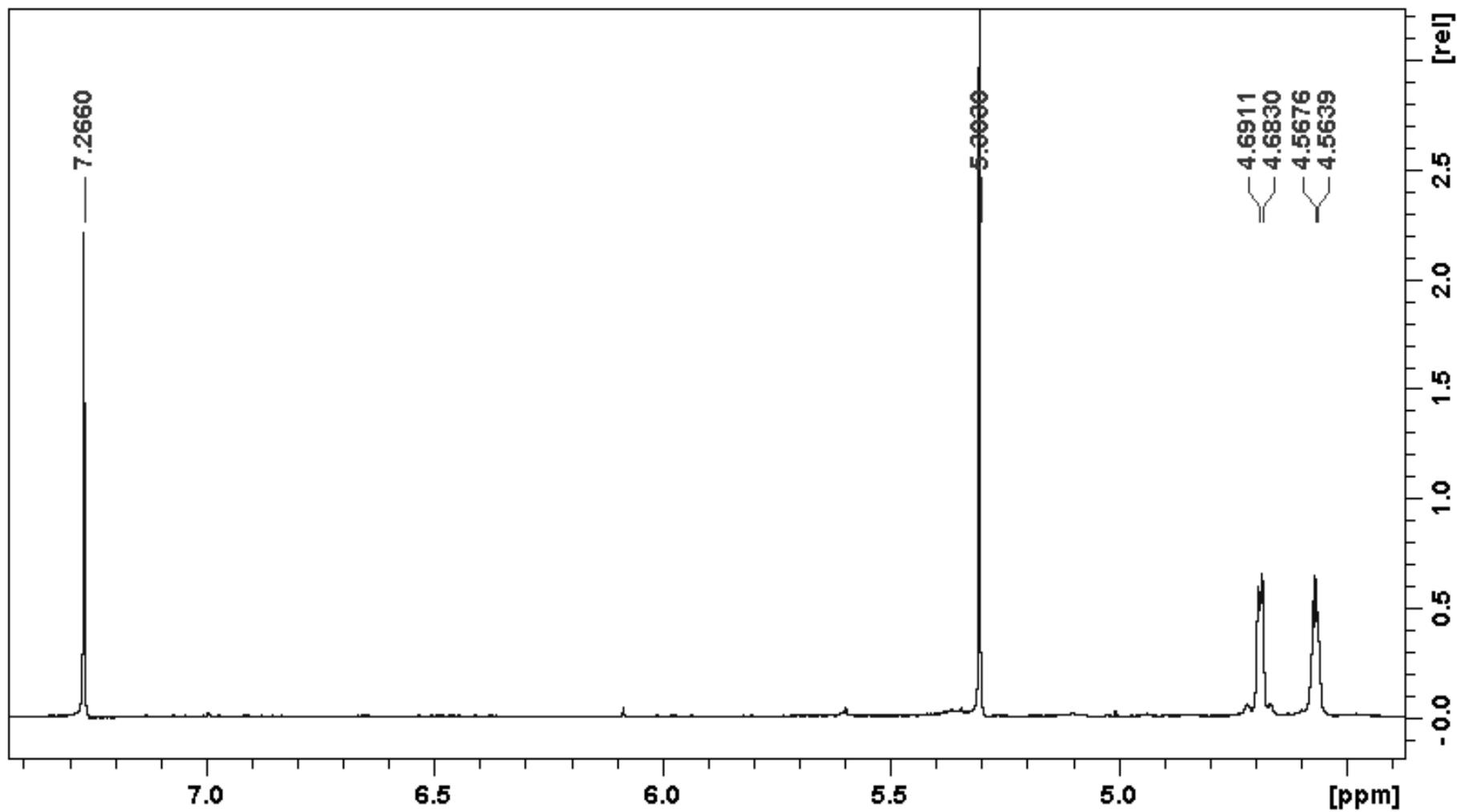


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância lupeol do extrato DDC2F11-12.

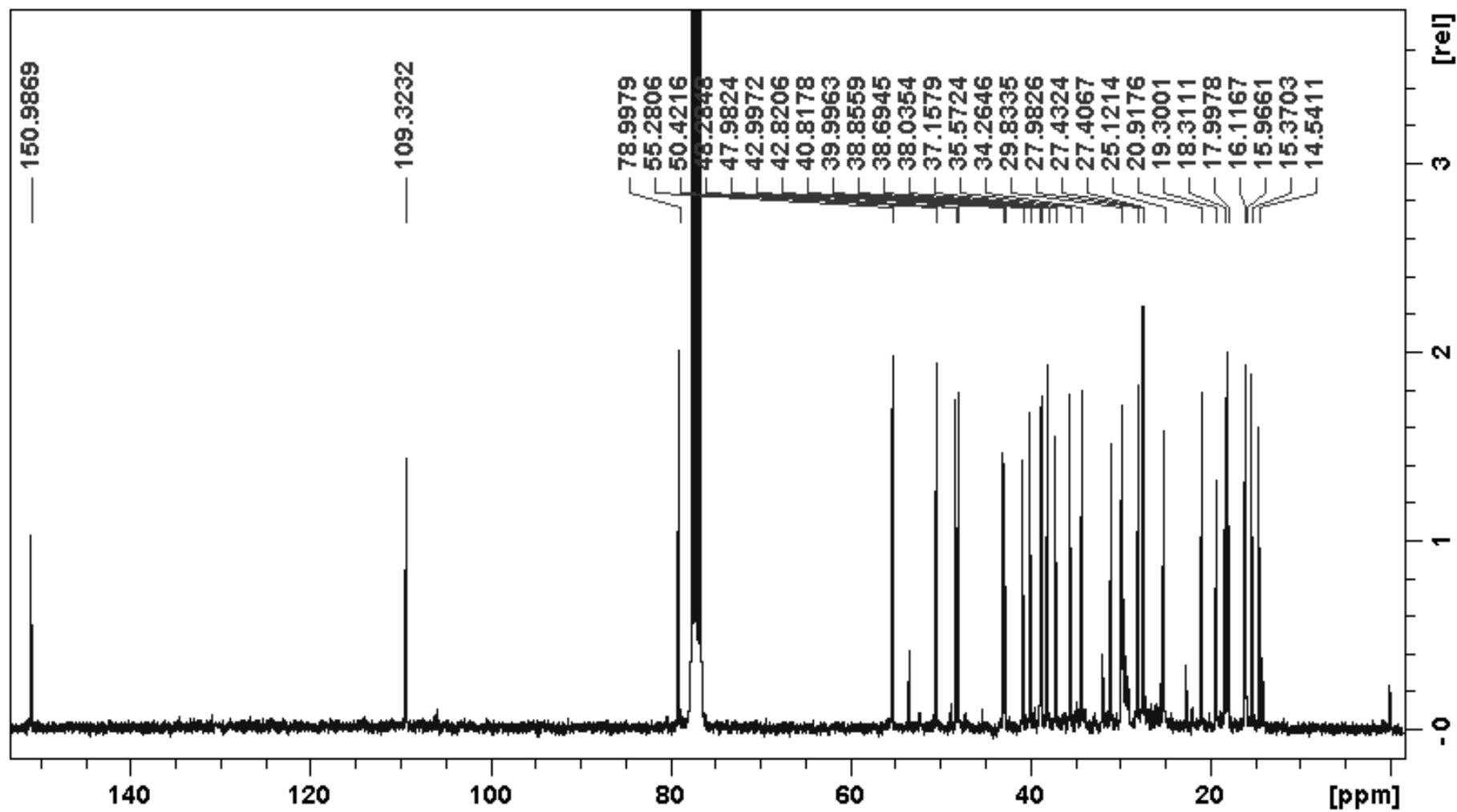
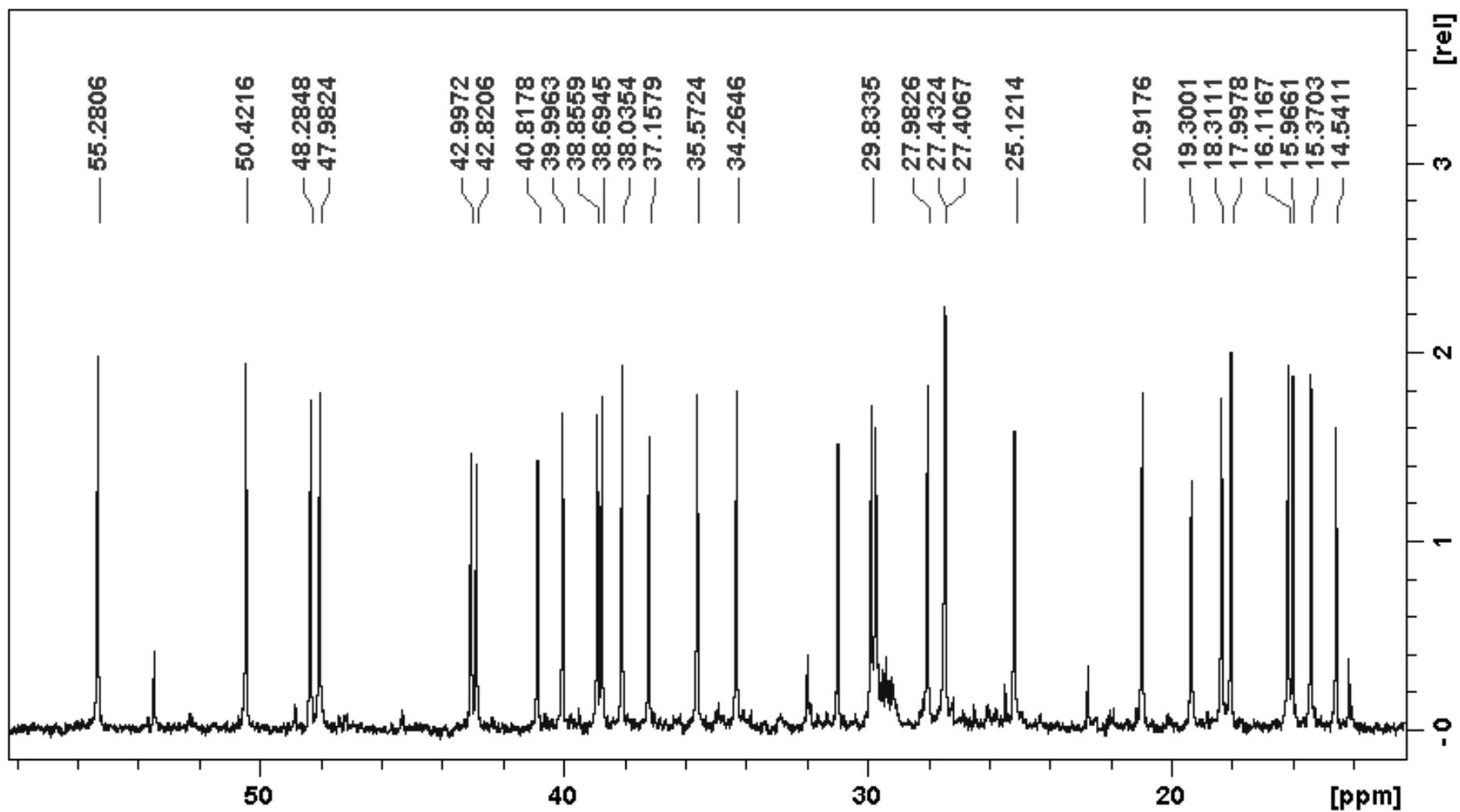


Figura 35. Expansão da região entre δ_C 12 e 58 do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$ suplementado com TMS) da substância lupeol do extrato DDC2F11-12.



O lupeol está muito presente na alimentação humana, em vegetais de consumo cotidiano como soja (*Glycine max*), repolho (*Brassica oleracea*), cenoura (*Daucus carota*), pimenta (*Capsicum annuum*), pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), azeitona (*Olea europa*), figo (*Ficus carica*), manga (*Mangifera indica*), morango (*Fragaria sp.*), uva (*Vitis vinífera*), avelã (*Corylus avellana*), é um triterpenos encontrado em óleos vegetais, cereais e frutas, tem se destacado por seu potencial biológico, principalmente por sua ação anti-câncer, e por isso chamando a atenção da indústria farmacêutica nos últimos anos (GUEVARA *et al.* 1996; SALEEM *et al.*, 2001; SALEEM *et al.*, 2004; SALEEM *et al.*, 2005; PRASAD *et al.*, 2008; LASZCZYK, 2009; SIDDIQUE & SALEEM, 2011; MANNOWETZ, 2017). Estudos revelaram o potencial desta substância sobre o câncer de pele (SALEEM *et al.*, 2001; SALEEM *et al.*, 2004), câncer de próstata (SALEEM *et al.*, 2005), câncer de língua, cabeça e pescoço (LEE *et al.*, 2007).

Além de estar presente nas plantas conhecidamente medicinais como *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Panax ginseng*, *Camellia sinensis*, *Allanblackia monticola*, *Himatanthus succuba*, *Celastrus paniculatus*, *Zanthoxylum riedelianum*, *Leptadenia hastata*, *Crataeva nurvala*, *Bombax ceiba* e *Sebastiania adenófora* (SALEEM *et al.*, 2004; SALEEM 2010; SIDDIQUE & SALEEM 2011).

Segundo dados do PubChem, o lupeol é relatado na bibliografia científica desde a década de 1950, nesta época era considerado o triterpenos pentacíclicos mais abundante, e teve a sua biossíntese completa publicada em 1971 por Gilber Stork e colaboradores (STORK *et al.*, 1971).

Além disso, estudos recentes relatam a efetividade do lupeol como anticoncepcional masculino (MANNOWETZ *et al.*, 2017), isso porque ele age sobre o canal de cálcio do esperma (CatSper), que é responsável pela fertilidade masculina, pois quando ativado se torna responsável pela mobilidade dos espermatozoides. Quando administrado via oral em ratos, reduziu significativamente a mobilidade dos espermatozoides, acredita-se então que os triterpenos lupeol e pristimerina agem como contraceptivos por evitarem essa hipermobilidade.

Os dois triterpenos isolados a partir dos calos de *D. duckeana*, são de grande interesse para a indústria farmacêutica, uma vez que já apresentam resultados frente a uma série de doenças, sendo a primeira vez que é relatada a presença de betulinaldeído em cultura de calos de plantas.

O lupeol, a betulina e o ácido betulínico já foram relatados em culturas *in vitro* de *Jatropha curcas*, sendo que estudos recentes apontam que quando na presença ácido jasmônico como elicitador, as concentrações destes triterpenos aumentam consideravelmente, onde, houve um incremento de 7 vezes o peso seco de betulina, cerca 3 vezes e meia de ácido betulínico e, para o lupeol aumento apresentado foi moderado, pouco menos de 2 vezes (ZARAGOZA-MARTÍNEZ *et al.*, 2016). Estudos como esse mostram a viabilidade na produção de triterpenos em culturas vegetais *in vitro*.

4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E QUÍMICAS DO EXTRATO HEX/ACOET

4.4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Conforme os resultados apresentados na tabela 4 e comparados com os valores da escala, observa-se que a substância testada é inativa para atividade antioxidante pelos dois métodos realizados.

Tabela 4. Resultados da avaliação da capacidade antioxidante da substancia testada obtidos pelas metodologias de DPPH e Fe³⁺/Fenantrolina

Método usando DPPH			Método usando Fe ³⁺		
Valores médios ± Desvios padrões			Valores médios ± Desvios padrões		
$ \Delta\text{ABS}_{517} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equiv. (mg de extrato / mg de ácido ascórbico)	$ \Delta\text{ABS}_{508} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equiv. (mg de extrato / mg de ácido ascórbico)
0,016 ± 0,011	0,130 ± 0,094	56,684 ± 41,531	-0,059 ± 0,009	0,059 ± 0,014	9,33 ± 25,414

4.4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dos dezesseis micro-organismos testados com extratos hex/AcOEt 1:1 de calos de *D. duckeana*, oito apresentaram inibição do seu crescimento quando comparado ao controle positivo. Sendo que para *Aeromonas hydrophila*, *Candida albican*, *Salmonella enteritidis*, o extrato foi ativo até nas menores concentrações (30 µg/mL), enquanto para *Acinetobacter baumannii* e

Enterococcus faecalis, somente a concentração de 1000 µg/mL não inibiu o crescimento dos organismos. Para *Edwardsiella tarda*, concentrações acima de 60 µg/mL se mostraram ativas, *Morganella morganii* a concentração mínima inibitória foi de 125 µg/mL e para *Enterobacter cloacae* 500µg/mL. As porcentagens de inibição do crescimento dos micro-organismos variaram (tabela 10), onde valores negativos indicam que não houve inibição. No entanto quando essa atividade é observada no extrato bruto, é de grande interesse que se purifique e busquem as substâncias responsáveis pela ação sobre os micro-organismos.

Tabela 4. Porcentagem de inibição de crescimento de micro-organismos testados em seis concentrações do extrato Hex:AcOEt 1:1 de calos de *D. duckeana*.

Conc. extrato (µg/mL)	AB (% de inib.)	AB (% de inib.)	CP (% de inib.)	CA (% de inib.)	AH (% de inib.)	CF (% de inib.)	ET (% de inib.)	EnCI (% de inib.)
1000	-68,0*	-40,0	83,0	100,0	-15,9	14,0	-11,7	-6,0
500	41,0	-21,0	49,0	42,1	0,8	18,0	18,0	36,0
250	48,0	-10,0	33,0	26,7	-4,9	18,8	-26,8	33,0
125	48,0	-10,0	43,0	40,0	2,0	18,0	-23,0	46,0
60	41,0	-10,0	16,0	31,2	13,0	17,0	-26,0	42,4
30	39,0	-8,0	0,5	26,3	1,5	2,2	-56,8	47,5

Conc. extrato (µg/mL)	ET (% de inib.)	KP (% de inib.)	MM (% de inib.)	PA (% de inib.)	PF (% de inib.)	SM (% de inib.)	SE (% de inib.)	StAu (% de inib.)
1000	51,8	-35,6	33,7	-10,9	-63,0	-11,3	9,6	-0,6
500	1,7	-1,1	18,8	-62,0	-53,3	-36,8	21,1	-30,9
250	-12,0	-12,5	6,1	-52,8	-25,2	-20,5	10,4	-35,6
125	-44,2	-20,4	13,5	-35,4	-20,0	-19,4	7,5	-21,8
60	-44,3	-32,3	-3,3	-18,4	-11,8	-22,0	5,5	-8,8
30	-39,0	-35,5	-9,4	-9,5	-7,1	-8,0	10,2	-16,2

Legenda: AB (*Acinetobacter baumannii*) AH (*Aeromonas hydrophila*) CA (*Candida albicans*), CP (*Candida parapsilosis*), CF (*Citrobacter freundii*), ET (*Edwardsiella tarda*), EnCI (*Enterobacter cloacae*), EnF (*Enterococcus faecalis*), KP (*Klebsiella pneumoniae*), MM (*Morganella morganii*), PA (*Pseudomonas aeruginosa*), PF (*Pseudomonas fluorescens*), SE (*Salmonella entérica*), SM (*Serratia marcescens*), StAu (*Staphylococcus aureus*).; * Valores negativos indicam crescimento das culturas.

Em estudo com sementes de *Caesalpinia bonducella*, o lupeol apresentou maior potencial de inibição do crescimento de micro-organismos, quando comparado a outros triterpenos, no entanto o valor de inibição de crescimento das substâncias não se assemelhavam ao extrato bruto da planta (SAEEDetal., 2001). Estudos com ácido betulínico e ácido ursólico, dois

triterpenos pentacíclicos, mostraram atividade antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (CHANDRAMU *et al.*, 2003).

Para avaliar os efeitos moleculares de triterpenos pentacíclicos sobre *Staphylococcus aureus* resistente à metaciclina utilizaram-se ferramentas moleculares para avaliar a ação específica das substâncias testadas, sendo que o betulinaldeído inibiu os genes relacionados à síntese de proteínas essenciais em *S. aureus*, e outros mecanismos moleculares essenciais para a sobrevivência do patógeno (CHUNG *et al.*, 2013; CHUNG *et al.*, 2014). No entanto os autores ainda relatam a alta concentração desta substância para a ação antimicrobiana (CIM: 512 µg/mL) (CHUNG *et al.*, 2011). Os autores ainda sugerem que o betulinaldeído não tenha boa permeabilidade na membrana plasmática destes organismos.

O extrato bruto dos calos de *D. duckeana* possui uma mistura de metabólitos secundários e não inibiu o crescimento de *S. aureus*. No entanto, as substâncias devem ser avaliadas de forma isolada, pois o extrato bruto contém outras substâncias, o que podem interferir nos resultados.

O potencial biológico das substâncias isoladas, aliada à sua baixa toxicidade, observado em revisão bibliográfica, aliado aos resultados obtidos estimula novos estudos com a cultura de calos *in vitro* desta espécie.

5. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto os resultados obtidos no presente estudo permitiram obter as seguintes conclusões sobre o sistema de produção de calos *in vitro* para a obtenção de triterpenos.

- Foi possível estabelecer um protocolo eficiente para obtenção de culturas assépticas de calos de *D. duckeana* com as combinações de agentes desinfestantes etanol 70% por 3 minutos, seguido de imersão em NaClO 2,5% por 10 minutos, com imersão prévia em solução fungicida Mancozeb 1% por 17 horas. Para a calogênese foi necessário a combinação de duas citocininas e uma auxina (3 mg.L⁻¹ BAP + 2 mg.L⁻¹ ANA + 2 Kin) resultando em 75% de indução de calos;
- O extrato hexano/AcOEt 1:1 de calos não apresentou potencial antioxidante para a técnica de redução do radical livre DPPH e para o teste frente ao complexo Fe³⁺/Fenantrolina;
- O extrato hexano/AcOEt 1:1 este apresentou potencial antimicrobiano frente 8 micro-organismos testados: *Aeromonas hydrophila*, *Candida albican*, *Salmonella enteritidis*, *Acinetobacter baumannii*, *Entococcus faecalis*, *Edwardsiella tarda*, *Morganella morganii* e *Enterobacter cloacae*.
- A comparação por CCDC e RMN de ¹H dos extratos hexano/acetato de etila 1:1 de calos de diversos repiques permitiu observar que não há diferença no perfil fitoquímico dos calos ao longo dos repiques;
- O fracionamento do extrato hexano/acetato de etila 1:1 permitiu isolar dois triterpenos: o 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) e o lupeol.

6. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, V.; SARDAR, P.R.: *In vitro* organogenesis and histomorphological investigations in senna (*Cassia angustifolia*) - a medicinally valuable shrub. - *Physiol. mol. Biol. Plants*9: 131-40. 2003
- AGRAWAL,V.; SARDAR, P.R. *In vitro* propagation of *Cassia angustifolia* through leaflet and cotyledon derived calli. *Biol Plant* 50:118–122. 2006
- AHARONI, A.;GIRI, A.P.;DEUERLEIN, S.;GRIEPINK, F.;DE KOGEL, W.-J.;VERSTAPPEN, F.W.A.;VERHOEVEN, H.A.;JONGSMA, M.A.;SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H.J. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell*. 15: 2866–84. 2003
- AIKAWA, J.; ISHII, T.; KURAMOTO, M.; KADOYA, K. Growth stimulants for vesicular-AMF in Satsuma mandarin pomace. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 69: 385-9, 2000.
- 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.
- ANDRADE, S.R.M.de; PINTO, A.C.Q.; FALEIRO, F.G.; CORDEIRO, M.C.R.; RAMOS, V.H.V.; TEIXEIRA, J.B. Desenvolvimento e avaliação de protocolos para descontaminação de explantes de mangueira visando à micropropagação. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 153**. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados, 1 ed., 2005.
- BHARATHI, P.; PHILOMINA, D. Effect of nutritional factors and precursors on the formation of colchicine in *Gloriosa superba* *in vitro*. **Res Biotechnol** 1:29–37. 2010
- BRAZ-FILHO, R.B.; GOTTLIEB, O.R.; MOURÃO, A.P.; DA ROCHA, A.I.; OLIVEIRA, F. S. Flavonoids from *Derris* species. **Phytochemistry**, 14: 1454-6. 1975
- BUCHANAN, B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2000
- BUSTAMANTE, K. G. L; LIMA, A. D. F; SOARES, M. L.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; BARA, M. T. F.; PIMENTA, F. C.; PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. **Rev. Bras. Pl. Med.**, 12 (3): 341-5, 2010
- CARRION, L.L.; RAMOS, D. F.; MARTINS, D.; OSÓRIO, M.I.C.; CURSINO, L.C.; MESQUITA, D.W.O.; NUNEZ, C.V.; SILVA, P.E.A. Antimycobacterial activity of Brazilian Amazon plants extracts. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, p. 479-485, 2013.
- CARVALHO, C.C.C.R. de; FONSECA, M.M.R. da. Biotransformation of terpenes **Biotechnology Advances**, 24 :134-42, 2006
- CENKCI, S.; KARGIOGLU, M.; KONUK, M. *In vitro* propagation of an endangered plant species, *Thermopsis turcica* (Fabaceae). **Biologia**. Versità 63/5: 652- 7, 2008
- CHANDRAMU, C.; MANOHAR, R.D.; KRUPADANAM, D.G.; DASHAVANTHA, R.V. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. **Phytother Res**.17:129–34. 2003

- CHUNG, P. Y. ; CHUNG, L. Y; NAVARATNAM, P. Identification, by gene expression profiling analysis, of novel gene targets in *Staphylococcus aureus* treated with betulinaldehyde. **Research in Microbiology** 164:319-26. 2013
- CHUNG, P. Y.; CHUNG, L. Y; NAVARATNAM, P. Potential targets by pentacyclic triterpenoids from *Callicarpa farinosa* against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**. 94:48-54. 2014
- CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 10:25. 2011
- CIOĆ, M.; SZEWCZYK, A.; ŻUPNIK, M.; KALISZ, A.; PAWŁOWSKA, B. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. Springer2017
- CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids **Nat. Prod. Rep**.19: 494–513. 2002
- 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, p.1253–1260. 2012.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products: secondary metabolites *In*: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, R.; JONES, J. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 1250-318. American Society of Plant Physiologists. 2000
- CURSINO, L.M.C., **Estudo Fitoquímico e Bioatividade de *Diploptropis purpurea* e *Deguelia duckeana***. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Amazonas (UFAM). 208 p. 2015.
- CURSINO, L.M.C.; LIMA, N.M.; MURILLO, R.; NUNEZ, C.V.; MERFORT, I.; HUMAR, M. Isolation of Flavonoids from *Deguelia duckeana* and Their Effect on Cellular Viability, AMPK, eEF2, eIF2 and eIF4E. **Molecules**, v. 21(2), p. 192. 2016.
- 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.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. 2. ed. West Sussex: Wiley. 507p. 2002
- 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.
- DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. **Biotechnol Adv** 13: 425–35. 1995

- DINIZ, M.F.; FERREIRA, L.T. Bancos genéticos de plantas, animais e microrganismos. *Biociência* **Ciência e Desenvolvimento**. 13:34-38, 2000.
- DORR, C. R. YEMETS, S.; KOLOMITSYNA, O. KRASUTSKY, P.; MANSKY, M. Triterpene derivatives that inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21: 542–5. 2011
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives *Crit. Rev. Plant Sci.*, 25:417-40, 2006
- EL-SAYED, M.A.; VERPOORTE. R. Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension culture fed with the alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 68:265–270. 2002
- ERS, Entidade Reguladora da Saúde. Portugal. Disponível em <<https://www.ers.pt/pages/33>>. 2012
- ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C; MARCHESAN, M. A.; PÉCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.*;13(2):113-7. 2002
- FACCHINI, P.J.; DE LUCA, V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: Model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J.* 54: 763–84. 2008
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Yearbook of the Food And Agricultural Organization. Disponível em <www.fao.org/faostat>. 2013
- FIGUEIREDO, S. F. L.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Rollinia mucosa cell suspension cultures: Establishment and growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 63: 85 – 92. 2000.
- FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <www.floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 30 de janeiro de 2018.
- FRAC. Monograph No. 1 (second, revised edition) Fungicide Resistance Action Committee. ISBN 90-72398-07-6 Dépot Légal: D/1995/2537/1 Disponível em <<http://www.frac.info>>. 2007
- FRENSE, D. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1233 - 40. 2007
- GEETHA, T., VARALAXMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. *Fitoterapia* 69: 13–19, 1998
- GEORGIEV, M. I.; EIBL, R.; ZHONG, J. Hosting the plant cells *in vitro*: recent trends in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3787–3800, 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
- GUEVARA, A. P.; AMOR, E.; RUSSELL, G. Antimutagens from *Plumeria acuminata* Ait. *Mutat. Res.*, 361: 67–72. 1996
- 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

- HANSON, J. **The Chemistry of Fungi**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 221p. 2008
- HEATH, K. D.; TIFFIN, P. - Stabilizing mechanisms in a legume–rhizobium mutualism. **Evolution**, 63: 652-62. 2009
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCAR, (Série de textos da Escola de verão em química, vol.. IV). 152 p. 2003.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. N.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, 86(4): 927-939. 2006
- HUSSAIN, M. S.; FAREED, S.; ANSARI, S.; RAHMAN M. A.; AHMAD, I. Z.; SAEED, M. Current approaches toward the production of plant secondary metabolites. **J Pharm BioAllied Sci** 4:10–20. 2012
- ISAH, T. Anti-cancer alkaloids from trees: development into drugs. **Pharmacogn Rev**. 2016
- ISAH, T.; UMAR, S.; MUJIB, A. SHARMA, M. P.; RAJASEKHARAN, P.E. ZAFAR, N., FRUKH. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 2017
- JACOB, C.; CARRASCO, B.; SCHWEMBER, A. R. Advances in breeding and biotechnology of legume crops, **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 2016
- JAZIRI, M.; ZHIRI, A.; GUO, Y-W.; DUPONT, J-P.; SHIMOMURA, K.; HAMADA, H.; VANHAELEN, M.; HOMES, J. *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. 46: 59–75. 1996
- JOHRI, M. M.; MITRA D. Action of plant hormones. **Current Science**, vol. 80, n. 2: 199 – 205. 2001.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2ª Ed. Guanabara Koogan. 2012
- KIONG, A. L.; MAHMOOD, M.; FODZILLAN, N.M.; DAUD, S.K. Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus culture. **Pak J Biol Sci** 8:1160–1169. 2005
- 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 p.1373–1382. 2012.
- KOLEWE, M. Development of plant cell culture processes to produce natural product pharmaceuticals: characterization, analysis, and modeling of plant cell aggregation. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Graduate School, University of Massachusetts Amherst, 140 p. 2011
- LANGE, D., **Europe's Medicinal and Aromatic Plants: Their Use, Trade and Conservation**, Cambridge: UK: TRAFFIC International. 77p. 1998.
- LASZCZYK, A. M.N. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. **Planta Med**. 75: 1549–60. 2009
- LEE, T. K.; POON, R. T. P.; WO, J. Y.; MA, S.; GUAN, X-Y.; MYERS, J. N.; ALTEVOGT, P.; YUEN, A. P. W. Lupeol Suppresses Cisplatin-Induced Nuclear Factor-KB Activation in Head and Neck Squamous Cell

- Carcinoma and Inhibits Local Invasion and Nodal Metastasis in an Orthotopic Nude Mouse Model. **Cancer Res.** 67: (18). 8800-9. 2007
- KAREN T. LIBY, K. T.; YORE, M. M.; SPORN, M. B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer.* 357-69. 2007
- LIMA, N. M.; ANDRADE, J. I.A.; LIMA, K.C.S.; SANTOS, F. N.; SALOMÉ, A. B. K. S; MATSUURA, T.; NUNEZ, C. V. Chemical profile and biological activities of *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo (Fabaceae). **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, 2012
- LIU, C.; LIAO, S-X; LIU, S-J; JI, L-J, SUN, H-F. Two New 2,3-Seco-Hopane Triterpene Derivatives from *Megacodon stylophorus* and Their Antiproliferative and Antimicrobial Activities. **Planta Medica**, 11(80):936-941. 2014
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.
- LOMBARDO, M.; KIYOTA, S.; KANEKO, T.M.; Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2009.
- MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; MORAES, V. R. D.; Prenylated flavonoids from *Degueliahatschbachii* and their systematic significance in *Deguelia*. **Phytochemistry** 57, 77. 2001
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A compilation and some salient features”. **Phytochemistry**, 37(6): 1517-1575. 1994
- MANNOWETZA, N.; MILLERA, M.R.; LISHKOA, P. V. Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. **PNAS Early Edition**. 2017
- MARTINS, D.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; OLIVEIRA, T. A.; LIMA, K. S. C.; 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): 158-71. 2014
- MCGRATH, M.T. What are Fungicides? **The Plant Health Instructor**. 2004
- MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Soybean response to starter nitrogen and Bradyrhizobium inoculation on a Cerrado Oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 27:81-7, 2003
- MIRANDA, M. L. D.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Triterpenes and Other Constituents from Fruits of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae) **Rev. Virtual Quim.** 7 (6): 2597-2605. 2015
- MONACO, P.; PREVITERA, L. Isoprenoids from the leaves of *Quercus suber*. **J. Nat. Prod.**, 47, p.673-6. 1984.
- MORAES, V. R. S. **Estudo fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo, Isolamento, Determinação estrutural, Análise por CLAE e Testes biológicos.** Tese (Doutorado em Ciências), UNICAMP, Brasil, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 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.
- MUSEU-GOELDI. Museu Paraense Emílio Goeldi, Disponível em: <www.museu-goeldi.br>. Acesso em: 30 de janeiro de 2018.
- NAGEGOWDA, D.A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Lett**, 16:2965-73, 2010.
- 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.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.** 79 (3):629–61. 2016
- 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.
- PAGAN, J. D., CHILD, J. J., SCOWCROFT, W. R., GIBSON A. H. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. **Nature**. 256:406–7. 1975
- PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. ;SAEMA, S. *In vitro* plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance. **Agroforest Syst.** 80(10): 109-16. 2010
- PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**. 1: 7-12, 2003
- PAZ, T. A.; DOS SANTOS, V. A. F. F. M.; INÁCIO, M. C.; DIAS, N. B.; PALMA, M. S. Proteome profiling reveals insights into secondary metabolism in *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) cell cultures producing quinonemethide triterpenes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 130 (2): 405-16. 2017
- PEIX, A.; RAMIREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial association with legumes. **Crit. Rev. Plant. Sci.** 34:1-3. 2015
- PELCZAR, M. J.; REID R. D.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: Makron, 1980.
- PEREIRA, A. G; BOLIANI, C. A; CORREA, S. L., Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘Thap maeo’ (sub grupo AAB) submetidos a concentrações de cloro ativo. **Comunicata Scientiae** 6(4): 412-417, 2015.
- PERRET, X.; STAHELIN, C.; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiol Mol Biol Rev** 64:180–201. 2000.

- PHILLIPS, D. R.; RASBERY, J. M.; BARTEL, B.; MATSUDA, S. P. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. **Curr Opin Plant Biol.**9:305–14. 2006
- PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A.; **Micropropagação e Metabólitos Secundários *in vitro* de Plantas Medicinais.**Lavras: UFLA/FAEPE, 102 p. 2001.
- PRASAD, S.; KALRA, N.; SINGH, M.; SHUKLA, Y. Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. **Asian J Androl.** 10 (2): 313–8. 2008
- PubChem.**Lupeol.** National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=259846, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/259846> (acesso em 4 de março, 2018).
- PubChem. **Betulinaldehyde.** National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=99615, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/99615> (acesso em 4 de março, 2018).
- PULIDO, P.; PERELLO, C.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. New Insights into plant isoprenoid metabolism. **Mol. Plant.** 5:964-7. 2012
- QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S; LIMA, J.T.; NUNES, X.P.; SIQUEIRA, J.S.; OLIVEIRA, L.E.G.; ALMEIDA, R.N.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with anticonvulsant properties - a review. **Rev Bras Farmacognv.**18 (Supl.): 798-819. 2008.
- RAMCHANDER; JALWAL, P.; MIDDHA, A. Recent advances on ajowan and its essential constituents. **Journal of Medicinal Plants Studies** 5(3): 16-22. 2017
- RIOS, M. Y.; SALINAS, D.; VILLARREAL, M. L. Cytotoxic Activity of Moronic Acid and Identification of the New Triterpene 3,4-seco-Olean-18-ene-3,28-dioic Acid from *Phoradendron reichenbachianum*. *Planta Med* 67:443-6. 2001
- 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.
- ROBERTS, S.C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature chemical biology.** 3(7): 37-95. 2007
- ROMERO, A.G.F.; SIQUEIRA, J.O. Activity of flavonoids on spores of the mycorrhizal fungus *Gigasporagiganteanin vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37: 517-522, 1996.
- ROY, J.; BANERJEE, N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tips explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f. **Scientia Horticulturae**, vol. 97: 333 – 340. 2003.
- SACCARO JUNIOR, Nilo L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil.** Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011
- SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Fitoterapia.** 72: 807-9. 2001
- SAIMAN, M. Z.; MUSTAFA, N. R.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; SCHULTE, A. E. Metabolic alterations and distribution of five-carbon precursors in

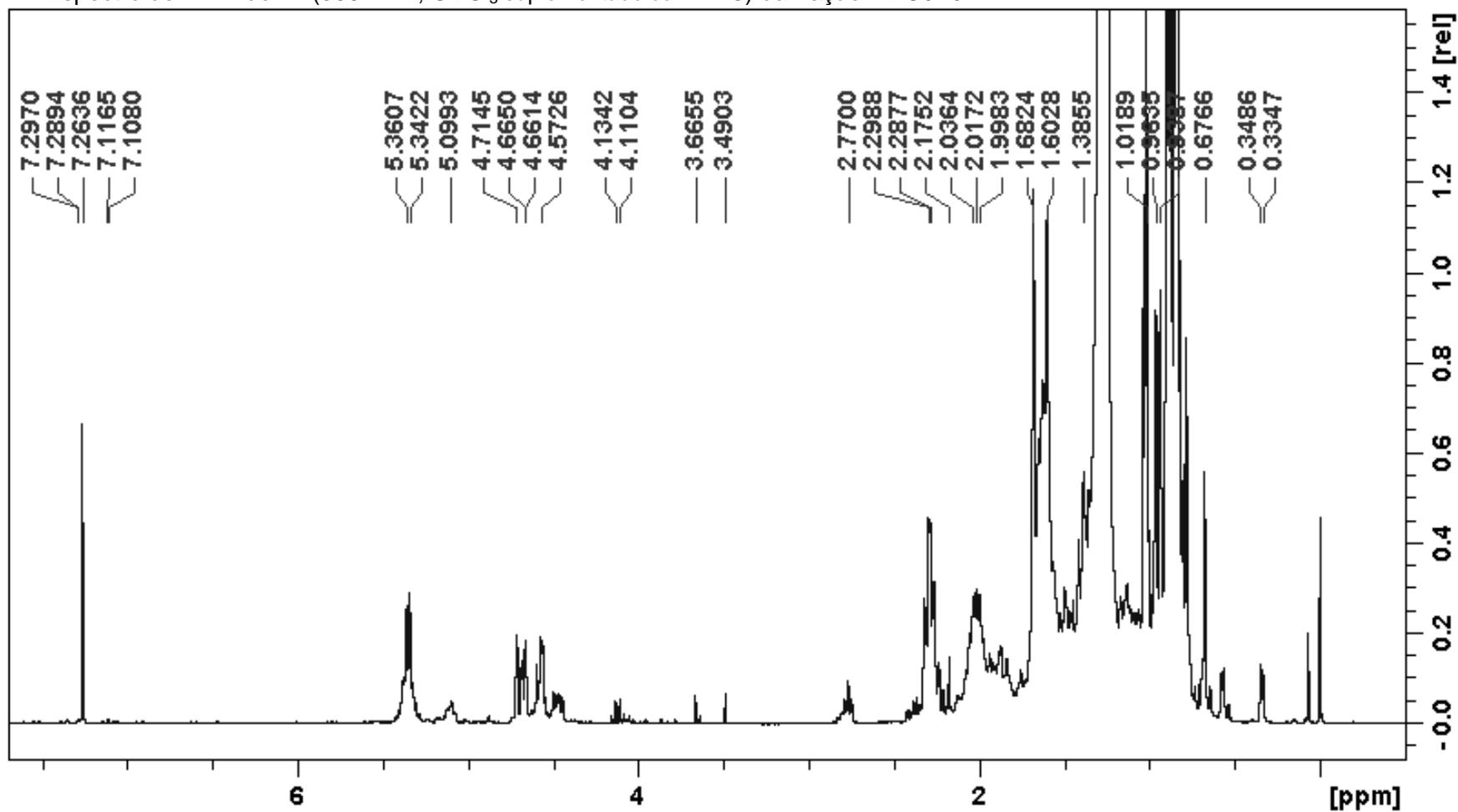
- jasmonic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 122:351–362. 2015
- SALEEM, M.; ALAM, A.; ARIFIN, S.; SHAH, M. S.; AHMED, B.; SULTANA, S. Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. **Pharmacological Research.** 43 (2): 127-34. 2001
- SALEEM, M.; AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene.** 23: 5203–14. 2004
- SALEEM, M.; KWEON, M-H.; YUN, J-M.; ADHAMI, V. M.; KHAN, N.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. A Novel Dietary Triterpene Lupeol Induces Fas-Mediated Apoptotic Death of Androgen-Sensitive Prostate Cancer Cells and Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Model. *Cancer Res*; 65: (23).11203-13. 2005
- SALVAGIOTTI, F.; CASSMAN, K. G.; SPECHT, J. E.; WALTERS, D. T.; WEISS, A.; DOBERMANN, A. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research.** 108: 1-13. 2008
- SIDDIQUE, H. R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. **Life Sciences.** 88: 285–293. 2011
- SILVA, M. F., LISBÔA, P. L. B., LISBÔA, R. C. L. Nomes vulgares de Plantas Amazônicas. *INPA*, Manaus. 222 p. 1977.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed, Porto alegre/ Florianópolis: editora UFRGS/UFSC, 2010.
- SMITH, R. H. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments.* 3. ed. USA: Elsevier, 2013.
- SOARES, A. C. F.; MARTINS, M. A.; MATHIAS, L.; FREITAS, M. S. M. Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedlings. **Scientia agrícola.** Piracicaba, SP. vol.62 no.4. 2005.
- SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L.R. **Tecnologia de Aplicação de Fungicidas.** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho. 2014. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/fungici.html>> . Acesso em 19 de março de 2015.
- SOUZA, L. A. G., **Guia da biodiversidade de fabaceae do Alto Rio.** Manaus : 118 p. 2012.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III.** 3rd ed. Nova Odessa, SP. 2005.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.;STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew.**Science.** 260(5105):214-6.1993
- STORK, G.; UYEO, S.; WAKAMATSU, T.; GRIECO, P.; LABOVITZ, J. Total synthesis of lupeol. **J. Am. Chem. Soc.** 93(19) 4945–7. 1971
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 5ª Ed., Artmed, Porto Alegre, 2013.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais.** Editora da UFRGS, Porto Alegre. 182p. 2005.

- THORPE, T. A. History of Plant Tissue Culture In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. **Plant Cell Culture Protocols**, 2^o Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2006
- TOZZI, A. M. G. A. Estudos taxonômicos dos gêneros *Lonchocarpus Kunth* e *Deguelia Aubl no Brasil*. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 341 p. 1989
- TOZZI, A. M. G. A. A identidade do Timbó-verdadeiro: *Deguelia utilis* (A.C.Sm.) A.M.G.Azevedo (Leguminosae -- Papilionoideae). **Rev. Bras. Biol.**, São Carlos, v. 58, n. 3, p. 511-516, Aug. 1998
- TREJO-TAPIA, G.; RODRÍGUEZ-MONROY, M. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. **Interciencia**, 32 (10): 669-674. 2007
- VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; TEN HOOPEN, H. J. G. ; MEMELINK, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnol. Lett.** 21: 467–479. 1999
- VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A.W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 2000
- VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochem Rev.** 1:13–25. 2002
- VRANOVA, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. **Mol. Plant.**, 5: 318-33. 2012
- WANG, Z.; YEATS, T.; HAN, H.; JETTER, R. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoedaigremontiana*. **The Journal of Biological Chemistry**, 285 (39): 29703-12, 2010
- WANG, X.; HABIB, E.; LEÓN, F.; RADWAN, M. M.; TABANCA, N.; GAO, J.; WEDGE. D.; CUTLER, S. Antifungal Metabolites from the Roots of *Diospyros virginiana* by Overpressure Layer Chromatography. **Chemistry & Biodiversity**. 8: 2331-40. 2011
- WESTON, L. A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 2, p. 283-297. 2013
- WU, X.; FU, Q. GAN, J. Metabolism of pharmaceutical and personal care products by carrot cell cultures, **Environmental Pollution** n.211, 141-7,2016
- XIE, M-X. Flavonoids. **Current Organic Chemistry**. 15 (15): 2540. 2011
- XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry** 65: 261–291. 2004
- YUE, W.; MING, Q. L.; LIN, B.; RAHMAN, K.; ZHENG, C-J.; HAN, T.; QIN, L. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications & high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. **Critical Rev Biotechnol** 36(2):215–232. 2016
- ZARAGOZA-MARTÍNEZ, F.; LUCHO-CONSTANTINO, G.G.; PONCE-NOYOLA, T.; ESPARZA-GARCÍA, F.; POGGI-VARALDO, H.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M.; TREJO-TAPIA, G.; RAMOS-VALDIVIA, A. C. Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 127: 47. 2016

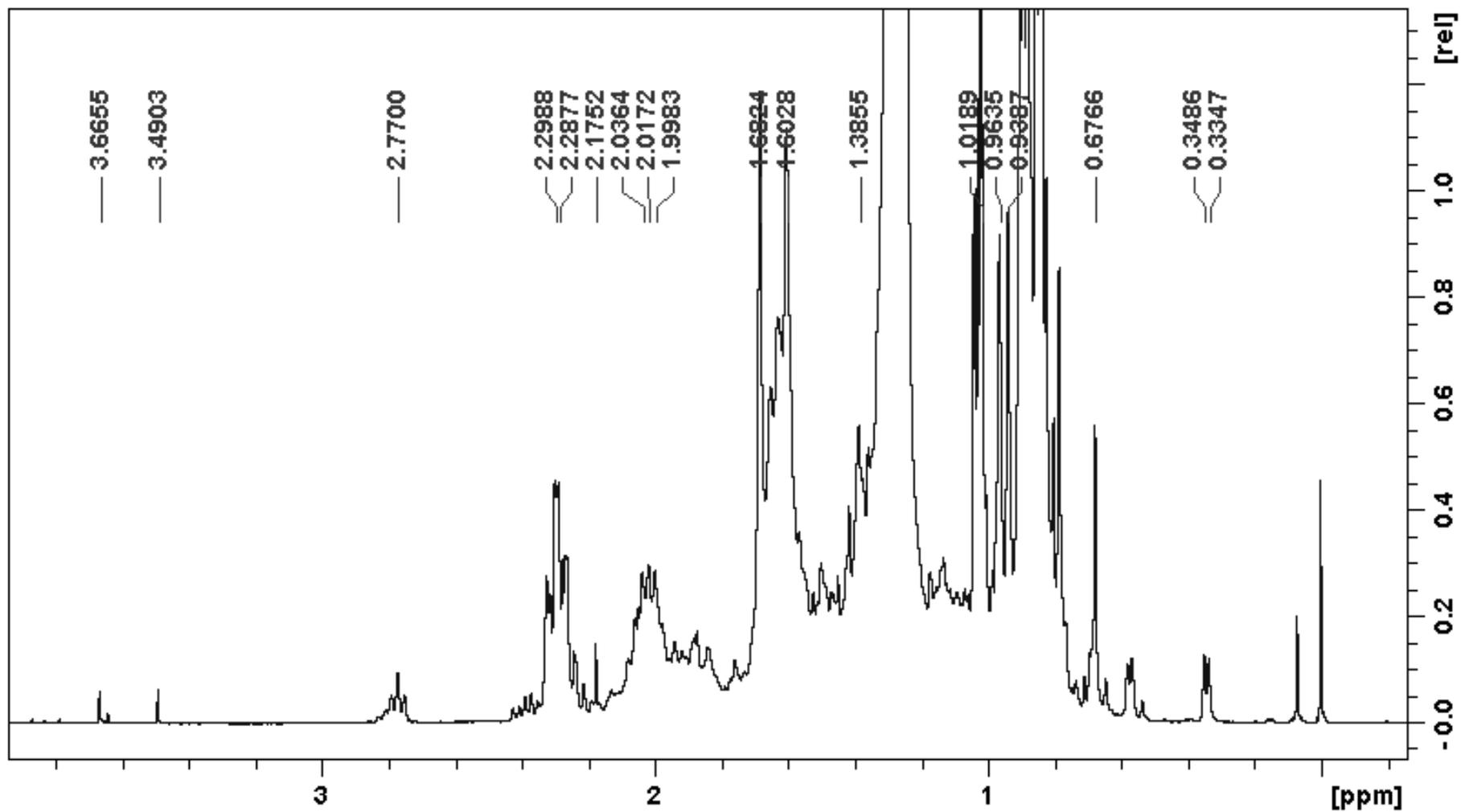
- ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnol Adv.** 23:283–333. 2005
- ZIEGLER, H.L.; FRANZYK, H.; SAIRAFIANPOUR, M.; TABATABAI, M.; TEHRANI, M. D.; BAGHERZADEH, K.; HÄGERSTRAND, H; STÆRKA, D.; JAROSZEWSKI, J. W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of Plasmodium falciparum growth: structure–activity relationships for betulinic acid analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 12: 119–127. 2004

7. ANEXOS

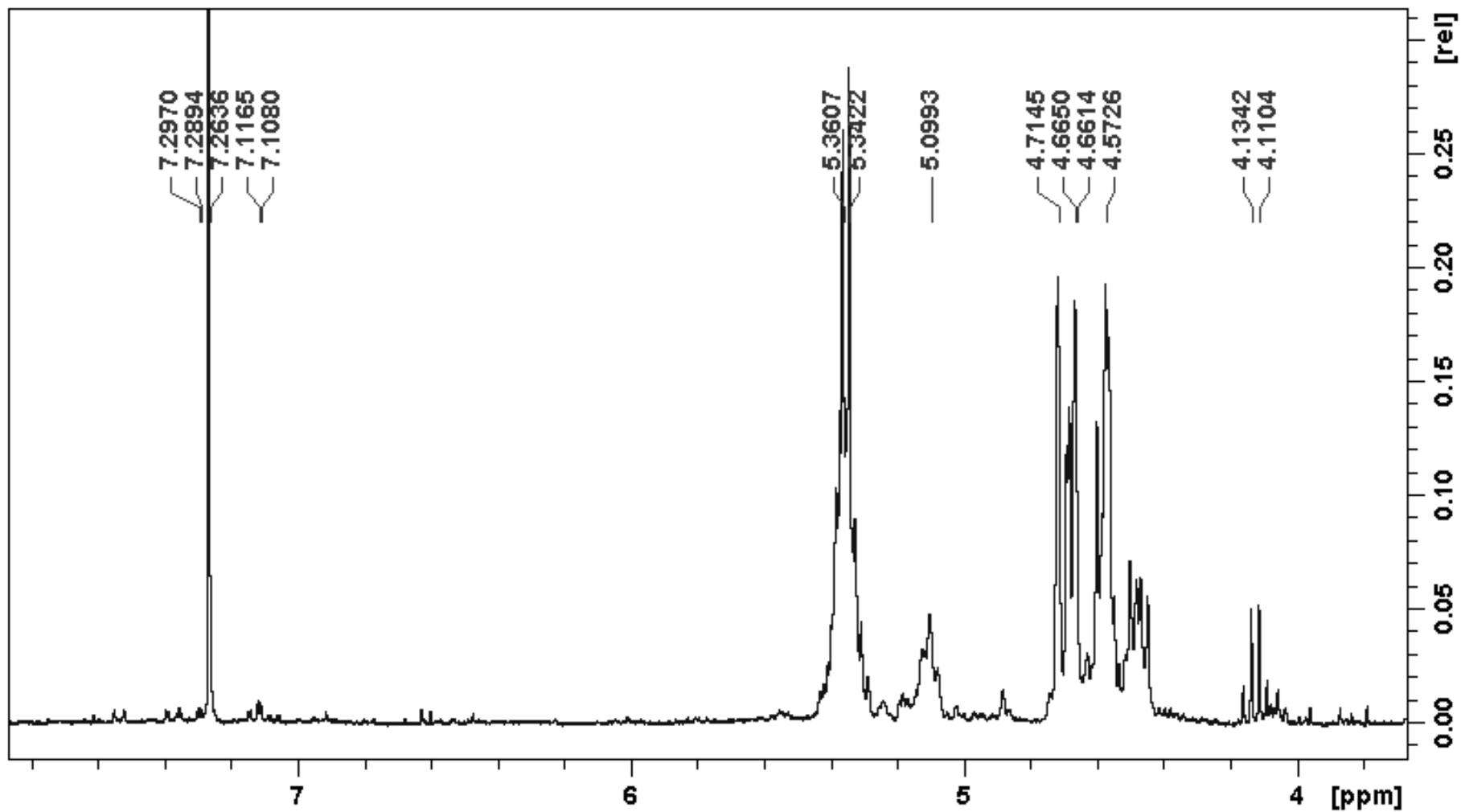
7.1 Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da fração DDC0F0.



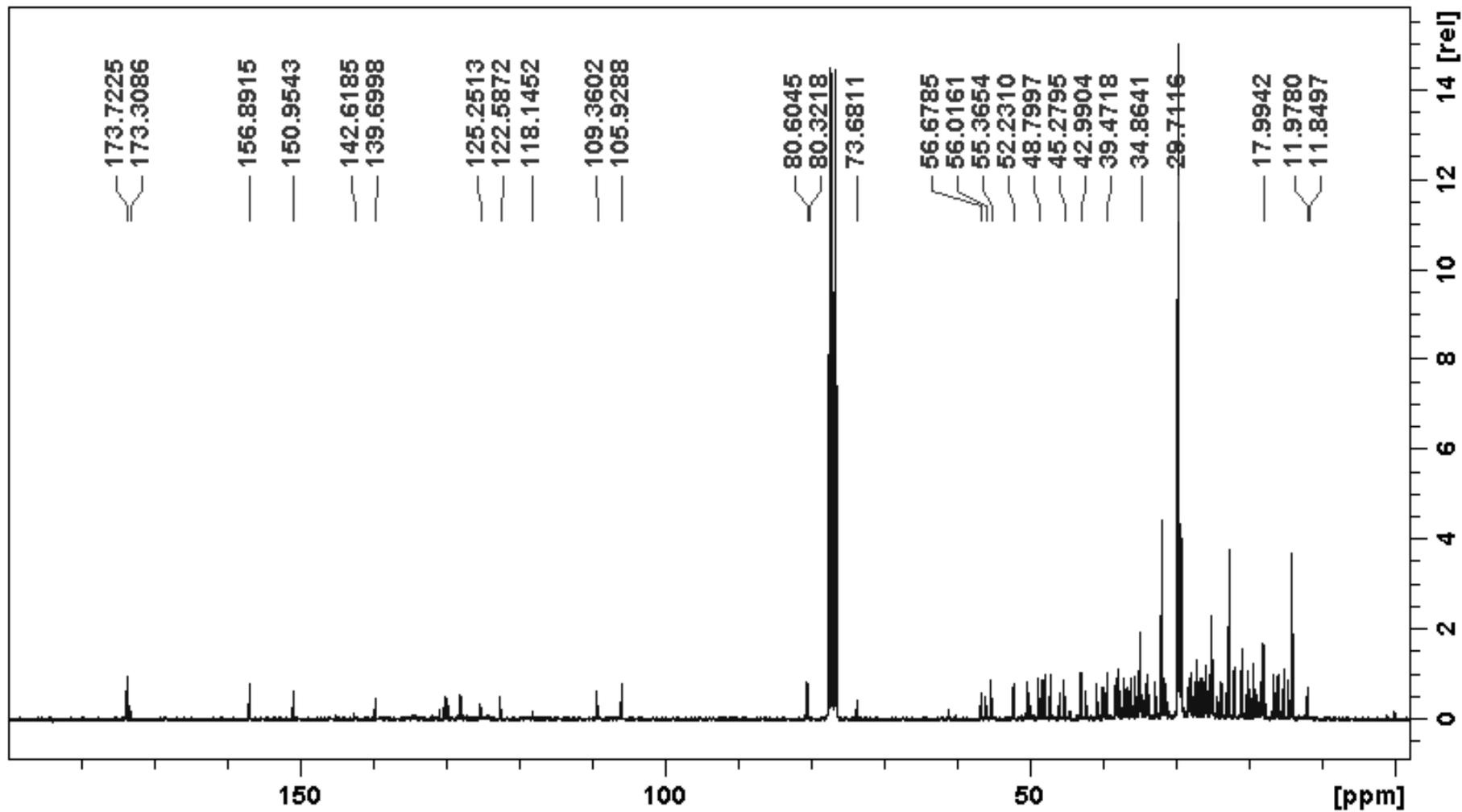
7.2 Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da fração DDC0F0.



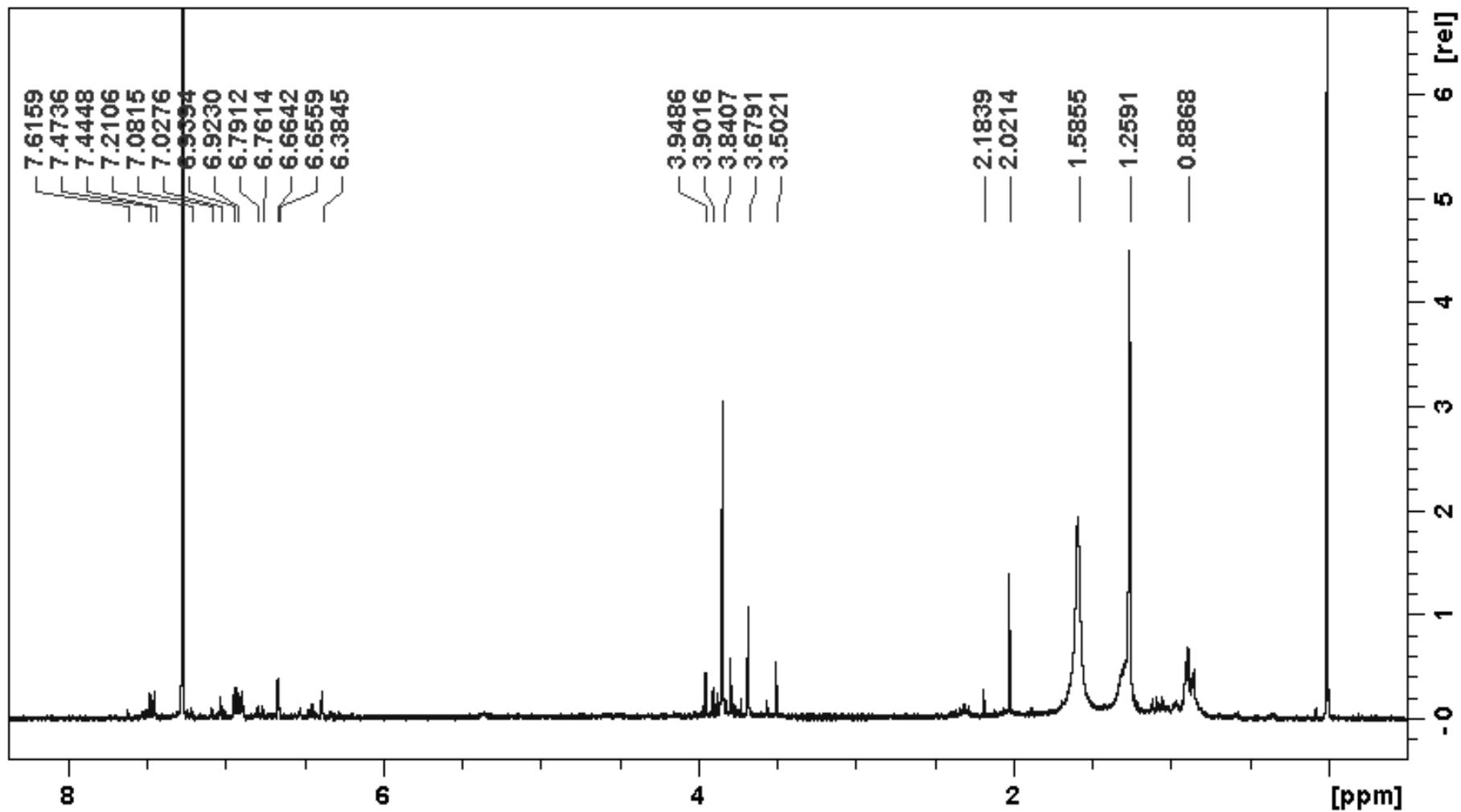
7.3 Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da fração DDC0F0.



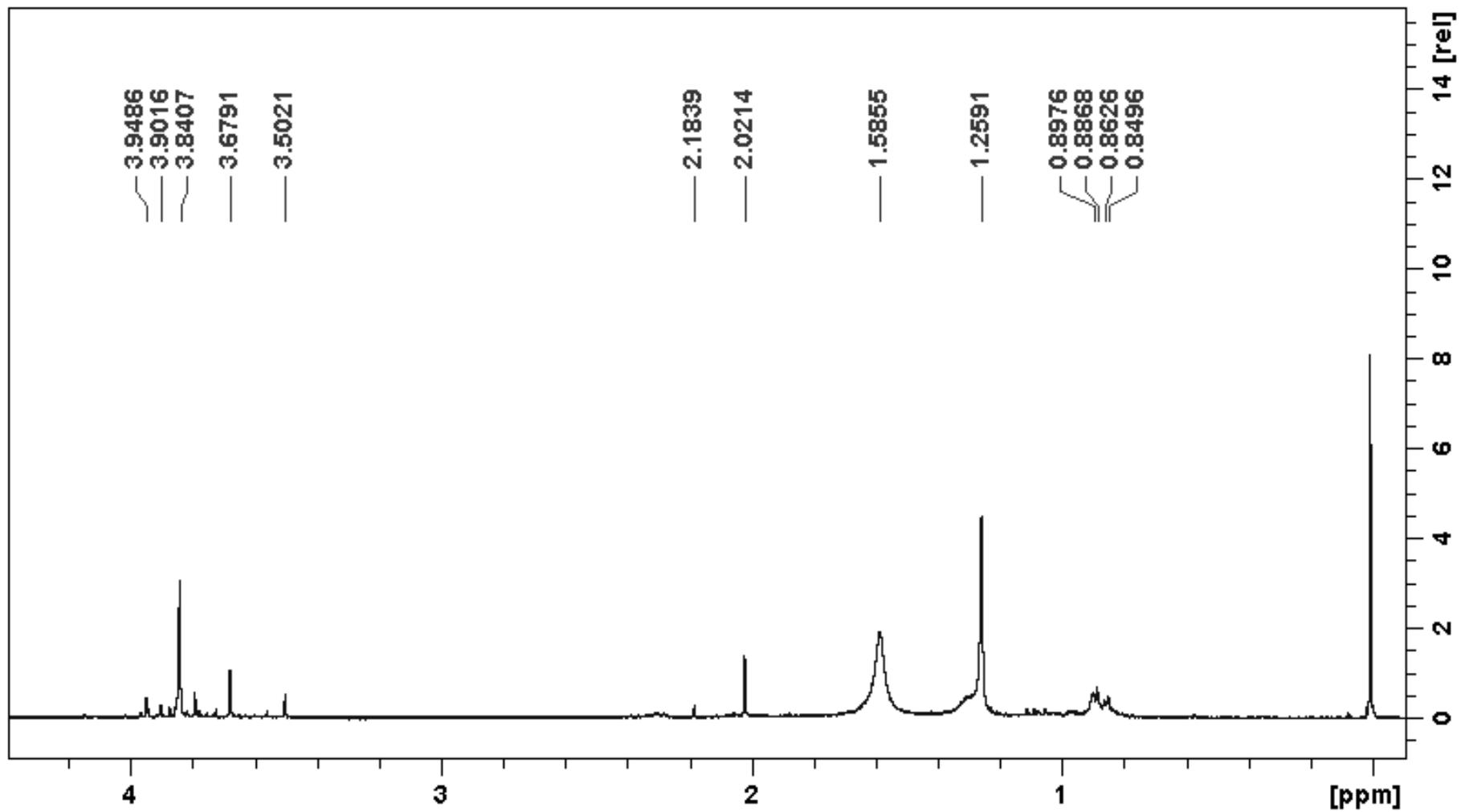
7.4 Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da fração DDC0F0.



7.5 Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da fração DDC0F8.



7.6 Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da fração DDC0F8.



7.7 Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 suplementado com TMS) da fração DDC0F8.

