



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS ELICITORAS SOBRE O ACÚMULO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS JOVENS DE
PICROLEMMA SPRUCEI HOOK. F. (SIMAROUBACEAE), UMA ESPÉCIE
MEDICINAL DA AMAZÔNIA UTILIZADA CONTRA A MALÁRIA.

Manaus/AM
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS UFAM
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR CAM**

CARLOS FREDERICO NOGUEIRA SILVA

Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia
2009

Carlos Frederico Nogueira Silva

Título: Efeitos de substâncias elicitoras sobre o acúmulo de metabólitos secundários em plantas jovens de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae), uma espécie medicinal da Amazônia utilizada contra a malária.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Agroflorestal.

Orientador: Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Co-orientadores: Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao
Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva
Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit

Manaus – AM
2009

Ficha Catalográfica

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

S586e Silva, Carlos Frederico Nogueira
Efeitos de substâncias elicitoras sobre o acúmulo de metabólitos secundários em plantas jovens de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae), uma espécie medicinal da Amazônia utilizada contra a malária / Carlos Frederico Nogueira Silva. 2009
116 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-
Pereira Coorientador: Eduardo Ossamu Nagao
Coorientador: Adrian Martin Pohlit
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Biotecnologia. 2. Isobruceína B. 3. Dosagens de Quassinóides. 4. Cultura de Tecidos. 5. Neosergeolida. I. Scherwinski-Pereira, Jonny Everson II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Carlos Frederico Nogueira Silva

Título: Efeitos de substâncias elicitoras sobre o acúmulo de metabólitos secundários em plantas jovens de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae), uma espécie medicinal da Amazônia utilizada contra a malária.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Agroflorestal.

Aprovada por:

Prof. _____ - Orientador

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA/Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN

Prof^a. _____

Dr^a. Ana Cristina da Silva Pinto

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Prof^a. _____

Dr^a. Marcia Rúbia Silva Melo

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Profª. _____

Drª. Simone da Silva

Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA

Prof. _____

Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

“O segredo é não correr atrás das borboletas.....

É cultivar o jardim para que elas venham até você”.

Mário Quintana

Dedico este trabalho a todos àqueles que possam vir a usufruir dos conhecimentos aqui apresentados.

À Edileuza, sem a qual este trabalho não teria sido concluído. Obrigado pelo companheirismo das muitas horas de falta de sono dedicados ao estudo e pelo amor

À Luiza, que acaba sendo a razão de todas as lutas.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas. Algumas delas não serão jamais contempladas pelas melhores palavras que eu tente encontrar, pois não há. Com certeza, daqui para frente, irei lembrar-me de sua preciosa e inestimável contribuição, materializadas de diferentes maneiras e que abriram mão, de alguma forma, do tempo que tinham para a realização de suas tarefas, dedicando-o a mim na construção de condições que me permitiram chegar até aqui.

Agradeço ao Dr. Eduardo Nagao pela orientação neste trabalho.

Ao Dr. Jonny Scherwinsky-Pereira pela orientação, mesmo à distância, mas fundamental para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Adrian Pohlit, pela cessão dos padrões de quassinóides utilizados neste projeto, pela infraestrutura do laboratório sob a sua coordenação no INPA e toda a ajuda intelectual.

Ao Dr. Jefferson Rocha pela orientação.

À Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade a mim concedida.

À Simone, pelas muitas ajudas, não só técnicas, mas também pessoais, na condução deste trabalho e também pelo estudo, companhia e amizade ao longo de tanto tempo.

Ao Rodrigo, companheiro na empreitada de finais de semana adentro no laboratório, sem hora nem para comer. Agradeço pelos ensinamentos, conversas e treinamentos recebidos.

À Aldi, pela parceria de trabalho e amizade.

À Dr^a. Eva Atroch, pelo companheirismo e ajuda sempre disponíveis no dia-a-dia do laboratório.

À Sônia, pelos ótimos momentos de descontração no dia-a-dia.

Ao Waldemir, pelo apoio técnico importantíssimo para o bom andamento do laboratório.

À Andrea Amancio, pelo convívio agradável.

A todos os alunos de IC (Iedo, Ana Carolina, Davi, Zé, Leandro) pelo trabalho desenvolvido.

Ao Salvador, amigo sempre, mesmo fisicamente distante.

Ao Silo, pelas muitas idas ao campo nas coletas fundamentais para a aquisição de material botânico.

À Flora, pela ajuda constante e fundamental.

Aos meus pais, por terem me proporcionado os ensinamentos básicos e fundamentais, além da condução, quando necessário, até chegar aqui.

Aos meus irmãos André, Paula e Luciana, por tudo que vivemos juntos.

A toda a equipe do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia do (INPA), por cederem espaço para a realização deste trabalho, sempre com atenção e cordialidade.

À Silvia, pela ajuda incondicional, sempre que precisamos.

À Maristela e Riba, sem a ajuda dos quais, muitos finais de semana eu não teria trabalhado, preocupado com a Luiza.

À Suframa e Fapeam, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Amazonas, por ter sido o local da minha formação desde a graduação.

Lista de Siglas e Abreviações

AAS	Ácido acetil salicílico
Acetil-COA	Acetil-coenzima A
AS	Ácido salicílico
ADP	Adenosina-difosfato
ATP	Adenosina-trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
C ₁₈	Cadeia de 18 carbonos
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C=O	Carbonila
cm	Centímetro
CPPN	Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GE	General Eletric
HMeJa	Dihidrometil jasmonato
H	Hora
H ⁺	Hidrogênio
HCT-8	Linhagem de células tumoral humana (colo)
HL-60	Linhagem de células tumoral humana (leucemia)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IC ₅₀	Inhibitory concentration of 50%
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
KB	Células de carcinoma humano da faringe
KB-CPT	Linhagem de células cancerígenas multirresistente a drogas
KB-VIN	Linhagem de células cancerígenas multirresistente a drogas
KB-7d	Linhagem de células cancerígenas multirresistente a drogas
K1	Cepa de <i>Plasmodium falciparum</i> multirresistente a drogas
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia

LCTV	Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais
LC ₅₀	Lethal concentration of 50%
M	Molar
MDA-MBA 345	Linhagem de células tumoral humana (melanona)
MeJa	Jasmonato de metila
MeSa	Salicilato de metila
MeOH	Metanol
MS0	Meio de cultura salino básico sem reguladores de crescimento
MS	Ministério da Saúde/Brasil
MS	Meio de cultura salino de Murashige & Skoog (1962)
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NCI	National Cancer Institute/EUA
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
P. A.	Reagente, grau Pró-Análise
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PAL	Phenylalanine Ammonia Lyase
P-388	Células de leucemia murina
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
SAR	Systemic Acquired Resistance
SF295	Linhagem de células tumoral humana (glioblastoma)
SRO	Espécies de oxigênio
TM	Trade Mark
US\$	Dólar americano
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFSCAR	Universidade Federal de São Carlos

USP	Universidade de São Paulo
V a. C.	Século 5 antes de Cristo
W	Watts
Walker 256	Células de carcinosarcoma intramuscular de camundongos
W2	Cepa de <i>Plasmodium falciparum</i> resistente à cloroquina

Lista de Símbolos

%	Percentual
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
G/L	Gramas por litro
Kgf/cm ²	Quilograma-força por centímetro quadrado
Km	Quilômetro
Mg/kg/d	Miligrama por quilo por dia
Mg/kg	Miligrama por quilo
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro
ug/mL	Micrograma por mililitro
ug/L	Micrograma por litro
uL	Microlitro
uM	Micromolar
pH	Potencial de hidrogênio
®	Marca Registrada
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

Lista de Figuras

Figura 1.1	Nº de casos de malária no Brasil entre 1970 e 1995. Fonte – CARVALHO <i>et al.</i> , 1997	26
Figura 1.2	Esquema do ciclo de vida do protozoário causador da malária humana, no mosquito vetor e no hospedeiro vertebrado. Fonte - CARVALHO <i>et al.</i> , 1997	29
Figura 1.3	<i>Picrolemma sprucei</i>	45
Figura 1.4	Mapa de distribuição de <i>P. sprucei</i> Hook. f. Fonte: http://www.mobot.org . (2008).	46
Figura 1.5	Mapa da cidade de Manaus e indicação do local de coleta da espécie (campus da UFAM).	47
Figura 1.6	Aspectos morfológicos de <i>P. sprucei</i> Hook. f. Fonte: http://www.mobot.org/viewer . (2008).	49
Figura 1.7	Estruturas de quassina e neoquassina.	51
Figura 4.1	Etapas metodológicas	62
Figura 4.2	Vista do experimento de elicitação de plantas jovens de <i>P. sprucei</i> mantidas em casa de vegetação do LCTV – UFAM.	66
Figura 4.3	Representação esquemática das aplicações na cromatoplaça	70
Figura 5.1	Cromatograma do padrão de neosergeolida utilizado na determinação deste metabólito em plantas de <i>P. sprucei</i> após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	74
Figura 5.2	Cromatograma do padrão de isobruceína B utilizado na determinação deste metabólito em plantas de <i>P. sprucei</i> após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	75
Figura 5.3	Cromatograma da determinação de isobruceína B e neosergeolida em folhas de <i>P. sprucei</i> após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	75
Figura 5.4	Cromatograma da determinação de isobruceína B e neosergeolida no caule de <i>P. sprucei</i> após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	76

Figura 5.5 Cromatograma da determinação de isobruceína B e neosergeolida em 76
raízes de *P. sprucei* após 120 dias de cultivo *in vitro* por Cromatografia
Líquida de Alta Eficiência

Lista de Gráficos

- Gráfico 5.1 Determinação de isobruceína B e neosergeolida em raízes de plantas de regeneração de *P. sprucei* por CCD/fotodensimetria. 78
- Gráfico 5.2 Determinação de isobruceína B e neosergeolida em caule de plantas de regeneração de *P. sprucei* por CCD/fotodensimetria. 79
- Gráfico 5.3 Determinação de isobruceína B e neosergeolida em folhas de plantas de regeneração de *P. sprucei* por CCD/fotodensimetria. 80

Lista de Tabelas

Tabela 5.1	Resultado dos testes de descontaminação de sementes de <i>P. sprucei</i> .	73
Tabela 5.2	Concentração de isobruceína B (%) em plantas submetidas ao tratamento com MeJa.	81
Tabela 5.3	Concentração de neosergeolida (%) em plantas submetidas ao tratamento com MeJa.	81
Tabela 5.4	Concentração de isobruceína B (%) em plantas submetidas ao tratamento com MeSa.	83
Tabela 5.5	Concentração de neosergeolida (%) em plantas submetidas ao tratamento com MeSa.	83
Tabela 5.6	Concentração de isobruceína B (%) em plantas submetidas ao tratamento com AS.	84
Tabela 5.7	Concentração de neosergeolida (%) em plantas submetidas ao tratamento com AS.	85
Tabela 5.8	Acúmulo de isobruceína B (%) em raízes sob os diversos tratamentos testados.	85
Tabela 5.9	Acúmulo de neosergeolida (%) em raízes sob os diversos tratamentos testados.	86
Tabela 5.10	Acúmulo de isobruceína B (%) em caule sob os diversos tratamentos testados.	87
Tabela 5.11	Acúmulo de neosergeolida (%) em caule sob os diversos tratamentos testados.	87
Tabela 5.12	Acúmulo de isobruceína B (%) em folhas sob os diversos tratamentos testados.	88
Tabela 5.13	Acúmulo de neosergeolida (%) em folhas sob os diversos tratamentos testados.	89

Lista de Anexos

Anexo 1A	Dosagem de quassinóides – Elicitação – Jasmonato (24, 48 e 72 h).	107
Anexo 1B	Dosagem de quassinóides – Elicitação – Salicilato (24, 48 e 72 h).	109
Anexo 1C	Dosagem de quassinóides – Elicitação – Ácido salicílico (24, 48 e 72 h).	111
Anexo 1D	Dosagem de quassinóides – Elicitação – Controle.	113
Anexo 2A	Dosagem de quassinóides – Mudanças de regeneração – parte da planta: raízes.	114
Anexo 2B	Dosagem de quassinóides – Mudanças de regeneração – parte da planta: caule.	115
Anexo 2C	Dosagem de quassinóides – Mudanças de regeneração – parte da planta: folhas.	116

RESUMO

A malária humana, uma das mais debilitantes doenças parasitárias do mundo, continua endêmica nas regiões tropicais apesar dos intensos programas de controle na tentativa de combatê-la. A atual resistência “multi-droga” do *Plasmodium falciparum*, responsável pela forma mais severa da doença, aos antimaláricos mais eficazes já utilizados contra o parasita, torna necessário mais e melhores fármacos contra a doença. *Picrolemma sprucei* Hook. f. (sinonímia *P. pseudocoffea* Ducke) é um arbusto nativo e importante planta medicinal da Amazônia. Bem conhecida por populações indígenas, tem sido usada há bastante tempo na medicina tradicional para tratar malária. Seus principais componentes químicos, a isobruceína B e neosergeolida, da classe dos quassinóides, apresentam elevada atividade antiplasmódica *in vitro* e *in vivo*. Apesar disso, não se conhece sobre a sazonalidade da produção desses metabólitos na planta, tampouco em que fase de desenvolvimento a planta começa a produzi-los. Assim, este trabalho determinou e comparou a produção dos quassinóides isobruceína B e neosergeolida em plantas de *P. sprucei* germinadas e cultivadas *in vitro*, em plantas jovens de populações naturais e em plantas jovens mantidas em viveiro e elicitadas com jasmonato de metila, salicilato de metila e ácido salicílico por 24, 48 e 72 horas, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia em Camada Delgada e Densitometria. Os resultados mostraram que as plântulas germinadas e cultivadas *in vitro*, após 120 dias, não apresentaram os quassinóides em níveis detectáveis. Já as plantas jovens de populações naturais apresentaram ambos em quantidades variadas (até 0,95% para isobruceína e 2,37% para neosergeolida) e diferentes proporções entre as diferentes partes da planta avaliados. O salicilato de metila se mostrou ser o melhor elicitador testado, estimulando um acúmulo de até 5,37% de isobruceína B em raízes e de até 9,28% de neosergeolida em folhas.

Palavras-chaves: biotecnologia; cultura de tecidos; dosagens de quassinóides; estimulação de metabólitos secundários *in vivo*; isobruceína B; neosergeolida.

ABSTRACT

The human malaria, one of the most debilitating diseases in the world, remains endemic in tropical regions despite intensive control programs in an attempt to combat it. The increasing spread of antimalarial drug resistance became necessary new drugs against the disease. *Picrolemma sprucei* Hook. f. (synonym *P. pseudocoffea* Ducke) is a native shrub and an important medicinal plant from the Amazon Region. The plant has been used in traditional medicine to treat malaria. Its main chemical compounds, the quassinoids isobrucein B and neosergeolide, have presented high *in vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity. Nevertheless, it's not know about the production seasonality of these metabolites by the plant, nor the development stage that the plant start to produce them. This study quantified and compared the production of the quassinoids isobrucein B and neosergeolide in *P. sprucei* plants of *in vitro* germination, in natural populations of young plants and in green house seedlings maintained in elicitation with methyl jasmonate, methyl salicylate and salicylic acid for 24, 48 and 72 hours, using High Performance Liquid Chromatography, Thin Layer Chromatography and Densitometry. The results showed that *in vitro* seedlings, after 120 days, presented no detectable quantities of quassinoids. The natural young plants population presented different amounts of quassinoids (up to 0.95% for isobrucein B and 2.37% for neosergeolide) in different parts of the plant. The methyl salicylate has shown to be the best tested elicitor, stimulating an accumulation up to 5.37% of isobrucein B in roots and up to 9.28% of neosergeolide in leaves. Keywords: biotechnology; tissue culture; quassinoids dosages; *in vivo* secondary metabolites stimulation; isobrucein B; neosergolide.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1.	Malária	25
1.1.1.	Histórico da doença	27
1.1.2.	Ciclo de vida do parasita da malária	28
1.1.3.	Agente etiológico	30
1.2.	Plantas medicinais	31
1.3.	Metabólitos secundários	33
1.4.	Cultura de tecidos vegetais e produção de metabólitos secundários	37
1.4.1.	Estimuladores	40
1.5.	A espécie vegetal	44
1.5.1.	Descrição botânica	44
1.5.2.	Classificação taxonômica	45
1.5.3.	Distribuição geográfica	46
1.5.4.	A família SIMAROUBACEAE	47
1.5.5.	Aspectos morfológicos	48
1.5.6.	Princípios ativos, relatos de uso e atividades biológicas	49
1.6.	Quassinóides	50
1.6.1.	Atividade biológica	53
2	JUSTIFICATIVA	58
3	OBJETIVOS	60
3.1.	Objetivo Geral	60
3.2.	Objetivos Específicos	60
4.	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1.	Material vegetal e certificação botânica	63
4.2	Cultura de tecidos	63
4.2.1	Desinfestação	63
4.2.2	Antibiograma	64
4.2.3	Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	64
4.3	Elicitação de plantas jovens de <i>Picrolemma sprucei</i> com jasmonato de metila (MeJa), salicilato de metila (MeSa) e ácido salicílico (AS)	65
4.4	Avaliação da concentração de quassinóides em plantas jovens por Cromatografia de Camada Delgada/Fotodensitometria	66

4.4.1	Reagentes	67
4.4.2	Equipamentos	67
4.4.3	Preparo do extrato metanólico	67
4.4.3.1	Plantas de regeneração e plantas elicitadas	67
4.4.3.2	Plântulas <i>in vitro</i>	68
4.4.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	68
4.4.5	Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	69
4.4.5.1	Preparo dos padrões	69
4.4.5.2	Aplicação das amostras e padrões	69
4.4.5.3	Eluente	70
4.4.5.4	Reveladores para CCD	70
4.4.5.5	Preparo de padrões	71
4.4.6	Quantificação dos quassinóides isobruceína B e neosergeolida	72
4.4.7	Análise estatística	72
5	Resultados e Discussão	73
5.1	Desinfestação e estabelecimento da cultura de <i>Picrolemma sprucei in vitro</i>	73
5.2	Determinação de quassinóides em plântulas <i>in vitro</i>	74
5.3	Determinação de quassinóides em plantas de regeneração	77
5.4	Estimulação e acúmulo de quassinóides em plantas de viveiro	80
5.4.1	Plantas submetidas ao jasmonato de metila (MeJa)	80
5.4.2	Plantas submetidas à ação do salicilato de metila (MeSa)	82
5.4.3	Plantas submetidas à ação do ácido salicílico (AS)	84
5.4.4	Comparação entre os tratamentos no acúmulo de isobruceína B nas raízes	85
5.4.5	Comparação entre os tratamentos no acúmulo de neosergeolida nas raízes	86
5.4.6	Comparação entre os tratamentos no acúmulo de isobruceína B no caule	86
5.4.7	Comparação entre os tratamentos no acúmulo de neosergeolida no caule	87
5.4.8	Comparação entre os tratamentos no acúmulo de isobruceína B nas folhas	88

5.4.9	Comparação entre os tratamentos no acúmulo de neosergeolida nas folhas	88
6	CONCLUSÃO	89
7	PERSPECTIVAS	90
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXOS	106
ANEXO 1A	Dosagem de quassinóides – Elicitação – MeJa (24, 48 e 72 h)	07
ANEXO 1B	Dosagem de quassinóides – Elicitação – MeSa (24, 48 e 72 h)	109
ANEXO 1C	Dosagem de quassinóides – Elicitação – AS (24, 48 e 72 h)	111
ANEXO 1D	Dosagem de quassinóides – Elicitação – Controle	113
ANEXO 2A	Dosagem de quassinóides – Mudanças de regeneração – parte da planta: raízes	114
ANEXO 2B	Dosagem de quassinóides – Mudanças de regeneração – parte da planta: caule	115
ANEXO 2C	Dosagem de quassinóides – Mudanças de regeneração – parte da planta: folhas	116

1 – INTRODUÇÃO

As plantas têm sido tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas. Na Amazônia, apesar do número considerável de espécies descritas, existem pouquíssimos estudos científicos dos perfis químicos e das propriedades medicinais das espécies biológicas utilizadas na medicina popular (SCHULTES, 1979; GILBERT *et al.*, 1997). Uma visão abrangente sobre o uso terapêutico das plantas, considerando-se os aspectos econômicos e sociais, reforça essa prática que se justifica, principalmente, devido ao isolamento dessas regiões dos grandes centros, resultando em uma carência no atendimento médico e, ainda, aos altos preços dos medicamentos, muitas vezes proibitivos para a grande maioria da população (DI STASI *ET al.*, 1989). Dentro desse contexto, observam-se relatos de utilização, na medicina popular do norte e noroeste da América do Sul, de espécies de diferentes famílias botânicas contra a malária (KRETTLI *et al.*, 2001; ANDRADE-NETO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Limitações atuais do arsenal profilático e terapêutico na malária humana tornam a busca de novos medicamentos necessária, pois além da resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina e a outros derivados quinolínicos, os antimaláricos disponíveis são tóxicos, de elevado custo ou rapidamente induzem resistência do parasita (ANDRADE-NETO, 2004).

1.1. Malária

A malária humana, uma das mais debilitantes doenças parasitárias do mundo, continua endêmica nas Américas Central e do Sul, na África e Sudeste Asiático, apesar dos intensos programas de controle na tentativa de combatê-la (KRETTLI, 1990). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a malária é a doença de maior importância econômica nos trópicos,

ocasionando 2,3 milhões de mortes anuais e um total anual estimado de 489 milhões de casos clínicos (STURCHLER, 1989 *apud* KRETTLI, 1990). Segundo dados do Ministério da Saúde – MS, no Brasil são registrados de 500 a 600 mil casos agudos de malária anualmente, sendo 99% destes na Amazônia Brasileira (KRETTLI *et al.*, 2001; ANDRADE-NETO, *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; NOEDL *et al.*, 2003).

Nos anos 1970 e 1980, a intensificação do desenvolvimento da Região Amazônica acelerou o processo migratório, atraindo habitantes de outras partes do país para projetos de colonização e expansão da fronteira agropecuária, construção de estradas e hidrelétricas, extração de madeira e mineração. Segundo estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS), a rápida e intensa deterioração socioeconômica de grande parte da população migrante fez com que os focos de malária existentes na região se expandissem rapidamente e a doença assumisse proporções alarmantes na última década do século passado (Figura 1.1) (CARVALHO *et al.*, 1997).

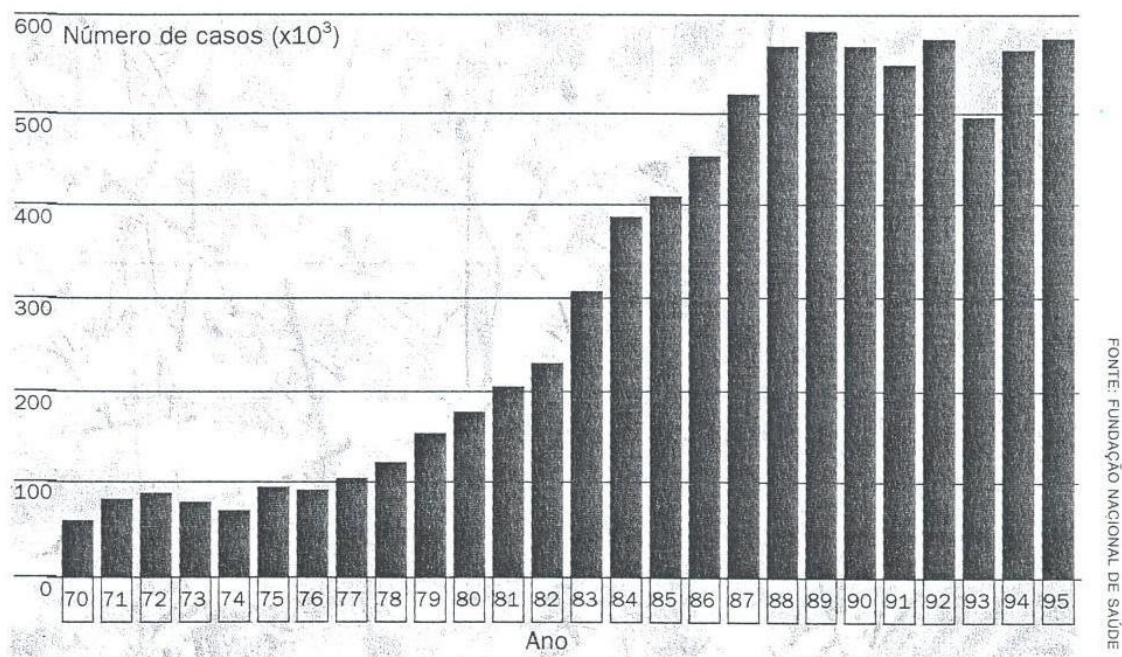


Figura 1.1 – Nº de casos de malária no Brasil entre 1970 e 1995.
Fonte – CARVALHO *et al.*, (1997).

A doença ocorre ainda em outros mamíferos (macacos e roedores), aves e anfíbios, infectados por diferentes espécies do parasita (CARVALHO *et al.*, 1997). A malária por *P. falciparum* pode resultar em complicações graves decorrentes de acometimentos cerebral, pulmonar e renal, além de anemia intensa, podendo levar à morte em poucos dias. O diagnóstico e tratamento precoces previnem essas complicações e a letalidade (KRETLI, 1990).

Cloroquina e mefloquina (derivados da quinina, o antimalarial natural extraído das cascas da quina) foram altamente eficazes contra diferentes espécies de parasitas, incluindo o *Plasmodium falciparum*, responsável pela forma mais severa da doença. Entretanto, a resistência “multi-droga” do *P. falciparum* é amplamente reconhecida, sendo, portanto, necessários mais e melhores fármacos contra a malária. Na pesquisa com plantas medicinais, a atividade encontrada no extrato é influenciada pelo sinergismo, isto é, pela contribuição individual de cada componente encontrado na planta. Essa sinergia pode envolver a proteção de uma substância ativa contra a degradação provocada por enzimas, facilitar o transporte no organismo, vencer o mecanismo de resistência “multi-droga” e outros fatores que resultem em maior eficácia do conjunto de substâncias quando comparado à substância isolada (KRETLI *et al.*, 2001. ROBERT *et al.*, 2002. ANDRADE-NETO, *et al.*, 2003. NOEDL *et al.*, 2003).

1.1.1. Histórico da Doença

A malária atinge o homem desde a Pré-História. No século V a.C., Hipócrates, considerado o “pai da Medicina”, foi o primeiro a relacionar a doença às estações do ano e aos locais frequentados pelos doentes e também o pioneiro em descrever detalhadamente os sintomas e as complicações causadas pela enfermidade. No século XVII, padres jesuítas descobriram um pó que era extraído de uma árvore nativa e usado por populações indígenas da América do Sul para tratar alguns tipos de febre. Logo seu uso se espalhou pela Europa,

ganhando o nome de pó dos jesuítas. A árvore de que era extraído recebeu o nome, em 1735, de cinchona. O princípio ativo foi isolado em 1820 e denominado quinino (BRASIL, 2007).

Foi somente no início do século XIX que o termo malária teve origem. Escritores italianos defendiam a tese de que a doença era causada por vapores nocivos exalados dos pântanos tiberianos, designando-a “mal aria”, cujo sentido literal é “mau ar” (NEVES, 2002).

Em 1880, o médico francês Charles Alphonse Laveran observou e descreveu parasitas da malária no interior de glóbulos vermelhos humanos. Quase duas décadas depois, em 1897, o médico britânico Ronald Ross elucidou o modo de transmissão da doença, ao encontrar formas do parasita da malária no interior de um mosquito que havia se alimentado do sangue de um portador. O quadro completo do ciclo de desenvolvimento do parasita da malária no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* foi obtido pelos pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi, em estudos realizados entre 1898 e 1899 (BRASIL, 2007).

1.1.2. Ciclo de Vida do Parasita da Malária

A malária é uma doença infecciosa transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* (BRASIL, 2007). É causada por um protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo que todas as 171 espécies são parasitas. O ciclo de vida dos parasitas pode variar dependendo da espécie e do tipo de hospedeiro, mas mantém um padrão básico em todos eles. No hospedeiro vertebrado o *Plasmodium* se reproduz por um processo denominado esquizogonia (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2007). Organismos unicelulares, os plasmódios iniciam seu ciclo de vida no hospedeiro vertebrado como esporozoítas, presentes na glândula salivar dos mosquitos (Figura 1.2). Essa forma é inoculada no homem através da picada do inseto, quando as fêmeas buscam alimento no sangue para alimentar seus ovos (CARVALHO *et al.*, 1997). Ao lubrificar com

sua saliva o local que será picado, os esporozoítas encontrados nela são liberados e, ao picar, eles são introduzidos no organismo do hospedeiro, caindo diretamente no sangue e, em minutos, na corrente sanguínea (BRASIL, 2007).

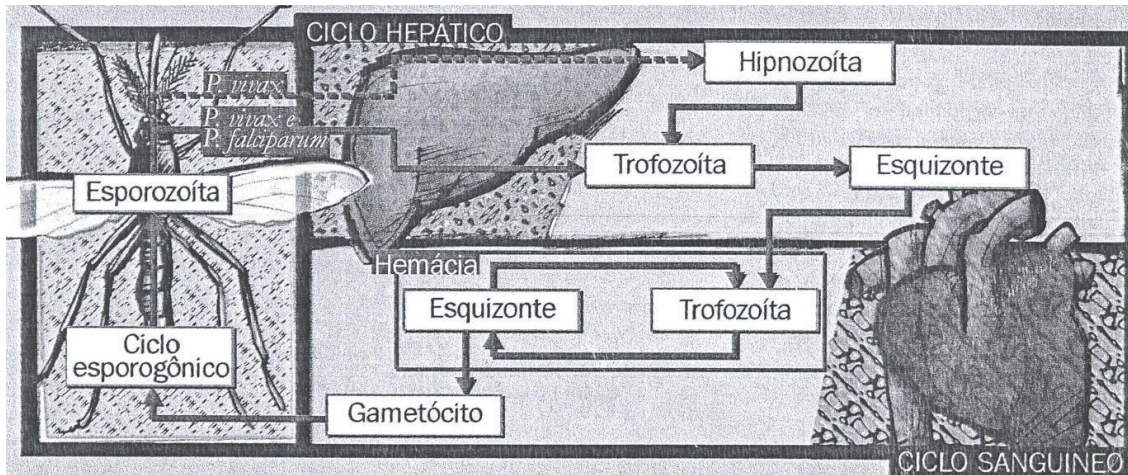


Figura 1.2 – Esquema do ciclo de vida do protozoário causador da malária humana, no mosquito vetor e no hospedeiro vertebrado.

Fonte – CARVALHO *et al.*, (1997).

Ao entrar na corrente sanguínea, os esporozoítos apoderam-se e desenvolvem-se nas células hepáticas (que, uma vez mortas, não se recuperam) (BRASIL, 2007). Nessa fase inicial da doença, depois dos esporozoítas alojarem-se no fígado, eles diferenciam-se em formas denominadas trofozoítas. Durante o período de incubação (em geral de 10 a 15 dias), os trofozoítas multiplicam-se, por reprodução assexuada, gerando formas denominadas esquizontes, que darão origem a milhares de parasitas-filhos (merozoítas) (CARVALHO *et al.*, 1997). Estes penetram nas hemácias e se armazenam em vacúolos digestivos, se multiplicam e hidrolisam a hemoglobina tomando formas masculinas e femininas chamadas de gametócitos e produzindo hemozoína (BRASIL, 2007). No interior da hemácia (ciclo sanguíneo), os parasitas diferenciam-se e multiplicam-se, destruindo-a no processo. Dependendo da espécie do parasita, essa destruição ocorre a cada dois ou três dias (malária terçã ou quartã, respectivamente), provocando os acessos periódicos de febre, dores e anemias típicos da moléstia. Após alguns

ciclos sanguíneos e a geração de formas sexuadas, estes gametócitos irão evoluir apenas no mosquito vetor, para o qual podem retornar em outra picada. No estômago do mosquito (ciclo esporogônico), há formação e fertilização dos gametas e, o zigoto resultante, após complexo processo de diferenciação e reprodução, levará à formação de milhares de formas infectantes (esporozoítas), que migram para a glândula salivar do inseto (CARVALHO *et al.*, 1997).

No caso do *Plasmodium vivax*, espécie predominante nas Américas, os esporozoítas podem permanecer no fígado em estágio de latência (denominado hipnozoíta) que induz recaídas meses ou, raramente, anos após a primeira manifestação da doença (CARVALHO *et al.*, 1997).

Quando um mosquito pousa na pele e suga o sangue de uma pessoa doente de malária são liberados, posteriormente, esporozoítos. Estes migram até as glândulas salivares do mosquito e ali permanecem até que o mosquito sugue outro humano e transmita o ciclo evolutivo da doença aos outros (BRASIL, 2007).

1.1.3. Agente Etiológico

Os parasitas causadores da malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, apenas quatro parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, agente da terçã maligna; *P. vivax*, agente da terçã benigna, ambos prevalentes no Brasil; *P. malariae*, agente da febre quartã, comum no continente africano, mas rara no nosso meio e com diagnóstico dificultado por sua grande semelhança com o *P. vivax* no exame da gota espessa; e o *P. ovale*. Este último ocorre apenas em regiões restritas do Continente Africano e Sudeste Asiático (KRETTLI, 1990; NEVES, 2002).

1.2. Plantas Medicinais

As plantas vêm sendo utilizadas como auxiliares no tratamento de doenças há milhares de anos, por praticamente todos os grupos étnicos (SIMÕES *et al.*, 1989). Já o uso de plantas como medicamento vem desde a Antiguidade, onde o homem procurava na natureza plantas que fossem capazes de aliviar seus sofrimentos físicos e psíquicos e curar suas doenças (PHILLIPSON, 2001). A origem do conhecimento do homem sobre as virtudes das plantas confunde-se com sua própria história. Certamente, surgiu à medida que tentava suprir suas necessidades básicas, mediante a casualidades, tentativas e observações, conjunto de fatores que constituem o empirismo. O homem primitivo dependia fundamentalmente da natureza para a sua sobrevivência e utilizou-se, principalmente, das plantas medicinais para curar-se. No decorrer de sua evolução surgiram novas terapias (SILVA, 2002). Durante esse processo, os povos primitivos fizeram a identificação das espécies que curavam, as partes dos vegetais adequados ao uso medicinal, assim como a época mais indicada para a colheita (LEVIS-STRAUSS, 1989). Após a identificação, vieram as técnicas de extrair sucos, secar folhas e raízes e triturar sementes, o que daria início a um corpo teórico do conhecimento que constituiria a medicina do homem primitivo. Esse processo foi lento e longo, no qual a intuição aliada a diferentes tipos de ensaios empíricos, vagarosamente, converteu a experiência do saber em memória coletiva, e esta foi repassada às gerações seguintes (MALOSSO, 2007).

Acredita-se que o registro mais antigo de todos é o Pen Ts'ao, de 2800 a.C., escrito pelo herborista chinês Shen Nung, que descreve o uso de centenas de plantas medicinais na cura de várias moléstias (ALMEIDA, 2000).

A noção básica do entendimento de substâncias responsáveis pela atividade farmacológica e a resposta terapêutica como potencial característico de certa espécie vegetal, é creditada a Paracelso (ROBBERS *et al.*, 1997 e ALMEIDA, 2000). Este físico suíço, no início do século XVI, começou a praticar a extração de substâncias a partir de drogas até então consideradas como indispensáveis, as quais denominou de *Quinta Essentia*. A *Quinta Essentia* é, provavelmente, a primeira noção de princípio bioativo (ALMEIDA, 2000).

As plantas medicinais são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muito dos quais se constituem em modelo para a síntese de um grande número de fármacos (NODARI & GUERRA, 1999). De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, 65 a 80% da população que vive em países em desenvolvimento têm carência de acesso à medicina moderna devido à pobreza e dependem, essencialmente, das plantas medicinais para suprir suas necessidades primárias de saúde (CALIXTO, 2000 *apud* MALOSSO, 2007).

Nos anos 1980, o desenvolvimento de pesquisas científicas resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas (SILVA, 2002).

Grande parte destes está incluída na atual terapêutica dos países ocidentais. No período de 1983-1994, 6% dos medicamentos aprovados foram extraídos diretamente de espécies vegetais. Outros 24% foram de produtos derivados e 9% foram desenvolvidos por meio de modelagem molecular, onde as estruturas moleculares dos compostos serviram como precursores de processos de síntese química. Atualmente, metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal (ALVES, 2001).

Nodary & Guerra (1999), no entanto, relatam que as informações existentes sobre a magnitude do mercado de compostos de origem vegetal são pouco precisas. Por um lado, afirma-se que o mercado mundial de drogas de origem vegetal é estimado em US\$ 12,4 bilhões, sendo o consumo da Europa responsável por, aproximadamente, 50% desse mercado. Há

informações de que os produtos naturais e as preparações fitoterápicas são responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento (CRAGG *et al.*, 1997).

A definição de produto fitoterápico, segundo a RDC 48 da ANVISA (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004), pressupõe que a transformação de uma planta em medicamento implica na preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de emprego, além de valorizar o seu potencial terapêutico. Dessa forma, no desenvolvimento de um novo produto fitoterápico, fazem-se necessários estudos relativos a aspectos agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e de metodologias analíticas qualitativas e quantitativas, dentre outros. Essa fundamentação científica o diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular (SONAGLIO *et al.*, 2004).

1.3. Metabólitos Secundários

O metabolismo vegetal compreende conversões bioquímicas inter-relacionadas, que ocorrem em rotas específicas. O metabolismo primário, por definição, engloba moléculas com importância direta nas funções vitais do organismo, tais como aminoácidos e açúcares (VERPOORTE *et al.*, 1998). De acordo com COLLIN (2001), as plantas são constituídas, em sua maior parte, por moléculas derivadas do metabolismo primário. São polissacarídeos, açúcares, proteínas e gorduras, que são os “blocos de construção” para o crescimento da planta.

Os compostos orgânicos do metabolismo primário formam o ponto de partida do chamado metabolismo secundário, através de vias especializadas. Presentes em concentração

muito menor, incluem alcalóides, terpenóides, compostos fenólicos, esteroides e flavonoides, que possuem uma enorme diversidade em estrutura e tamanho e são encontrados em grande número através do reino vegetal. Compostos não essenciais para a vida das células, mas, frequentemente, essenciais para a sobrevivência, propagação e perpetuação das plantas, são chamadas de metabólitos secundários ou especiais, que apresentam distribuição mais restrita, oferecendo informações valiosas no campo da ecologia química e da quimiosistemática (COLLIN, 2001; SUDHA & RAVISHANKAR, 2002). Muitos desses metabólitos funcionam como sinais químicos, envolvidos nas funções de proteção contra estresses biótico e abiótico, tais como a ação de herbívoros, patógenos, competidores, luz ultravioleta e condições de seca, além de atuarem na atração de polinizadores e no estoque temporário de nutrientes (CRUZ *et al.*, 2000).

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle gênico, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, ecológicos e evolutivos. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. Portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Eles podem estar presentes em níveis constitutivamente altos, como na casca altamente diferenciada e no cerne da madeira de plantas perenes, ou como substâncias resultantes da indução de uma síntese rápida de grande quantidade de fitoalexinas de baixo peso molecular, seguintes a uma invasão por patógenos ou ataque de insetos. Uma visão mais ampla é a de que os metabólitos secundários podem ser um “depósito conveniente” para onde carbono e nitrogênio em excesso podem ser desviados a partir de uma parte do metabolismo primário inativo. Os metabólitos secundários seriam, então, degradados, sendo carbono e nitrogênio

armazenados e reciclados de volta para o metabolismo primário, quando houvesse a formação de uma demanda (COLLIN, 2001).

Ainda de acordo com Collin (2001), o balanço entre as atividades dos metabolismos primário e secundário é dinâmico. Ele será afetado grandemente pelo crescimento, diferenciação dos tecidos e desenvolvimento da planta. Já os fatores que determinam a localização e acúmulo dos metabólitos secundários na planta intacta são importantes uma vez que estes mesmos controles afetam a indução de metabólitos secundários em culturas de células e tecidos de plantas. Por exemplo, a eliciação de uma rota secundária por um patógeno irá levar a uma indução localizada de uma fitoalexina na planta e, assim, eliciadores são usados para estimular a formação de metabólitos secundários em cultura de tecidos.

Os metabólitos secundários são de valor significativo para nós, consumidores, uma vez que eles são a base de aromas, fragrâncias e corantes de alimentos e bebidas da nossa dieta. Quando isolados e purificados das plantas, alguns metabólitos secundários dão origem a substâncias de alto valor agregado, como aditivos alimentícios, perfumes e produtos farmacêuticos. Estes últimos são os mais valiosos, mas sua produção é, frequentemente, afetada pela limitação quantitativa da fonte vegetal. Por outro lado, o fármaco pode estar presente em uma baixa concentração na planta (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Para o homem, a grande diversidade de metabólitos secundários oferece uma fonte de novas moléculas potencialmente úteis, particularmente aquelas que possuem valor terapêutico, como é o caso da atropina, nicotina, quinina, morfina e cafeína (SANTOS, 2004). Em plantas, são três as principais classes de metabólitos secundários: alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos.

Segundo Hughes & Shanks (2002), os alcalóides são uma classe estruturalmente diversa de compostos nitrogenados que são encontrados em muitas plantas e, frequentemente, exibem atividade fisiológica. Através da história, plantas que produzem alcalóides e seus

extratos têm sido exploradas por suas propriedades medicinais e tóxicas. Exemplos de alcalóides, de origem vegetal que, atualmente, são amplamente utilizados incluem analgésicos (morfina e codeína), estimulantes (cafeína e nicotina) e quimioterápicos (vincristina, vimblastina, derivados de camptotecina e paclitaxel).

Os terpenos ou terpenóides constituem a maior classe de produtos secundários. As diversas substâncias desta classe são, geralmente, insolúveis em água. Elas são biossintetizadas a partir da acetil-Coenzima A (acetil-CoA) ou intermediários glicolíticos, via ácido mevalônico (SIMÕES & SPITZER, 2004) e pela via da 1-deoxi-D-xilulose.

Os compostos fenólicos compõem o segundo grande grupo de substâncias secundárias vegetais (HESS, 1980). O termo fenólico é usado para definir substâncias que possuem uma ou mais hidroxilas substituintes (OH) ligadas a um anel aromático e seu nome deriva do fenol. Componentes que possuem substituintes com anéis fenólicos são frequentemente classificados como polifenóis, apesar de nem todos os grupos hidroxílicos serem fenólicos (WATERMAN & MOLE, 1994).

A maioria dos metabólitos secundários, tais como alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteroides, quinonas, e lignanas têm encontrado aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromatizantes, inseticidas, etc. Esses compostos apresentam uma ampla diversidade em estruturas e tamanhos, sendo encontrados e distribuídos por todo o reino vegetal (COLLIN, 2001; VERPOORTE & MEMELINK, 2002).

Como esses compostos são utilizados em grandes quantidades, a produção pelas plantas nem sempre é satisfatória. Os compostos frequentemente estão restritos a uma espécie ou gênero e, muitas vezes, podem ser produzidos somente durante uma fase do crescimento ou de um estágio do desenvolvimento vegetal, ou ainda em estações específicas do ano, sob condições de estresse ou de disponibilidade de nutrientes. Por essas razões, nos últimos anos têm se feito esforços com cultura de células vegetais para que se torne um método viável de

produção de metabólicos secundários de interesse comercial (VERPOORTE & MEMELINK, 2002).

1.4. Cultura de Tecidos Vegetais e Produção de Metabólitos Secundários

A cultura de tecidos vegetais é a técnica de cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais em um meio nutritivo e na ausência de micro-organismos. O cultivo de tecidos vegetais *in vitro* pode minimizar os efeitos de variação de fatores ambientais, bem como pode-se alcançar um maior controle sobre as condições de temperatura, luz e nutrientes. Como resultado disso, a produção de compostos de valor econômico torna-se viável (SEABROOK, 1980 *apud* YUNES & CALIXTO, 2001).

A cultura de plantas *in vitro* permite avaliar o desempenho das culturas sob determinadas condições, de tal modo que é possível avaliar o papel de diversos agentes sobre vários aspectos da fisiologia do desenvolvimento vegetal. Assim sendo, é possível trabalhar com quantidades significativas de plantas, em espaço limitado, e em tempo relativamente menor quando comparado às condições de cultivo de campo (SILVA, 2007).

Pelo fato das plantas trabalhadas serem geneticamente padronizadas, ainda segundo Silva (2007), pode-se eliminar a interferência da variabilidade genética nos resultados. Consequentemente, os resultados obtidos são efeitos das variáveis introduzidas no processo pelo experimentador.

A cultura de células vegetais consiste na indução e proliferação de células a partir de um fragmento de planta em presença de substâncias nutrientes e reguladores do crescimento vegetal. As células vegetais apresentam totipotência, ou seja, cada célula em cultura retém

informações genéticas e são capazes de produzir componentes químicos. Dessa forma, podem produzir os mesmos compostos ou compostos similares àqueles presentes na planta ou, ainda, compostos de interesse poderão estar ausentes (RAO & RAVISHANKAR, 2002; ARIKAT *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, os métodos de cultivo *in vitro* vêm sendo aplicados com sucesso em plantas medicinais, com o uso da micropropagação, da cultura de calos e da cultura de células em suspensão, como alternativa para a obtenção de substâncias de interesse farmacêutico, cosméticos e alimentar (VANISREE *et al.*, 2004).

A micropropagação viabiliza a produção vegetal quando há dificuldades nos mecanismos naturais de reprodução, bem como a preservação de espécies ameaçadas de extinção e a manutenção de coleções ativas ou de bases de germoplasma vegetal, sendo o único recurso da cultura de tecidos vegetais que tem documentado, de forma efetiva, a possibilidade de produzir espécies de interesse em larga escala (GEOGE, 1993; HONDA *et al.*, 2001; WALIA *et al.*, 2003; GIRI *et al.*, 2004; HIREGOUDAR *et al.*, 2005).

As alternativas para se definir um protocolo de micropropagação variam de acordo com a espécie, tipo de explante e, principalmente, com o objetivo do trabalho. A micropropagação pode ser conduzida por meio da proliferação de gemas apicais ou axilares, de gemas adventícias, por organogênese direta ou indireta, ou por embriogênese somática direta ou indireta. Entretanto, apesar da possibilidade da produção de um grande número de plantas geneticamente idênticas, são observados, em alguns casos, alterações fenotípicas e genotípicas, sobretudo em plantas regeneradas a partir de calos. Por essa razão, deve-se selecionar um meio que propicie a multiplicação direta de novos brotos, visando a estabilidade genética. Particularmente, no caso de plantas de interesse medicinal, a micropropagação tem sido indicada para a obtenção de clones de genótipos produtores de compostos bioativos (SATDIVE *et al.*, 2005; FRANÇA, 2004).

A produção de grandes quantidades de substâncias naturais depende de bioacumulação e envolve uma integração complexa entre biossíntese, transporte, armazenagem e degradação, em um ambiente celular especializado. Esse trabalho biológico, controlado *in vitro* por intermédio da cultura de células, tecidos e micro-organismos, permite descobrir sistemas de bioprodução, com fornecimento amplo e contínuo, afastar fatores ambientais (clima, pragas, fenômenos geográficos e sazonais) e padronizar qualidade e rendimento (BRAZ FILHO, 1994).

O sistema de cultura de células de plantas representa uma fonte renovável de valiosas combinações medicinais, de sabores, fragrâncias e corantes, que não podem ser produzidos por células microbianas ou por síntese química. O aumento da importância comercial dos metabólitos secundários, atualmente, tem resultado em um grande interesse no metabolismo secundário e, particularmente, na possibilidade de alterar a produção dos metabólitos bioativos das plantas medicinais por meio da cultura de células. Uma vantagem dessa tecnologia é que ela pode prover, principalmente, uma fonte contínua de fitoterápicos seguros, e ainda poder ser usada em cultura de plantas em larga escala, das quais esses metabólitos podem ser extraídos. Além da importância na descoberta de novos medicamentos, a tecnologia de cultura de tecidos desempenha um papel significativo no aumento da resistência a patógenos e condições ambientais e climáticas adversas, além de ser uma fonte contínua de metabólitos de interesse (SILVA, 2007).

A biotecnologia proporciona a oportunidade de utilizar, por meio da cultura *in vitro*, células, tecidos, órgãos ou até mesmo o organismo, manipulando-os geneticamente para obter as substâncias desejadas (RAO & RAVISHANKAR, 2002; VERPOORTE & MEMELINK, 2002).

Em alguns casos tem se conseguido a produção de biomoléculas via cultura de células em escala industrial. É o caso da schinonina, berberina e taxol ou, ainda, para biomassa, como no caso de raízes de ginseng (LOURENÇO, 2003). Entretanto, para muitos fármacos de

interesse, a produção é muito baixa ou quase nula. Isso é geralmente devido ao fato de que a produção é controlada de uma maneira específica no tecido. Desta forma, a desdiferenciação resultaria na perda da capacidade de produção. Por isso, muitos estudos estão sendo feitos na tentativa de aperfeiçoar os meios de crescimento e produção ou, ainda, a seleção de linhagens de células mais produtivas. Além destas, outras abordagens como, por exemplo, o crescimento de células diferenciadas (cultura de raízes e brotos) e a indução de rotas biossintéticas com a utilização de estimuladores, são estratégias que têm mostrado excelentes resultados dentro da cultura de tecidos vegetais (LOURENÇO, 2003).

A produtividade da cultura, ainda segundo o autor, é um fator crítico para a aplicação prática da cultura de células vegetais na produção de metabólicos bioativos específicos de plantas. Daí a necessidade de alternativas para intensificar a produção.

1.4.1. Estimuladores

Estimuladores são substâncias ou tratamentos que induzem as plantas a sintetizarem fitoalexinas em níveis elevados (EILERT & CONSTABEL, 1986; FUNK *et al.*, 1987; TANI *et al.*, 1992). O efeito dos estimuladores depende de muitos fatores tais como a sua concentração, o estágio de crescimento da cultura no momento da estimulação e o período de exposição da cultura ao estimulador.

Os estimuladores podem ser divididos em duas classes: os de origem não biológica, denominados agentes abióticos, tais como metais pesados e luz ultravioleta, e os de origem biológica, denominados agentes bióticos, tais como material de parede de fungos ou enzimas microbianas (BHAGWATH & HJORTSO, 2000).

O mecanismo de ação entre os estimuladores bióticos e abióticos é distinto e complexo, existindo muitas hipóteses com relação ao modo de ação de cada tipo; assim, o efeito dos eliciadores sobre as células ou tecidos vegetais ainda não é totalmente conhecido (LOURENÇO, 2003). Eliciação é o ato de eliciar, ou seja, de fazer sair, de expulsar. É postulado que sinais, tais como a presença de eliciadores, interagem com receptores de membrana celular, o que dá início à via biossintética do ácido linolênico e culmina na produção do ácido jasmônico. O ácido jasmônico e o ácido salicílico, por exemplo, têm sido utilizados como eliciadores na produção de metabólitos secundários. O ácido jasmônico modula a expressão de genes R específicos, relacionados com a defesa vegetal (CREELMAN & MULLET, 1997).

Um processo semelhante, continuam os autores, ocorre no caso de herbivoria. Quando algum órgão da planta sofre lesão, suas células liberam a sistemina, um polipeptídeo com ação hormonal, que será reconhecido por receptores em células de outras partes do vegetal. Esse reconhecimento dá início a biossíntese da molécula sinalizadora que ativará a expressão de genes que codificam os inibidores de proteases.

Quando uma planta sobrevive à infecção por um patógeno em um sítio, ela desenvolve o aumento da resistência a ataques subsequentes ao longo da planta e adquire proteção contra uma gama extensiva de espécies de patógenos. Esse fenômeno, chamado resistência sistêmica adquirida (SAR), desenvolve-se alguns dias após o início da infecção (RYALS *et al.*, 1996).

Shulaev *et al.* (1997) creem que o ácido salicílico esteja envolvido na indução de SAR, porém afirmam que este seria um sinal imóvel. Assim, atribuem essa função ao salicilato de metila, que agiria como um sinal volátil, podendo ser transmitido a partes distantes da planta e até a partes adjacentes.

Já Ebel & Mithofer (1998) acreditam que o ácido salicílico e a sistemina possam ser componentes de sinalização que apresentam alguma mobilidade. E que o salicilato de metila, um éster derivado do ácido salicílico, apresentaria várias funções em potencial: representaria

um composto de sinalização envolvido na reação de defesa no local da infecção e atuaria na potencialização das respostas de defesa e na ativação de SAR.

Os vegetais liberam no ambiente uma grande variedade de metabólitos primários e secundários a partir de folhas e raízes em decomposição. Esses compostos podem exercer efeitos alelopáticos sobre espécimes adjacentes. Os alelopáticos frequentemente citados são fenilpropanóides simples e derivados do ácido benzóico, como o ácido salicílico, que é um regulador do crescimento vegetal e que está envolvido na resistência sistêmica a patógenos vegetais (INDERJIT *et al.*, 2002).

Os jasmonatos têm um importante papel no processo de transdução de sinais que regulam os genes de defesa nas plantas. Por isso eles estão sendo utilizados como agentes estimuladores de metabólitos secundários em cultura de células vegetais. Assim, o perfil de concentrações transientes de vários metabólitos secundários mudou drasticamente em resposta à estimulação (GUNDLACH *et al.*, 1991; DITTRICH *et al.*, 1992).

O limitado fornecimento de Paclitaxel[®], uma importante droga natural anticancerígena, que é extraída das plantas do gênero *Taxus*, desencadeou um intenso esforço na busca de novas fontes e meios alternativos de produção dessa molécula. Taxanos produzidos por células de *Taxus* spp. podem ser usados como material de partida para a semisíntese desses compostos (DONG & ZHONG, 2001). O acúmulo de um taxano (taxuyunnanina C), em suspensões celulares de *Taxus chinensis*, foi ampliado após estimulação com metil jasmonato (MeJa) ou dihidrometil jasmonato (HMeJa), principalmente quando associado à sacarose (DONG & ZHONG, 2001).

Alguns jasmonatos (metil jasmonato e ácido jasmônico) têm mostrado efeito positivo também no aumento da produção de antocianinas em cultura de células. O acúmulo de antocianinas em suspensões celulares de *Vitis vinífera* foi aumentado em cerca de oito vezes quando as culturas foram estimuladas pela adição de ácido jasmônico e irradiadas com luz

contínua (ZHANG *et al.*, 2002). Dessa forma, a luz apresenta-se também como um importante agente controlador da biossíntese de antocianinas, tendo exibido significativa influência no acúmulo dessas moléculas por culturas de células de *Centaurea cyanus* (KAKEGAWA *et al.*, 1987), *Daucus carota* (TAKEDA, 1990) e *Perilla frutescens* (ZHONG *et al.*, 1993).

A utilização de estimuladores biológicos também tem apresentado resultados promissores. O fungo *Alternaria alternata* intensificou a produção da enzima fenilalanina amônia-lyase (PAL), levando a um acúmulo maior de fenilpropanóides, quando aplicados em plantas de *Citrus* (CASTAÑEDA & PÉREZ, 1996).

A eliciação de plântulas de *Murraya paniculata* com o fungo endofítico *Aspergillus flavus* mostrou que a planta intensifica seu metabolismo secundário no sentido de acumular cumarinas já existentes, principalmente 24 horas após a estimulação (PEREIRA *et al.*, 2002).

Um exemplo importante a citar é o de *Catharanthus roseus*, cujos alcalóides indólicos vimblastina e vincristina são substâncias importante no tratamento de câncer e a ajimalicina, utilizada no tratamento de doenças relacionadas ao sistema circulatório. As primeiras moléculas são encontradas na planta em baixas concentrações (0,0005%). A rota metabólica é longa, envolvendo mais de 20 passos com diferentes enzimas, dificultando a produção desses metabólitos por síntese. A produção, em larga escala, de células em suspensão, tem sido apontado como uma solução viável para contornar o problema de baixa produtividade das moléculas, assim como de outras substâncias de interesse farmacológico (DICOSMO & MISAWA, 1995).

A produção de metabólitos secundários pode aumentar ou diminuir quando a composição do meio de cultura é alterada, especialmente quando a modificação se dá na concentração e natureza dos compostos com nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, reguladores de crescimento, fonte de carbono e quando são adicionadas substâncias que interferem na rota metabólica do composto de interesse. A adição de 1,0 mM de ácido

acetilsalicílico (AAS) em cultura de células de *Catharanthus roseus* por 72 hs, promoveu um aumento no teor de alcalóides na ordem de 160%; 20 mM aumentou os fenólicos em 1587% e as furanocumarinas aumentaram em 612% quando 10 mM de AAS foi adicionado ao meio (GODOY & LOYOLA, 1997).

1.5. A Espécie Vegetal

Neste projeto foi estudada a espécie botânica nativa da Amazônia e de uso medicinal *Picrolemma sprucei* Hook.f. (SIMAROUBACEAE).

1.5.1. Descrição botânica

Picrolemma sprucei Hook. f. (sinonímia *P. pseudocoffea* Ducke) é um arbusto nativo da Região Amazônica. O nome caferana (café-rana ou café falso, na linguagem regional) se deve à semelhança desta com o cafeeiro (*Coffea arábica* L., RUBIACEAE). Isso é verdade, em especial, no período de frutificação, quando a caferana (Figura 1.3) produz frutos verdes que se tornam alaranjados e, posteriormente, avermelhados ao amadurecerem em cacho localizado na ponta do caule (AMORIM & POHLIT, 2006).



Figura 1.3 –*Picrolemma sprucei*

1.5.2 – Classificação taxonômica

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Classe: Eurosids II

Ordem: Sapindales Dumort (1829)

Família: Simaroubaceae DC. (1811)

Gênero: *Picrolemma*

Espécie: *P. sprucei* Hook.f.

1.5.3. Distribuição geográfica

Picrolemma sprucei Hook. f. é um arbusto nativo e extensamente distribuído na região Amazônica (Figura 1.4). Ela apresenta distribuição na cidade de Manaus – AM e seus arredores. Dentre essas áreas, o campus da UFAM foi o local de coleta da espécie para este trabalho (Figura 1.5)

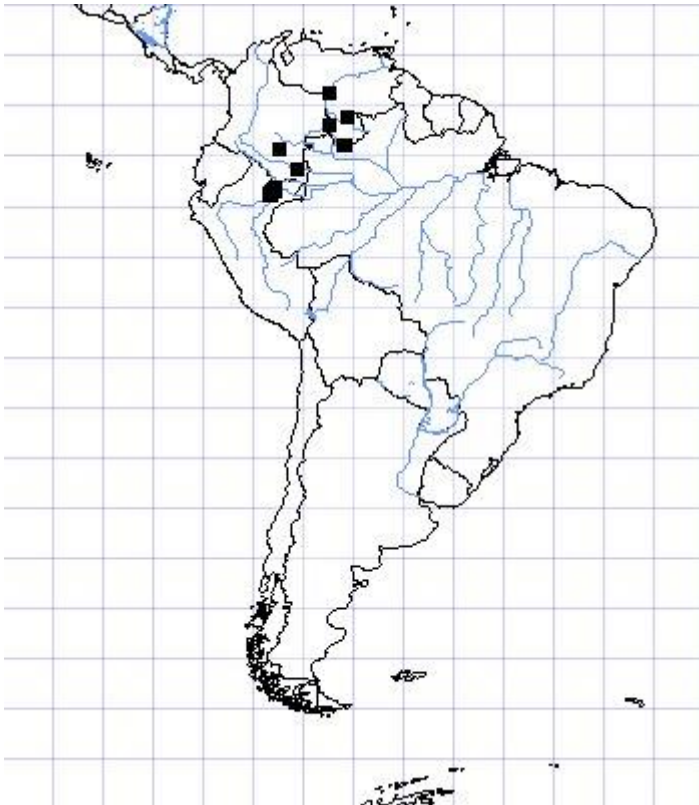


Figura 1.4 – Mapa de distribuição de *P. sprucei* Hook. f.
Fonte: <http://www.mobot.org>. (2008)

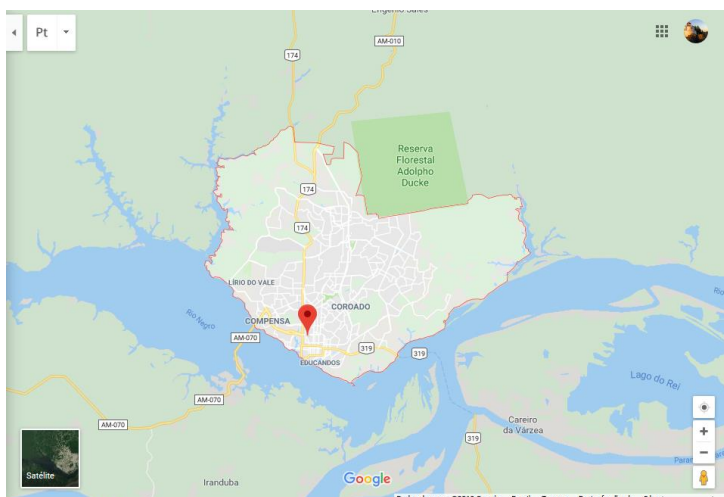


Figura 1.5 –Mapa da cidade de Manaus e indicação do local de coleta da espécie vegetal (campus da UFAM).

1.5.4. A família SIMAROUBACEAE

A família Simaroubaceae é constituída por aproximadamente 32 gêneros e 200 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, está representada pelos gêneros *Quassia* e *Picrolemma*, na região Amazônica; *Castela* e *Picrasma*, no sul do país; *Simaba* e *Simarouba* em quase todas as regiões brasileiras (HALL *et al.*, 1983 *apud* ALMEIDA *et al.*, 2007).

As Simaroubaceae geralmente se apresentam como árvores ou arbustos, tendo como característica marcante um sabor bastante amargo em seu córtex. Assim, muitas espécies dessa família (*Quassia amara*, *Picrasma excelsa*, *Jamaica quassia*) são conhecidas há mais de um século, por conterem substâncias amargas, denominadas de “quassina”, nome emprestado a toda essa classe de compostos estruturalmente relacionados, denominada quassinóides (POLONSKY, 1973 *apud* ALMEIDA, 2007).

A família Simaroubaceae é frequentemente relacionada com as famílias Rutaceae, Meliaceae e Burseraceae. Dentro deste grupo, está mais próximo à família Rutaceae no que se refere à composição química, anatomia da madeira, ausência de vasos condutores de resina na casca e estames livres; diferenciando-se apenas pela ausência de cavidades secretoras de óleos aromáticos nas folhas e partes florais (FERNANDO & QUINN, 1992) e a presença de quassinóides exclusivamente na família Simaroubaceae (THOMAS, 1990).

1.5.5. Aspectos morfológicos

Picrolemma sprucei Hook. f. é um arbusto que atinge até 2,5 m de altura com folíolos cartáceos simétricos, verde-escuros e brilhantes (Figura 1.6). Quando em inflorescência, apresentam flores de pétalas alaranjadas e estames amarelos. Os caules são ocos e frequentemente habitados por formigas. Os frutos são apocárpicos e quando maduros são de cor alaranjada (SARAIVA *et al.*, 2003). A raiz central é espessa e penetrante (RIBEIRO *et al.*, 1999).

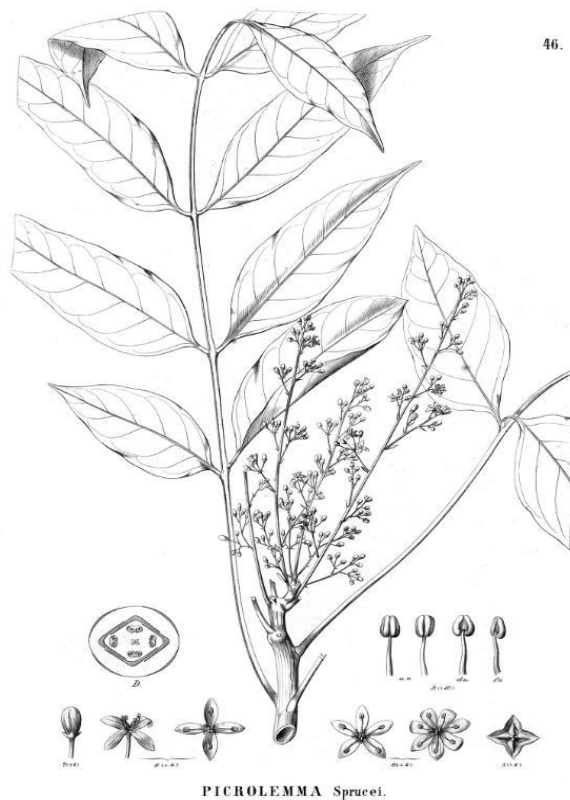


Fig. 1.6 – Aspectos morfológicos de *P. sprucei* Hook f.
 Fonte: <http://images.mobot.org/viewer> (2008).

1.5.6. Princípios ativos, relatos de uso e atividades biológicas

O preparo do chá por infusão, utilizando-se 2 colheres de sopa de hastes e raízes de caferana, picadas ou esfareladas, em 1 litro de água fervente e a ingestão de 4 a 5 xícaras do chá morno, sem adoçantes, diariamente, pelo tempo necessário é indicado para a cura de infestação por protozoários (Ameba e Giardia) na publicação “Farmácia Verde: remédios à base de plantas nativas e exóticas do Amazonas”, patrocinada pelo Governo do Estado (SILVA, 2003).

De acordo com FERREIRA (2000) *apud* SARAIVA *et al.* (2003), o uso popular da caferana é bastante difundido no Estado do Amazonas, especialmente na região de Manaus, onde é comum encontrar pedaços do caule da planta sendo comercializados como antimalárico e febrífugo no Mercado Municipal Adolpho Lisboa.

SARAIVA, (2001) isolou os quassinóides isobruceina B e neosergeolida a partir de *P. sprucei* conforme descrito previamente por MORETTI *et al.* (1982) e VIEIRA *et al.* (2000) *apud* SARAIVA (2001), respectivamente, e suas presenças em infusões aquosas à quente do caule e das raízes desta planta foram estabelecidas com o uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Nunomura *et al.* (2006) publicaram um trabalho que teve como objetivo explorar as propriedades antihelmínticas dos extratos de *P. sprucei*, bem como os quassinóides isolados isobruceina B e neosergeolida em *Haemonchus contortus*, um nematoide gastrointestinal encontrado nos carneiros e outros animais.

1.6. Quassinóides

Os quassinóides constituem uma classe de substâncias encontradas quase que exclusivamente em plantas da família Simaroubaceae e, quimicamente, são considerados triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação, apresentando uma ampla faixa de atividade biológica (POLONSKY, 1985 *apud* ALMEIDA, 2007).

A existência de substâncias com sabor amargo na madeira da espécie *Quassia amara*, nativa das Guianas Francesas, foi primeiramente registrada na literatura em 1835 e, como a maioria das substâncias naturais isoladas de plantas no século XIX, só teve sua estrutura elucidada muitos anos mais tarde, em função do desenvolvimento de técnicas experimentais de

análise estrutural (POLONSKY, 1985 *apud* ALMEIDA, 2007). O primeiro isolamento de quassinóides foi em 1937 e, em 1950, a *Quassia amara* teve seus constituintes majoritários caracterizados como quassina e neoquassina (Figura 1.7).

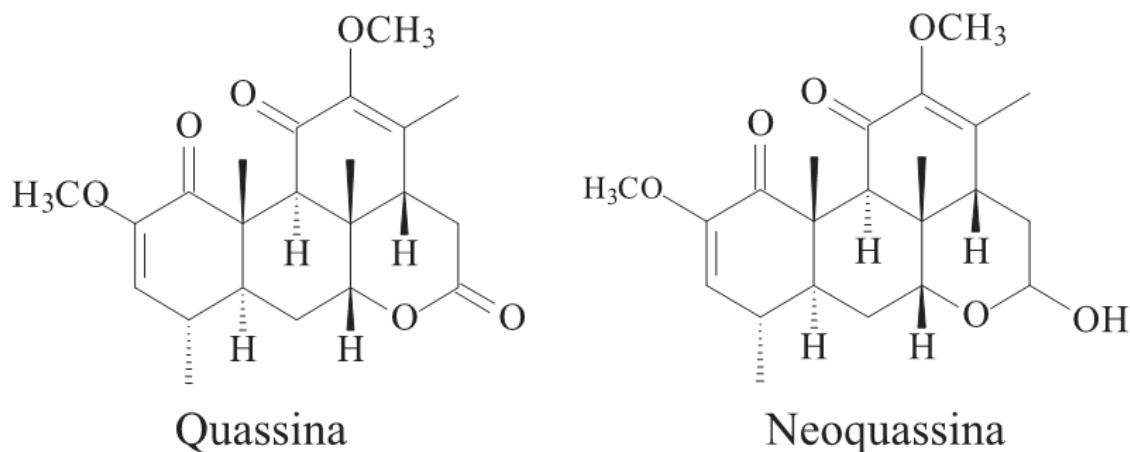


Figura 1.7 – Estrutura de quassina e neoquassina.

Estruturalmente, os quassinóides podem ser classificados em diferentes grupos, de acordo com seus esqueletos básicos: C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₂ e C₂₅, sendo que a grande maioria se apresenta com esqueleto básico do tipo C₂₀, onde se inclui a quassina (Figura 1.7). Tais substâncias naturais são derivadas de triterpenos da série eufotirucalol, em sua grande maioria altamente oxigenados, contendo lactonas em seus esqueletos básicos e, eventualmente, possuindo mais que uma ligação dupla. Apresentam diferentes grupos funcionais oxigenados em seus esqueletos, com exceção das posições C-5, C-9 e dos grupos metilas nas posições C-4 e C-10 (POLONSKY, 1985 *apud* ALMEIDA, 2007).

Estes compostos compreendem um grupo de substâncias naturais quase que exclusivo de espécies das Simaroubaceae, podendo, assim, ser considerado marcador taxonômico desta família (NUNOMURA *et al.*, 2006).

A presença ou ausência de quassinóides levou alguns gêneros a serem excluídos da família, sendo este um importante parâmetro de classificação taxonômica de Simaroubaceae.

Rodríguez-Gamboa *et al.* (2001) relatam o exemplo do gênero *Picramnia*, excluído das Simaroubaceae em 1995 e incluído em uma nova família chamada Picramniaceae, após alguns estudos fitoquímicos.

Almeida (2007) relata um levantamento de atualização bibliográfica sobre a ocorrência dos quassinóides durante dez anos (de 1994 a 2005), que resultou em dados onde constam espécies, estruturas químicas e nomes vulgares a partir das quais foram isolados quassinóides. Quando se comparou a ocorrência de esqueletos básicos nas diversas espécies de Simaroubaceae, comprova-se a predominância do esqueleto C₂₀, uma vez que, de 25 espécies estudadas, 16 delas (*A. altissima*, *A. vilmoriniana*, *B. amarissima*, *B. antidysenterica*, *C. peninsulares*, *C. texana*, *E. harmandiana*, *P. ailanthoides*, *P. javanica*, *P. crenata*, *P. quassioides*, *P. pseudocoffea*, *Q. amara*, *Q. sp. aff. bidwillii*, *S. orinocensis*, *S. versicolor*) apresentavam somente este tipo estrutural. O esqueleto C₁₉ aparece em um número bem menor de espécies, destacando-se em ordem decrescente de ocorrência, principalmente, as espécies *S. subcymosa* (100%), *S. cedron* (80%), *A. excelsa* (66,7%), *E. longifolia* e *A. malabarica* (50%). A ocorrência de C₁₈, C₂₂ e C₂₅ apresenta-se consideravelmente reduzida nas espécies estudadas, já que o esqueleto C₁₈ aparece somente em *E. longifolia*; C₂₂ é evidenciado apenas em *P. sprucei* e compostos C₂₅ ocorrem somente em *Q. indica*.

Outra constatação interessante nesse levantamento foi a ocorrência do quassinóide cedifilina na espécie *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae) (MULHOLLAND *et al.*, 2003 *apud* ALMEIDA, 2007), bem como da quassimarina e da simalikalactona D na *Leitneria floridana* (Leitneriaceae) (XU *et al.*, 2000 *apud* ALMEIDA *et al.*, 2007), os quais foram os primeiros registros fora da família Simaroubaceae.

1.6.1. Atividade biológica

Os quassinóides, que são os princípios ativos amargos da família Simaroubaceae, apresentam diversas atividades biológicas que veem sendo cientificamente comprovadas ao longo dos últimos 30 anos.

Já na década de 1970, Kupchan e colaboradores (KUPCHAN *et al.*, 1975), demonstraram que quassinóides isolados de *Brucea antidysenterica* apresentavam potente atividade antileucêmica. *Brucea antidysenterica* Mill. é uma árvore da família Simaroubaceae usada na Etiópia para tratar o câncer. Os autores demonstraram que o extrato alcoólico da planta apresentou atividade inibitória *in vitro* significativa contra células de carcinoma humano da faringe (KB), contra células de carcinosarcoma intramuscular de camundongos (Walker 256) e contra células de leucemia (P-388) de ratos (PS).

Alguns anos mais tarde, pesquisadores da Guiana Francesa e da França (POLONSKY *et al.* 1984) relatam o isolamento e elucidação de um novo quassinóide antileucêmico a partir do extrato das folhas de *Picrolemma pseudocoffea*, identificado como 15-desacetilsergeolida. A 15-desacetilsergeolida, que parece ser menos tóxica que a sergeolida, mostrou potente atividade *in vivo* em células de leucemia murina P-388.

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) desenvolveu um programa de prospecção de drogas antitumorais *in vitro* orientado a partir de células da doença humana com sessenta linhagens de células tumorais humanas que representam sete tipos de câncer: colo, melanona, renal, ovário, sistema nervoso central e leucemia. Tischler e colaboradores (Tischler *et al.*, 1992) exploraram a prospecção prévia do NCI para selecionar, priorizar e guiar o fracionamento de extratos de produtos naturais. Uma avaliação nos extratos brutos aquoso e apolar de várias árvores Simaroubaceae previamente estudadas, levou à *Cedronia granatensis* Cautrec, coletada na Colômbia, que revelou a atividade desejada. O fracionamento guiado tanto

do extrato bruto orgânico quanto do bruto aquoso derivado de folhas resultou nos quassinóides sergeolida e isobruceina B como substâncias ativas.

Os extratos orgânico e aquoso exibiram padrões similares na prospecção primária. Eles foram potentes com algumas linhagens de células de melanoma, colo e pulmão, mostrando resposta no nível de CL_{50} com concentrações dos extratos na faixa de 9-50 $\mu\text{g/mL}$. Dos dois compostos, a sergeolida foi a mais potente, com concentrações de 10^{-7} a 10^{-8} M.

Em 1994, pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) e da Universidade de São Paulo em São Carlos (USP São Carlos) isolaram e identificaram um novo quassinóide, denominado neosergeolida, obtido a partir de extrato diclorometano de folhas e caule de *P. pseudocoffea*, coletada na Amazônia brasileira (ZUKERMAN-SCHPECTOR & CASTELLANO, 1994).

OKANO *et al.* (1995) relatam testes com vários quassinóides isolados de Simaroubaceae como potenciais agentes antitumorais, por meio de teste que avalia o efeito promotor dessas substâncias a agentes antitumorais. Foram avaliados 45 quassinóides. Sendo que 15 foram isolados de *B. javanica*, 16 de *B. antidysenterica* e 14 de *P. ailanthoides*. Desse total, 10 quassinóides, todos isolados de *B. antidysenterica*, mostraram ser os mais potentes. Todos esses compostos são gliconas com grupos C=O e OH em um dos anéis, uma ponte – CH₂O – entre C₈ e C₁₃ e uma ligação éster no C₁₅. Por outro lado, dos 11 compostos menos potentes, 10 foram isolados de *P. ailanthoides*. Eles não possuem nem a ponte – CH₂O – entre C₈ e C₁₃ e, tampouco a ligação éster no C₁₅, mostrando algumas relações entre estrutura-atividade das moléculas. Essas informações foram confirmadas mais tarde quando Rahman e colaboradores (RAHMAN *et al.*, 1997) publicaram a mesma atividade inibitória em alguns derivados semissintéticos de quassinóides, também relacionando a estrutura das moléculas com sua respectiva atividade inibitória.

Já em 2004, outra equipe de pesquisadores publica resultados de citotoxicidade de quassinóides contra células cancerígenas multirresistente a drogas (MURAKAMI *et al.*, 2004). Foram isolados vinte e três quassinóides de plantas da família Simaroubaceae, e avaliados quanto à citotoxicidade contra três linhagens de células cancerígenas multirresistentes a drogas (KB-VIN, KB-7d e KB-CPT). Nove substâncias mostraram significativa citotoxicidade nas três linhagens de células. Cinco moléculas demonstraram significativa atividade contra as linhagens KB-7d e KB-CPT e um quassinóide revelou atividade notável somente contra as células KB-7d. As relações estrutura-atividade foram desenhadas baseadas nestes dados.

A síntese de proteínas surgiu como um alvo interessante na intervenção quimioterápica (FUKAMIYA *et al.*, 2005). Vários estudos, de acordo com os autores, indicam que a não regulação da síntese de proteínas é um dos principais contribuidores da iniciação do câncer e da progressão da metástase. Recentemente, a quimioresistência *in vivo* tem também sido ligada à iniciação da tradução desregulada. Em um cenário transformado, onde a tradução pode ser iniciada por uma pequena molécula moduladora, a diminuição das taxas de tradução permite a reversão da quimioresistência, provavelmente por permitir a reorganização da rota metabólica da apoptose (WENDEL *et al.*, 2004 *apud* FUKAMIYA *et al.*, 2005).

Uma classe de inibidores de síntese de proteínas que têm sido utilizada por seu potencial quimioterapêutico é a dos quassinóides. Por exemplo, a bruceatina (bruceatina) é um quassinóide isolado do caule de *Brucea antidysenterica* Mill (Simaroubaceae), guiado por testes de avaliação da citotoxicidade contra células de leucemia murina P-388. A molécula aumenta o tempo médio de sobrevivência de camundongos com células P-388 de leucemia murina, células B16 de melanoma, células 38 de tumor do colo e células L-1210 de leucemia (KUPCHAN *et al.*, 1973, 1975 *apud* FUKAMIYA *et al.*, 2005). A bruceatina inibe a síntese de proteínas em extratos preparados de eucariotos, mas não inibe extratos de *E. coli*. *In vivo*, a síntese de proteínas é reduzida entre 50-90% em concentrações de 30 e 400 nM,

respectivamente, durante a primeira hora de exposição a bruceatina. Nenhum efeito na síntese de RNA é observado *in vivo*, mas a síntese de DNA é reduzida em 60% a uma concentração de 80 nM (LIAO *et al.*, 1976 *apud* FUKAMIYA *et al.*, 2005).

Pesquisadores franceses publicaram um levantamento etnobotânico sobre o uso de medicamentos antimaláricos (VIGNERON *et al.*, 2005) na Guiana Francesa. E, de acordo com seus relatos, a Guiana Francesa é severamente atacada por endemias de malária. Estima-se ser um dos países sul-americanos onde existem as mais altas taxas de incidências da doença, junto com Guiana e Suriname. A cada ano, continuam, entre 3500 e 5000 casos de malária são registrados. O fato de a malária atingir os povos mais pobres do planeta, e de que muitos deles tratam-se com ervas por serem mais disponíveis e acessíveis, prova a urgência de programas antimaláricos em detectar remédios locais com maior eficácia. Para responder várias perguntas sobre o uso de plantas para tratar a doença, para documentar os conhecimentos tradicionais e para detectar plantas com atividade biológica promissora, os pesquisadores aplicaram um questionário a 117 pessoas. O resultado do levantamento mostra *Picrolemma pseudocoffea* como uma das plantas utilizadas contra a malária, citada tanto no uso preventivo quanto para tratar a doença.

Ainda em 2005, parte da equipe de pesquisadores anteriormente citada e outros mais publicaram uma avaliação dos medicamentos antimaláricos tradicionais da Guiana Francesa (Bertani *et al.*, 2005). Com o objetivo de avaliar o potencial antimalarial de medicamentos tradicionais usados na Guiana Francesa, 35 medicamentos foram preparados em sua forma tradicional e testados quanto a sua atividade esquizonticial sanguínea *in vitro* em cepas resistentes a cloroquina (W2), além de testes *in vivo* também. *Picrolemma pseudocoffea* foi ativa tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Contra o *Plasmodium falciparum*, ela mostrou a melhor atividade (CI₅₀ = 1,43 µg/mL) e inibiu 78% do crescimento do parasita *in vivo* a 95 mg/kg. Ela foi quase tão ativa quanto *Cinchona officinalis in vivo* com uma dose cinco vezes menor. Muito

bem conhecida na Guiana Francesa, todas as partes da pequena árvore têm uma forte reputação como sendo um efetivo antimalarial, mas, também, alguns informantes declaram que todas as partes da planta são muito tóxicas. É bem recomendado não ultrapassar a dose nem ministrar a crianças (MORETTI, 1986 *apud* BERTANI *et al.*, 2005). De acordo com algumas pessoas, esta planta poderia ser usada de forma preventiva para evitar crises de malária. Porém, os testes feitos pelos autores não confirmaram esta informação: folhas de *Picrolemma pseudocoffea* não demonstraram nenhuma atividade no estágio intra-hepático do *Plasmodium*. Fandeur *et al.* (1985) isolaram quassinóides de raízes, caule e folhas de *Picrolemma pseudocoffea*. Eles alegaram que a sergeolida era a responsável pelas propriedades e mostraram que a CI_{50} variou entre 0,002 e 0,006 $\mu\text{g/mL}$ *in vitro* e 0,21 mg/kg/d *in vivo*. Eles também mostraram que esse quassinóide foi muito tóxico com DL_{50} de 1,8 mg/kg em camundongos. Assim, o uso tradicional de *Picrolemma pseudocoffea* foi validado.

Recentemente, equipe liderada pelo Dr. Adrian Pohlit, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), publicou estudo sobre a atividade biológica dos quassinóides neosergeolida e isobruceína B e de dois derivados semissintéticos (1,12-diacetil-isobruceína B e 12 acetil-neosergeolida) isolados de *Picrolemma sprucei* (Silva *et al.*, 2009). Os autores relatam que neosergeolida e isobruceína B exibiram as maiores citotoxicidades contra todas as quatro linhagens de células tumorais humanas testadas – SF295 (glioblastoma), MDA-MBA 345 (melanona), HCT-8 (colo) e HL-60 (leucemia) – ($CI_{50} = 5\text{-}27 \mu\text{g/L}$) e contra a cepa multirresistente a drogas K1 de *P. falciparum* ($CI_{50} = 1,0\text{-}4,0 \mu\text{g/L}$). Relatam também que 1,12-diacetil-isobruceína B foi citotóxico somente contra as células de leucemia (HL-60) ($CI_{50} = 11,8 \mu\text{g/L}$). Os quassinóides neosergeolida e isobruceína B ($CL_{50} = 3,2\text{-}4,4 \text{ mg/L}$) demonstraram maior letalidade que o derivado 12 acetil-neosergeolida ($CL_{50} = 75,0 \text{ mg/L}$) contra as larvas de *A. aegypti*, enquanto 1,12-diacetil-isobruceína B foi inativo. Estes resultados sugerem uma nova aplicação para esses quassinóides naturais como larvicidas.

2 – JUSTIFICATIVA

A malária é a mais importante doença parasitária das regiões tropicais. Atualmente, grandes programas de combate à malária, dirigidos principalmente pela Organização Mundial da Saúde – OMS integram vários aspectos preventivos (mosquiteiros impregnados de inseticidas, educação sanitária) e terapêuticos. Alguns dos fármacos utilizados baseiam-se em moléculas provenientes de plantas medicinais: o quinino e seus derivados, extraídos da casca da árvore sul-americana *Cinchona calisaya*, ou a artemisinina e seus derivados, extraídos da *Artemisia annua*, planta medicinal chinesa.

Ante a extensão da pandemia, a OMS reconheceu a importância das preparações tradicionais antimaláricas como uma das vias de controle da doença nos países do Sul. Esse reconhecimento deve apoiar-se em resultados científicos para certificar a eficácia e a não-toxicidade das preparações em uso (IRD, 2009).

A malária é uma doença que pode ser evitada e curada, desde que se tenha acesso a prevenção e tratamento. Entretanto, em muitos países a maioria da população exposta não pode servir-se dos medicamentos “modernos”, às vezes por viverem em locais isolados, porém, mais frequentemente, devido a problemas econômicos. Assim, recorre muito à farmacopeia local: preparações tradicionais à base de plantas, às vezes administradas em associação com tratamentos convencionais. Mesmo em lugares onde o acesso aos cuidados médicos é eficiente e gratuito, pesquisas do Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento – IRD, demonstraram que os doentes em crise de malária se voltam para um tratamento misto que associa plantas e medicamentos convencionais (IRD, 2009).

Além disso, nas últimas décadas têm-se assistido a um aumento e a uma disseminação da resistência aos fármacos antimaláricos mais comuns, o que se torna ainda mais grave devido ao custo proibitivo de fármacos mais eficazes, para a grande maioria das populações destas áreas. Há

uma necessidade urgente de novos compostos terapêuticos, facilmente acessíveis e de baixos custos. Uma das possíveis fontes destes tratamentos mais acessíveis poderá advir do estudo e desenvolvimento de medicamentos à base de plantas, utilizados localmente na medicina tradicional. De fato, o reconhecimento e a validação, de práticas de medicina tradicional e a procura de agentes terapêuticos derivados de plantas, pode levar ao estabelecimento de novas estratégias no controle da doença (NEBULIS, 2009).

Picrolemma sprucei Hook. f. (Simaroubaceae) é uma importante planta medicinal da Amazônia. A planta e seus princípios ativos são bastante conhecidos em outros países da Amazônia, como a França (Guiana Francesa), onde há registro de diversos trabalhos científicos realizados (AMORIM & POHLIT, 2006). É amplamente distribuída por toda a região, desde o Peru até a Guiana Francesa (POHLIT *et al.*, 2009). Infusões do caule, das raízes e de toda a planta são usadas por toda a região Amazônica no tratamento da malária (MILLIKEN, 2005 *apud* POHLIT *et al.*, 2009), problemas gastrointestinais e verminoses (DUKE & VASQUEZ, 1994 *apud* POHLIT *et al.*, 2009). Em doses mais altas, as infusões de *P. sprucei* são utilizadas para provocar abortos (POHLIT *et al.*, 2009).

Pohlit e colaboradores reportam vários estudos que, de modo geral, dão suporte ao uso de *P. sprucei* na medicina tradicional (POHLIT *et al.*, 2009). Por exemplo, infusões de caule e folhas demonstraram possuir atividade anti-helmíntica *in vitro* (NUNOMURA *et al.*, 2006). Também em testes *in vitro* foi demonstrada a atividade antimalárica do extrato aquoso de *P. sprucei* contra a cepa resistente a cloroquina W2 (BERTANI *et al.*, 2005).

Os quassinóides, substâncias triterpênicas altamente oxigenadas, que caracterizam a família Simaroubaceae, e que estão presentes em extratos e infusões de *Picrolemma sprucei* Hook. f., possuem grande potencial farmacológico, aos quais já foram atribuídos atividade antimalárica, tóxica aguda, antitumoral, citotóxica, antifágica, larvicida/inseticida e fitotóxica (AMORIM & POHLIT, 2006). Elicitar esta espécie com vista a observar o comportamento

metabólito secundário em resposta a esse estímulo é importante para gerar conhecimento que poderá subsidiar o estabelecimento futuro de uma cadeia produtiva para produção desses metabólitos e da própria planta.

3 – Objetivos

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar a produção dos quassinóides isobruceina B e neosergeolida em diversas mudas de *Picrolemma sprucei* Hook. f. e gerar subsídios para a área de cultura de tecidos vegetais e fitoquímica dessa espécie com vistas à sua produção em escala comercial.

3.2 – Objetivos Específicos

- Elicitar as plantas *in vivo* com jasmonato de metila, salicilato de metila e ácido salicílico por 24, 48 e 72 horas, utilizando plantas juvenis mantidas em viveiro e determinar os quassinóides isobruceina B e neosergeolida para avaliar se haverá ou não potencialização da produção desses metabólitos pelas plantas;

- Comparar populações naturais de plantas e fazer a determinação dos quassinóides isobruceina B e neosergeolida nas folhas, caules e raízes para analisar e selecionar indivíduos ou plantas que apresentem maiores concentrações desses princípios ativos;
- Determinar e comparar os quassinóides isobruceina B e neosergeolida de plantas juvenis mantidas em viveiro com os de plantas jovens oriundas de seu habitat natural;
- Determinar os quassinóides isobruceina B e neosergeolida em plantas germinadas e mantidas *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A produção de metabólitos secundários de *P. sprucei* seguiu os passos metodológicos resumidos na figura 4.1 abaixo.

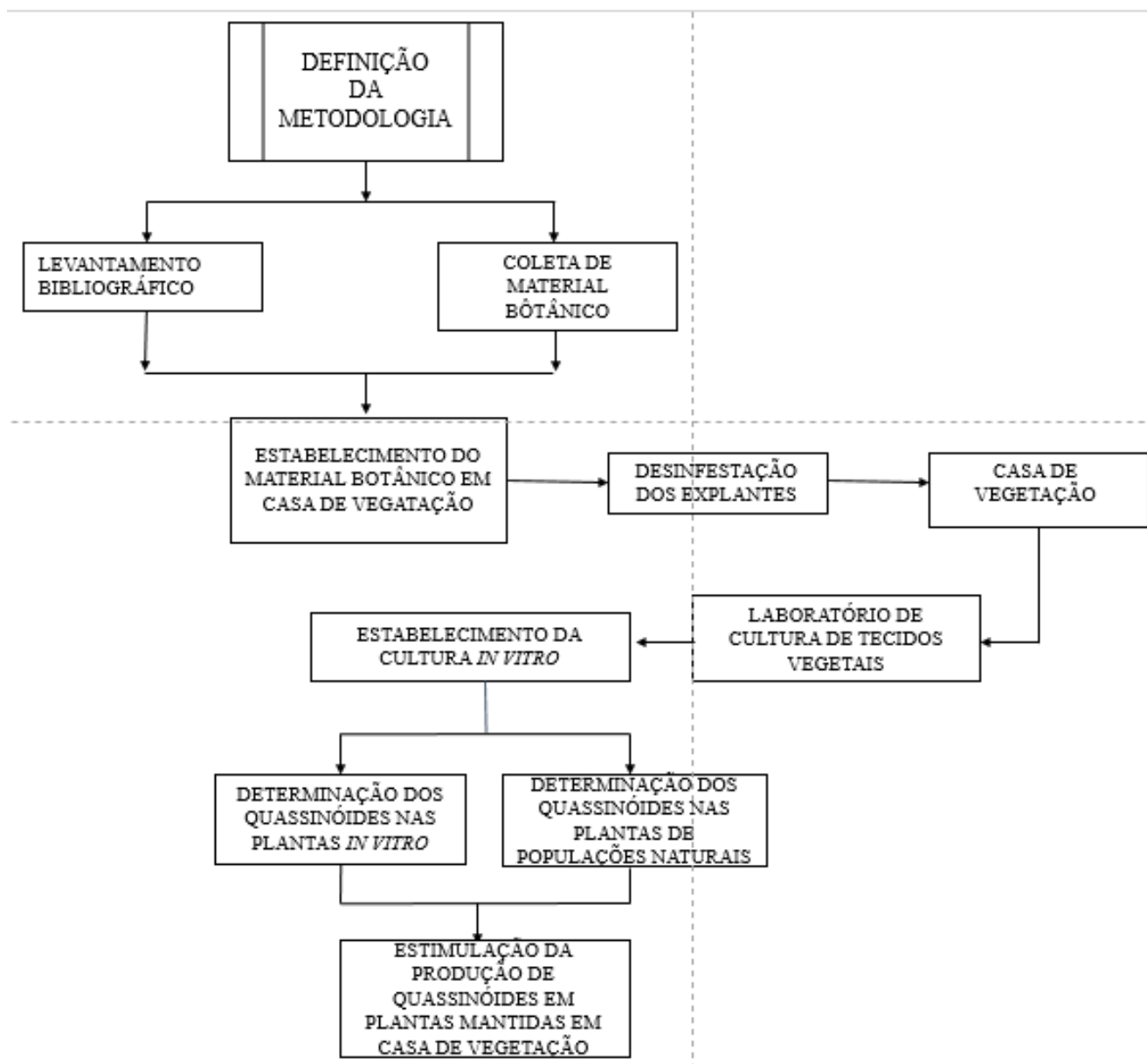


Figura 4.1 – Etapas metodológicas.

4.1. Material Vegetal e Certificação Botânica

Mudas de *Picrolemma sprucei* Hook. f. foram coletadas tanto na Reserva Ducke – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, localizada na rodovia AM 010, km 26, Manaus – AM, quanto no *campus* da Universidade Federal do Amazonas–UFAM, Setores Norte e Sul, onde também foram coletados os seus frutos para retirada das sementes. Foram ainda utilizados frutos cedidos da coleção do Dr. Adrian Pohlit, cuja planta está localizada no *campus* do INPA, ao lado da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais – CPPN. A identificação da espécie coletada foi feita pelo Herbário da Universidade Federal do Amazonas – HUAM, onde foram depositadas as exsicatas do ramo com flor, sob o nº 7294.

4.2. Cultura de Tecidos

4.2.1. Desinfestação

Frutos de *P. sprucei* foram lavados em água corrente por quatro horas e, a seguir, imersos em álcool etílico 95° por cinco minutos. Em seguida, os frutos foram lavados com água destilada e esterilizada e secos em temperatura ambiente, tendo o tegumento e a polpa retirados manualmente, com o auxílio de pinça e bisturi. O material foi imerso em uma solução do fungicida Derosal[®] dissolvido em água (2 g.L⁻¹) por duas horas e depois em álcool 70% por 01 minuto. Ambas as etapas foram seguidas de três lavagens com água destilada. O material foi transferido para Câmara de Fluxo Laminar, onde foram realizados os demais testes de desinfestação. Foram testadas três concentrações de hipoclorito de sódio: 1,5%; 2,5% e 5% e dois tempos de exposição: 5 e 15 minutos. Como os resultados dos testes não foram satisfatórios devido à presença de grande quantidade de bactérias, foi realizado um teste de antibiograma para se definir a sensibilidade dessas bactérias a antibióticos.

4.2.2. Antibiograma

O teste de antibiograma foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas-ICB, da UFAM, conforme descrito por BAUER *et al.*, (1966). Os frascos com os discos foram retirados da geladeira 30 minutos antes de abri-los, para que adquirissem a temperatura ambiente e se evitasse sua umidificação. Com o auxílio de uma alça bacteriológica em platina devidamente flambada e esfriada, foram tocadas 4-5 colônias da bactéria coletada dos tubos de ensaio contendo as sementes de *P. sprucei* após os primeiros testes de desinfestação. As colônias foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Faland. Um swab estéril foi embebido na suspensão bacteriana, comprimindo-o contra a parede do tubo para retirar o excesso, e, em seguida, semeado de forma suave em todas as direções da placa, procurando abranger toda a superfície. Aguardou-se 15 minutos até a superfície do ágar secar. Com auxílio de uma pinça flambada, os polidiscos foram colocados sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão destes. A placa com os discos foi incubada em estufa bacteriologia a 35°C por 24h. Com o auxílio de um paquímetro, foi medido o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco, e, consultada uma tabela, se determinou a que antibiótico a bactéria presente era sensível.

4.2.3. Estabelecimento da cultura *in vitro*

Após o processo de desinfestação, 16 sementes de *P. sprucei* coletadas no campus da UFAM foram inoculadas em meio de cultura de composição salina básica (MURASHIGE & SKOOG, 1962), denominado a partir daqui de meio MS, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1 g.L⁻¹ de derosal®, pH ajustado para 5,8 e solidificado com a adição de 12 g.L⁻¹ de Ágar. O meio foi esterilizado em autoclave a 121° C e 1,1 Kgf.cm⁻², por 20 minutos.

Após a autoclavagem, o meio de cultura foi transferido para Câmara de Fluxo Laminar, onde permaneceu até sua temperatura atingir aproximadamente 60°C. Neste momento, foi adicionado 1,5 mL do antibiótico Timetin® 3,0 g + 0,1 g, da GlaxoSmithKline®, obtendo-se uma concentração final do antibiótico no meio de cultura de 75 µg/100 mL. A seguir, o meio foi transferido para tubos de ensaio (15 x 2,5 cm).

Após inoculação das sementes nos tubos de ensaio, os mesmos foram transferidos para Sala de Crescimento à temperatura de 25±2°C, iluminadas com intensidade luminosa de 2,0 x 10⁷ µE.cm⁻²s⁻², fornecidos por lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85 W) e-fotoperíodo de 16 horas-por um período de quatro meses.

4.3. Elicitação de plantas jovens de *Picrolemma sprucei* com jasmonato de metila (MeJa), salicilato de metila (MeSa) e ácido salicílico (AS)

Este experimento foi realizado na Casa de Vegetação anexa ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais-LCTV-da Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM. Mudanças jovens de *Picrolemma sprucei* Hook. f. mantidas em casa de vegetação, medindo entre 10 e 30 cm de altura, foram tratadas com jasmonato de metila (marca Sigma-Aldrich), salicilato de metila sintético (marca Reagen) e ácido salicílico (marca Reagen), todos grau P.A., por 0, 24, 48 e 72 horas, segundo adaptação do protocolo descrito por RODRIGUEZ-SAONA *et al.* (2001). Foram aplicados 200 µL de uma solução etanólica de jasmonato de metila (10% v/v) em peças de algodão colocadas na altura do colo das plantas. O mesmo procedimento foi utilizado com o salicilato de metila. Já para o ácido salicílico, foram utilizados 180 µL de uma solução deste (1,5 mM), sem a adição de álcool etílico. Logo em seguida, as plantas foram envolvidas por um saco plástico para criar um microclima saturado com os elicitores. Para

evitar a exposição das plantas a temperaturas excessivas, foram feitos dois orifícios em cada lado dos sacos plásticos (Figura 4.2).

O controle experimental (branco) foi feito com algodão + 180 μ L de álcool etílico, colocados sob as mesmas condições de cultivo. Após o tempo estipulado (0, 24, 48 e 72 horas), amostras das plantas foram coletadas para o preparo do extrato.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro indivíduos por tratamento, sendo cada um considerado uma réplica.



Figura 4.2 – Vista do experimento de elicitação de plantas jovens de *P. sprucei* mantidas em casa de vegetação do LCTV – UFAM.

4.4. Avaliação da concentração de quassinóides em plantas jovens por Cromatografia de Camada Delgada/ Fotodensitometria

Foram dosados os quassinóides isobruceína B e neosergeolida de plantas jovens de áreas de regeneração no habitat natural da planta e de plantas jovens mantidas em casa de vegetação elicidadas com MeJa, MeSa e AS. Foram coletados 15 indivíduos para proceder às análises

4.4.1. Reagentes

Os reagentes utilizados neste experimento foram de grau técnico e previamente destilados.

4.4.2. Equipamentos

- Balança analítica, marca Mettler – Toledo, modelo AB204, limite 210 g.
- Lâmpada UV, marca Spectroline, modelo CX-20, *ultraviolet fluorescence analysis cabinet*. Onda longa (365 nm) e onda curta (254 nm) (CPPN/INPA).
- Ultrassom, marca Ultrasonic, modelo USC 1400.

4.4.3. Preparo do extrato metanólico

4.4.3.1. Plantas de regeneração e plantas elicitadas

O preparo do extrato metanólico das plantas de regeneração e das plantas elicitadas foi realizado no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia–LAPAAM, Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais–CPPN, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia–INPA. Folhas, caules e raízes foram cortados, com auxílio de uma tesoura, até terem seu tamanho reduzido para 3-5 mm, sendo separados para cada indivíduo. Este material foi pesado para obtenção de peso fresco e, em seguida, secado em estufa a uma temperatura de $60\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Depois de seco, o material foi esfriado e pesado para obtenção de peso seco.

As amostras de plantas foram colocadas em frascos de 200 mL e submetidas à extração com metanol por três dias em repouso. Uma vez por dia esse material era agitado e colocado em banho de ultrassom por 15 minutos. O extrato metanólico obtido foi filtrado em papel de

filtro, secado em temperatura ambiente por três dias e pesado para obtenção do peso do extrato seco. A seguir, o extrato foi ressolubilizado em 2 mL de MeOH, com utilização do banho de ultrassom.

4.4.3.2. Plântulas *in vitro*

Devido ao reduzido tamanho e massa das plântulas *in vitro*, um protocolo específico de preparo do extrato metanólico foi adotado. O preparo deste extrato foi realizado no Laboratório de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Um total de oito plântulas *in vitro* foi utilizado para o preparo do extrato. Assim como descrito anteriormente, as plantas foram cortadas e separadas em caules, folhas e raízes e, em seguida, pesadas para obtenção do peso fresco. A seguir, foram colocadas em eppendorfs, congeladas e liofilizadas. O material foi pesado para obtenção de peso seco.

Ainda no interior dos eppendorfs, com o auxílio de um tubo de vidro, as amostras foram fracionadas até diminuírem o volume. Em seguida, foram adicionados 1000 µL de uma mistura de metanol/água (9:1) para as amostras de caule e folhas e 500 µL da mesma mistura para as raízes, que apresentavam menor massa. O material foi deixado extraído por três dias, sendo que, uma vez por dia, as amostras foram colocadas durante uma hora no ultrassom. Posteriormente, foi feito um *clean-up* do material utilizando hexano, sendo os extratos reunidos e filtrados em mini filtros antes da injeção.

4.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O sistema de cromatografia líquida utilizado na determinação dos quassinóides isobruceína B e neosergeolida foi constituído de um Cromatógrafo Líquido, marca Shimadzu,

modelo LC-10, com um detector de arranjo de iodo, bomba ternária LC-AO, auto-amostrador SIL-10A e um controlador de sistema CBM-10A (Kyoto, Japão). Uma coluna analítica LC-18 Supelcosil[®] (d. i. 250 mm x 4,6 mm, tamanho das partículas de 5 µm) da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) foi usada na preparação. A fase móvel consistiu de um gradiente de acetonitrila:ácido trifluoroacético aquoso 0,05% liberado em um fluxo de 1 mL.min⁻¹, como segue: incremento da concentração de acetonitrila no eluente (15% em 0 min. e um gradiente linear de até 100% em 30 min.)

4.4.5. Cromatografia de camada delgada (CCD)

4.4.5.1. Preparo da curva de calibração e dos padrões

Foram pesados analiticamente 25 mg de isobruceína B e 25 mg de neosergeolida em balão volumétrico de 10 mL, adicionado 5 mL de metanol, colocado em banho de ultrassom até a completa dissolução da amostra, sendo completado o volume com metanol (solução 2,5 mg.mL⁻¹). Em seguida, foi transferido uma alíquota de 1,0 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com metanol (solução 0,25 mg.mL⁻¹).

4.4.5.1.2. Aplicação das amostras e padrões

Foram utilizadas cromatoplasas Merck (PN 1.05554). Foram mantidas as distâncias de 2,0 cm da borda inferior, 1,5 cm das bordas laterais e 1,5 cm entre as aplicações. Foram aplicados 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 µL da solução padrão de isobruceína (conc. 0,25 mg.mL⁻¹) nas posições 5 a 8, respectivamente.

Foram aplicados 3 μ L das amostras em duplicata alternando as posições da aplicação, isto é, amostra 1 - posições 1 e 9, amostra 2 - posições 2 e 10, amostra 3 - posições 3 e 11 e amostra 4 - posições 4 e 12 (Figura 4.3).

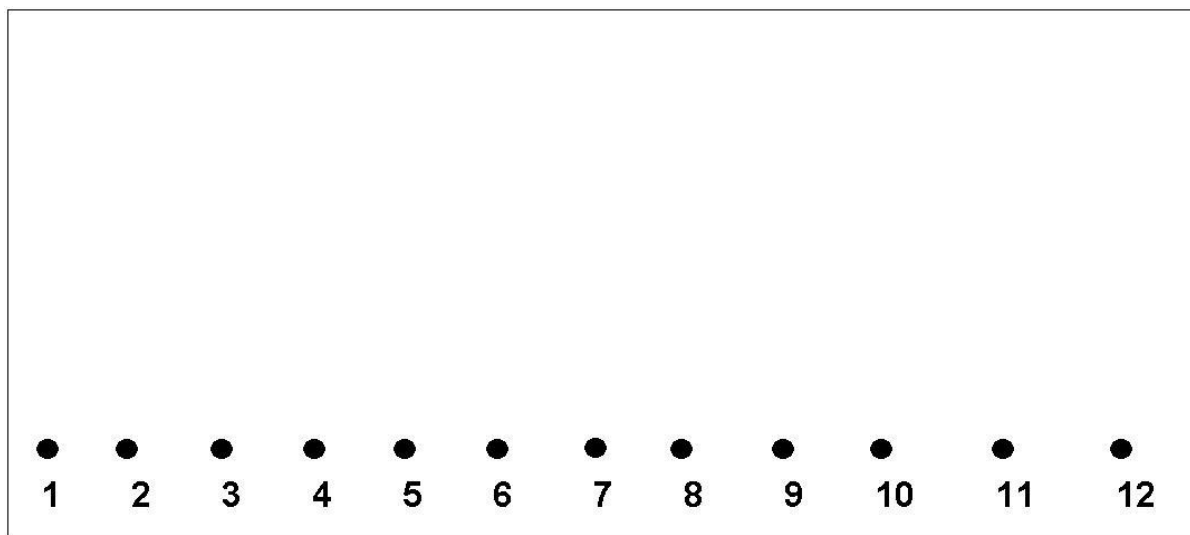


Figura 4.3 – Representação esquemática das aplicações na cromatoplaça.

O mesmo procedimento anteriormente descrito foi repetido para o padrão de neosergeolida.

4.4.5.3. Eluente

O eluente utilizado foi uma mistura de éter:isopropanol (9:1; v/v). Foi preparado aproximadamente 100 mL do eluente, que foi trocado diariamente.

4.4.5.4. Reveladores para CCD

Solução de anisaldeído – Em um erlenmeyer de 100 mL, foi adicionado 50 mL de ácido acético glacial e 0,5 mL de anisaldeído. Em seguida, foi adicionado lentamente e sob

agitação 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução apresentou coloração laranja-avermelhado e foi mantida ao abrigo da luz.

Solução etanólica de ácido fosfomolibídico (1:1) – Foi pesado 100 g do ácido fosfomolibídico e adicionado a 100 mL de etanol em um erlenmeyer de 250 mL, agitando-se até a completa dissolução do ácido. A solução foi guardada ao abrigo da luz.

Revelação – A solução de anisaldeído foi aplicada sobre a cromatoplaça da forma mais homogênea possível, utilizando um borrifador. Foi aplicada no sentido horizontal e vertical até a placa ficar completamente umidecida. Em seguida, a placa foi colocada em estufa a 110°C e mantida por 5 min. Os quassinóides isobruceína B e neosergeolida não são revelados somente com a solução de anisaldeído, sendo necessário também a aplicação da solução etanólica de ácido fosfomolibídico de forma similar a descrita anteriormente.

4.4.5.5. Preparo dos padrões

Os quassinóides isobruceína B e neosergeolida utilizados como padrões de referência neste experimento foram cedidos pelo Dr. Adrian Pohlit, do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia–LAPAAM, Coordenação de Pesquisa em Produtos Naturais–CPPN, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia–INPA e foram isolados de *P. sprucei* de acordo com SILVA *et al.* (2009).

4.4.6. Quantificação dos quassinóides isobruceína B e neosergeolida

A quantificação dos quassinóides foi feita por comparação entre as medidas das intensidades das densidades dos spots das amostras e padrões, em densitômetro de alta resolução, marca GE Healthcare®, modelo ImageScanner III®.

As cromatoplasmas foram escaneadas utilizando-se o *software* LabScan® 6.0, Uppsala-Suécia. A análise das imagens foi realizada utilizando-se o *software* Image Quant® TL 1D, version 7.0.

4.4.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* da cultura de *Picrolemma sprucei*

Frutos de *Picrolemma sprucei* serviram como material inicial para o seu estabelecimento *in vitro*. As sementes obtidas após o despoldamento desses frutos apresentavam-se altamente infestadas por micro-organismos.

Após o teste de antibiograma realizado com o meio contaminado com bactérias presentes nas sementes de *P. sprucei*, foi definida sensibilidade destas aos seguintes antibióticos:

- Sulfazotrim
- Ticarcilina + Clavulonato

E assim foi definido o produto comercial Timentin[®] 3,0 g + 0,1 g (ticarcilina dissódica + clavulanato de potássio), da GlaxoSmithKline[®], na concentração de 75 µg/100 mL para uso no meio de cultura. A partir de então, foi obtida uma taxa de desinfestação das sementes de 60,0% (Tabela 5.1).

Concentração hipoclorito sódico	Tempo de exposição	Nº de sementes	Contaminadas	Descontaminadas	Mortas
1,5%	5 min.	10	10	0	0
	30 min.	10	8	0	2
2,5%	5 min.	10	5	2	3
	30 min.	10	3	6	1
5,0%	5 min.	10	2	0	8
	30 min.	10	0	0	10

Tabela 5.1 – Resultado dos testes de descontaminação de sementes de *P. sprucei*.

Após desinfestadas e inoculadas, o início das germinações das sementes foi observado após 32 dias. As plantas cresceram e, ao atingirem 5 cm, foram subcultivadas em meio MS.

Após 120 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram utilizadas para a quantificação dos quassinóides isobruceína B e neosergeolida.

5. 2. Determinação de quassinóides em plântulas *in vitro*

Plantas de *Picrolemma sprucei* obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro* e mantidas por 120 dias nestas condições foram utilizadas para determinação dos quassinóides isobruceína B e neosergeolida. Esses testes serviriam para que fossem feitos os ajustes necessários à determinação desses metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em micro amostras, como é o caso das plantas *in vitro*. E também para que fossem iniciados os testes de estimulação e acúmulo desses quassinóides com o uso de elicitores nestas plantas. O resultado das análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostrou que as plantas de *Picrolemma sprucei* cultivadas *in vitro* após 120 dias, não produziram os quassinóides isobruceína B e neosergeolida em quantidades detectáveis (Figuras 5.1 a 5.5).

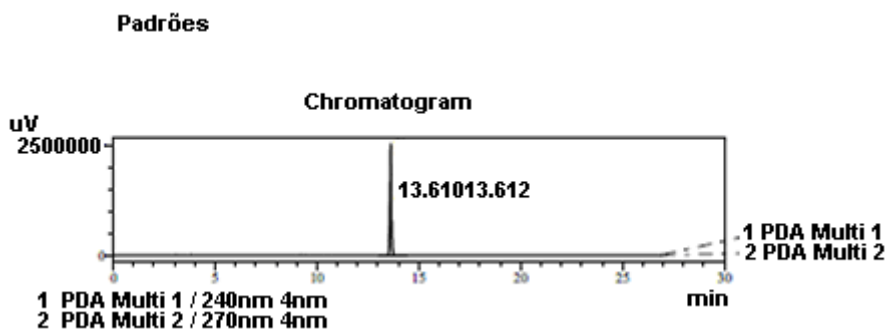


Figura 5.1 – Cromatograma do padrão de neosergeolida utilizado na determinação deste metabólito em plantas de *P. sprucei* após 120 dias de cultivo *in vitro* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

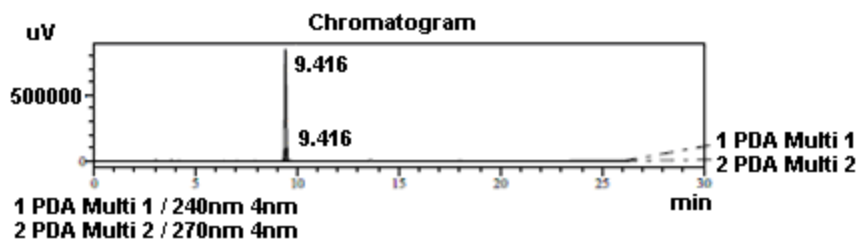


Figura 5.2 – Cromatograma do padrão de isobruceína B utilizado na determinação deste metabólito em plantas de *P. sprucei* após 120 dias de cultivo *in vitro* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

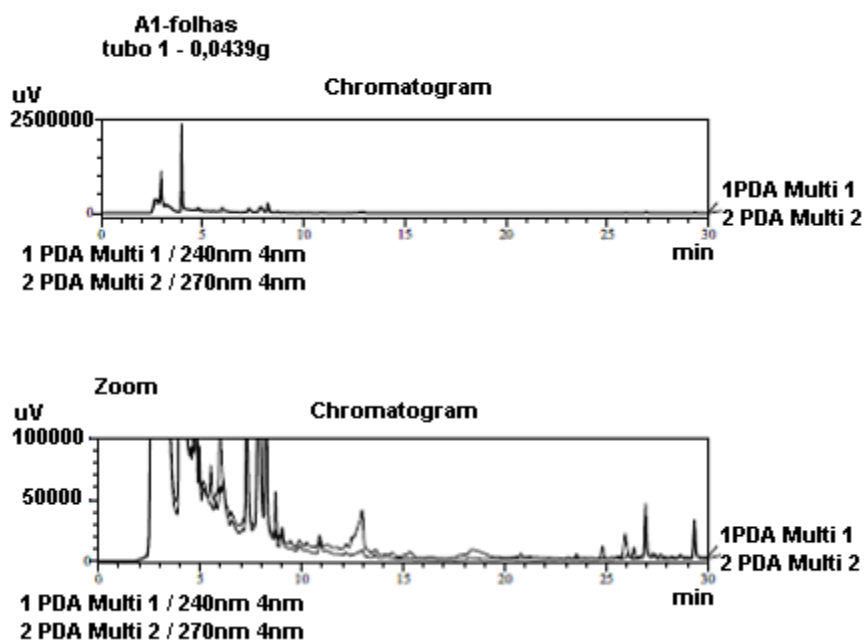
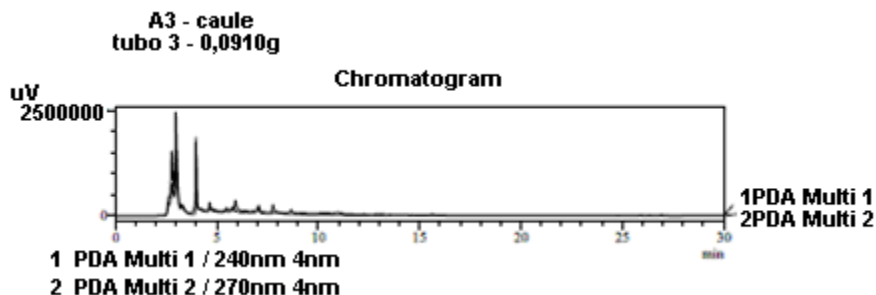


Figura 5.3 – Cromatogramas da determinação de isobruceína B e nesergeolida em folhas de *P. sprucei* após 120 dias de cultivo *in vitro* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.



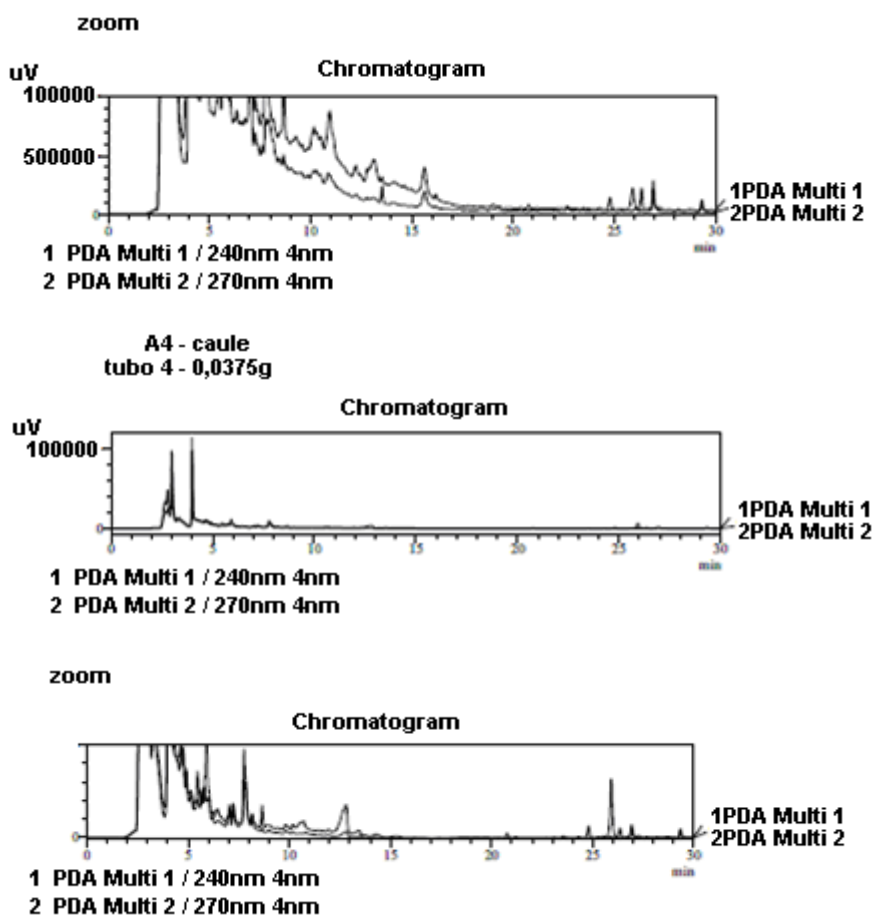


Figura 5.4 – Cromatogramas da determinação de isobruceína B e nesergeolida no caule de *P. sprucei* (dividido em duas amostras) após 120 dias de cultivo *in vitro* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

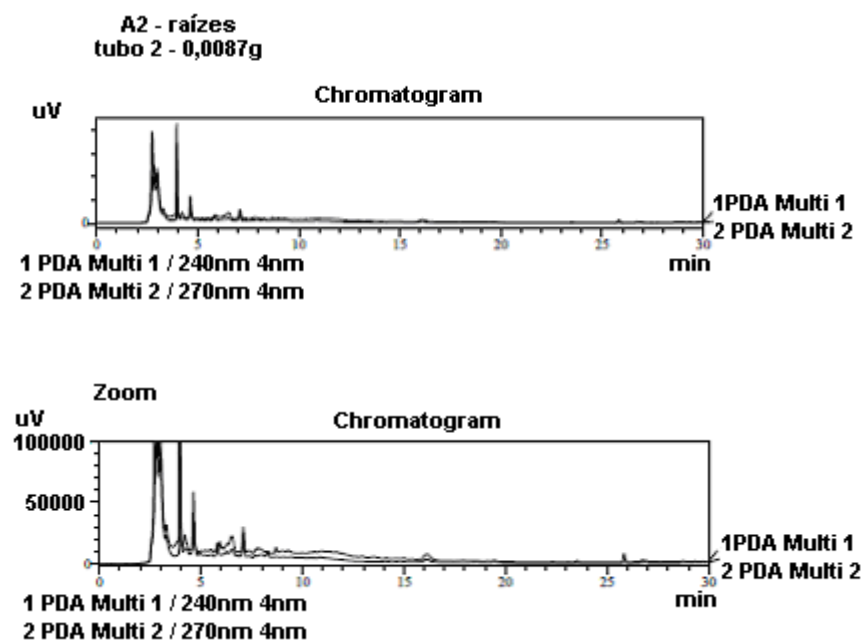


Figura 5.5 – Cromatogramas da determinação de isobruceína B e nesergeolida em raízes de *P. sprucei* após 120 dias de cultivo *in vitro* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Não foram detectados os quassinóides isobruceína B e neosergeolida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em plântulas de *Picrolemma sprucei* obtidas a partir de sementes germinadas e cultivadas *in vitro* por 120 dias (Figuras 5.1 a 5.5). A partir dos resultados acima descritos, a estratégia deste projeto foi mudada e partiu-se, então, para a determinação da ocorrência desses quassinóides em populações naturais dessa espécie. A seguir, serão mostrados os resultados da determinação de isobruceína B e neosergeolida em plantas juvenis de *P. sprucei* coletadas em áreas em torno de plantas matrizes adultas que produzem sementes e que formam, assim, áreas com grandes quantidades de pequenos indivíduos denominadas de “áreas de regeneração” (Figura 5.2 e Anexo 2).

5. 3. Determinação de quassinóides em plantas de regeneração

Em raízes de plantas de regeneração pode-se observar grande variação não só na concentração dos dois quassinóides avaliados como também na proporção entre eles. A concentração de isobruceína B variou entre 0,07% e 0,73% da massa do extrato seco, alcançando um valor médio de 0,30%. A determinação de neosergeolida mostrou que sua concentração é maior que a de isobruceína B em 85,72% dos indivíduos destas plantas e variou entre 0,03 e 1,02%, com média de 0,46%. Alguns indivíduos se destacam na produção dos quassinóides como, por exemplo, o # 1, # 2 e # 9. Nos dois primeiros, a concentração de neosergeolida fica próxima de 1%, mas a de isobruceína fica em torno de 0,30%. O indivíduo # 9, no entanto, apresentou concentrações maiores para ambos os metabólitos avaliados, 0,89% e 0,73 %, para neosergeolida e isobruceína, respectivamente (Gráfico 5.1). Os valores das concentrações obtidas estão listados em planilha no Anexo 2 (a, b e c).

Determinação de isobruceína B e neosergeolida em raízes de plantas de regeneração

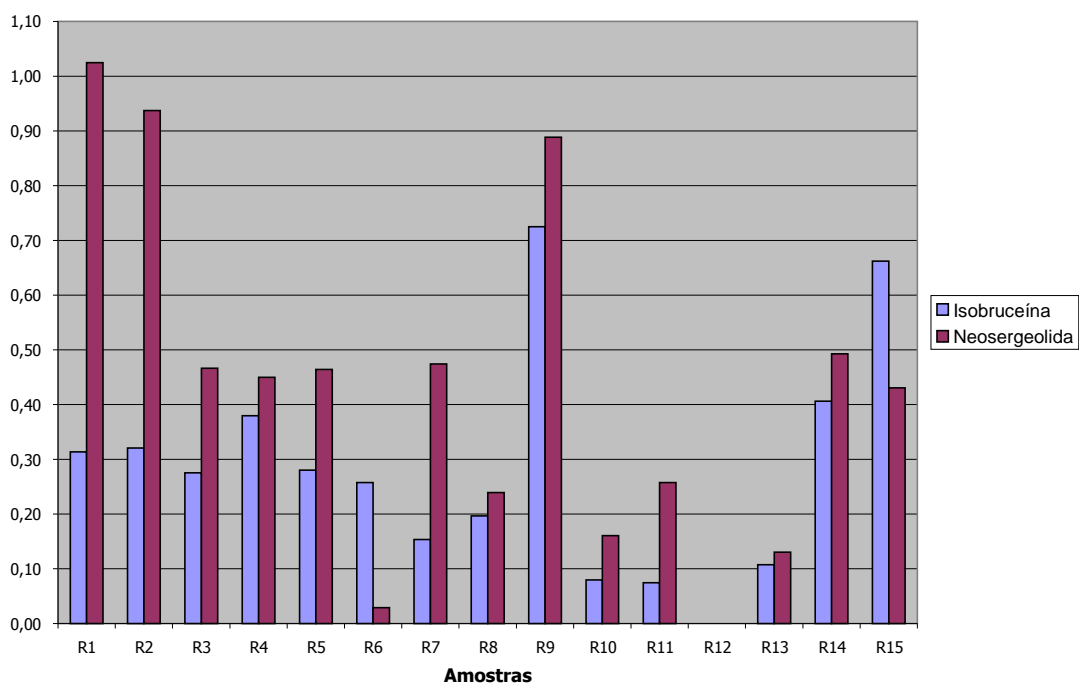


Gráfico 5.1– Determinação de isobruceína B e neosergeolida em raízes de plantas de regeneração de *P. sprucei* por CCD/fotodensimetria.

No caule das plantas de regeneração a concentração de isobruceína B variou de 0,04% a 0,85%, com valor médio de 0,25%. Observa-se aqui uma diferença na proporção entre os dois quassinóides avaliados. Enquanto nas raízes a concentração de neosergeolida foi maior em mais de 85% dos indivíduos, no caule esse metabólito só se apresentou em maiores concentrações em 33,3% destes. A concentração de neosergeolida variou de 0,09% a 0,65%, com valor médio de 0,24%. Foi observado a queda nos teores de quassinóides no caule de *P. sprucei* quando comparado às concentrações determinadas em suas raízes. A concentração de isobruceína B caiu 16,6% enquanto a queda de neosergeolida foi maior, de 47,83%. O indivíduo #9 se destacou na produção de quassinóides, com concentração de 0,85% para isobruceína e 0,65% para neosergeolida (Gráfico 5.2). Os valores das concentrações obtidas estão listados em uma planilha no Anexo 2 (a, b, c).

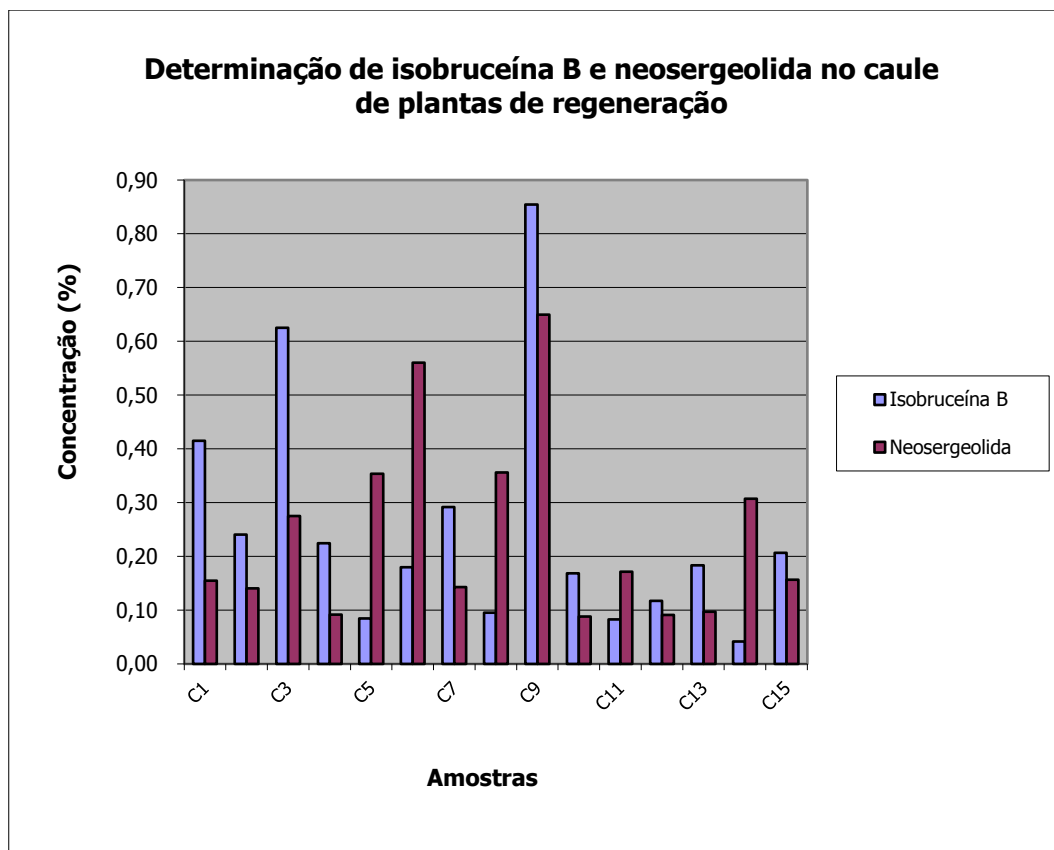


Gráfico 5.2– Determinação de isobruceína B e neosergeolida no caule de plantas de regeneração de *P. sprucei* por CCD/fotodensimetria.

As folhas das plantas de regeneração de *P. sprucei* apresentaram as maiores concentrações individuais tanto para isobruceína B (0,95%) quanto para neosergeolida (2,37%). Mas a variação na concentração entre os indivíduos, de 0,07 a 0,95%, para a isobruceína B e 0,04 a 2,37% para a neosergeolida, resultou em médias de 0,30 e 0,57% para os dois, respectivamente. Alguns indivíduos se destacaram. Foi o caso do indivíduo #3, que apresentou uma concentração de neosergeolida de 2,3% de seu extrato seco, bem diferente do indivíduo #10, cuja concentração foi de apenas 0,04% (Gráfico 5.3). Os valores das concentrações obtidos estão listados em planilha no Anexo 2 (a, b, c).

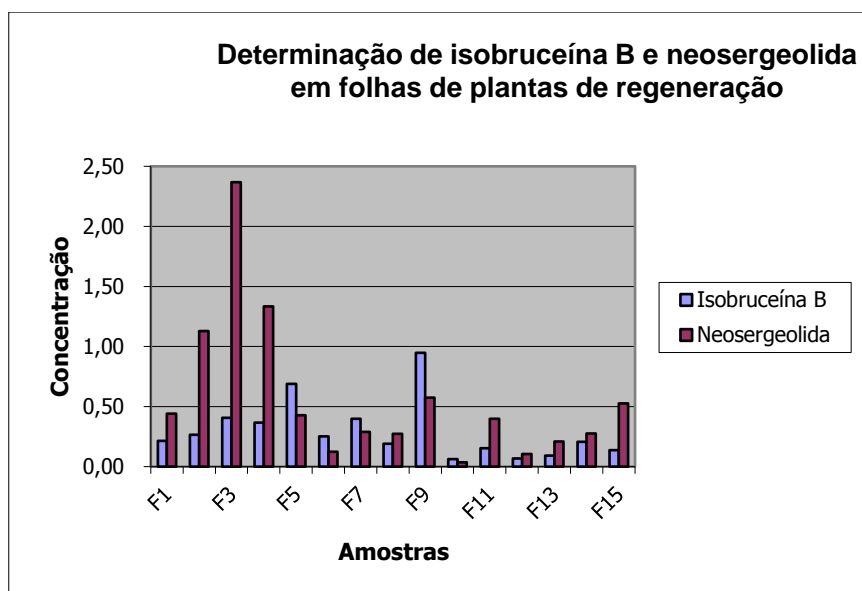


Gráfico 5.3– Determinação de isobruceína B e neosergeolida nas folhas de plantas de regeneração de *P. sprucei* por CCD/fotodensimetria.

Pohlit *et al.* (2009) determinaram a concentração de isobruceína B e neosergeolida em infusões feitas a partir do caule de *P. sprucei*, que são comumente utilizadas como antimaláricas por populações tradicionais da Amazônia, utilizando metodologia de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-ESI-MS) e quantificaram $60,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para isobruceína e $774 \mu\text{g.L}^{-1}$ para neosergeolida. Apesar de termos utilizado metodologia bem diferente da utilizada por Pohlit e seus colaboradores, observamos uma concentração maior de neosergeolida nos caules da maioria dos indivíduos por nós analisados.

5. 4. Estimulação e acúmulo de quassinóides em plantas de viveiro

5. 4. 1. Plantas submetidas ao Jasmonato de Metila (MeJa)

No tratamento com MeJa, o maior acúmulo de isobruceína foi observado em raiz (2,67%) após 72 horas, seguido de folhas (1,82%) após 48 horas. O maior incremento, comparado com o controle, foi observado nas folhas (65,45%). Apesar disso, nenhum dos

tratamentos com MeJa apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle (Tabela 5.2).

Partes da planta	Controle (%)	MeJa 24h (%)	MeJa 48h (%)	MeJa 72h (%)
Raiz	2,24 aA	0,73 aA	2,04 aA	2,67 aA
Caule	3,02 aA	0,48 aA	1,06 aA	2,14 aA
Folhas	1,10 aA	0,91 aA	1,82 aA	1,06 aA

Tabela 5.2– Concentração de isobruceína B (%) nas plantas submetidas ao tratamento com o MeJa.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Com relação à neosergeolida, o maior acúmulo foi observado em raiz (4,82%), após 72 horas, valor este maior que o dobro acumulado no caule (2,03%) após 48 horas e que representou um incremento de 197,5% em relação ao controle. Ainda assim, estes resultados não foram estatisticamente diferentes do controle (Tabela 5.3).

Partes da planta	Controle (%)	MeJa 24h (%)	MeJa 48h (%)	MeJa 72h (%)
Raiz	2,44 aA	2,23 aA	3,44 aA	4,82 aA
Caule	1,11 aA	1,61 aA	2,07 aA	1,16 aA
Folhas	0,61 aA	0,60 aA	0,89 aA	0,78 aA

Tabela 5.3– Concentração de neosergeolida (%) nas plantas submetidas ao tratamento com o MeJa.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Silva (2007) avaliou a produção de óleos essenciais de plântulas de *Melissa officinalis* (L.) *in vitro* elicitadas com jasmonato de metila e também não relatou ter havido diferença estatisticamente significativa da produção dos óleos pelas plantas quando comparado ao controle. Foi observado, em levantamento bibliográfico, não haver trabalhos de elicitação de

metabólitos *in vivo*, ou seja, utilizando plantas em casa de vegetação, como aqui descrito. Todos os trabalhos levantados utilizaram metodologia de elicitação de plantas *in vitro*.

Jasmonatos são compostos derivados de lipídeos, conhecidos como hormônios vegetais “não tradicionais” (CRELLMAN & MULLET, 1997) que exercem vários efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal. Entretanto, nos últimos anos, o principal aspecto estudado dos jasmonato tem sido seu papel na defesa da planta. A ação do ácido jasmônico e do jasmonato de metila como elicitador de metabólitos secundários em plantas é bem conhecida: a exposição de células, tecidos e órgãos têm estimulado significativamente a produção de várias classes de alcalóides (ZABETAKIS *et al.*, 1999), substâncias fenólicas (LEE *et al.*, 1997), cumarinas (SHARAN *et al.*, 1998) e ácidos hidroxicinâmicos (BIONDI *et al.*, 2000). O jasmonato aplicado exogenamente exerce vários efeitos, tanto inibitório quanto promotor, na forma de alterações morfológicas e fisiológicas (SEMBDNER & PARTHIER, 1993).

5. 4. 2. Plantas submetidas ao Salicilato de Metila (MeSa)

No tratamento com MeSa, o maior acúmulo de isobruceína foi observado em raiz (5,03%) após 48 horas, o que representou um incremento de 124,5% em relação ao controle (2,24%) e de 58,2% em relação ao segundo maior acúmulo (3,18%), observado no caule. Este resultado é estatisticamente diferente tanto do controle quanto do acúmulo observado nas outras partes das plantas avaliadas. Neste tratamento, independentemente da parte da planta utilizada, o tempo ótimo de exposição foi de 48 h, já que foi observado um decréscimo no acúmulo de isobruceína B após 72 h para todas as partes das plantas testadas (Tabela 5.4).

Partes da planta	Controle (%)	MeSa 24h (%)	MeSa 48h (%)	MeSa 72h (%)
Raiz	2,24 aB	2,39 aB	5,03 aA	1,10 aB
Caule	3,02 aA	1,67 aB	3,18 bA	1,28 aB
Folhas	1,10 bA	0,62 bA	1,05 cA	0,94 aA

Tabela 5.4– Concentração de isobruceína B (%) nas plantas submetidas ao tratamento com o elicitor MeSa.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Um padrão de acúmulo diferente dos já descritos aqui foi observado para a neosergeolida neste tratamento. Pela primeira vez, o maior acúmulo foi observado em folhas (9,28%), com um incremento de 1400% comparado ao controle. Para todas as partes das plantas avaliadas, o maior acúmulo foi observado após 72 horas. Nas primeiras 24 e 48 h houve uma inibição da produção deste quassinóide, e o valor acumulado chegou a ser inferior ao controle, mas alcançou, ao final das 72 horas, a maior concentração observada entre todos os tratamentos, com diferença estatisticamente significativa (Tabela 5.5).

Partes da planta	Controle (%)	MeSa 24h (%)	MeSa 48h (%)	MeSa 72h (%)
Raiz	2,44 aB	1,66 aB	0,97 aB	8,04 aA
Caule	1,11 aB	1,19 aB	1,11 aB	4,13 bA
Folhas	0,61 aB	0,25 aB	0,27 aB	9,28 aA

Tabela 5.5– Concentração de neosergeolida (%) nas plantas submetidas ao tratamento com o elicitor MeSa.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Silva (2007) também obteve os maiores acúmulos de óleos essenciais em *Melissa officinalis* (L.) cultivadas in vitro com o tratamento de salicilato de metila, corroborando com os nossos resultados aqui descritos.

5. 4. 3. Plantas submetidas ao Ácido Salicílico (AS)

As plantas tratadas com AS não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao acúmulo de isobruceína B para nenhuma das partes tratadas em qualquer dos tempos de exposição quando comparadas ao controle ou quando comparadas entre si (Tabela 5.6). O AS inibiu o acúmulo de óleos essenciais de *Melissa officinalis in vitro* (SILVA, 2007).

Partes da planta	Controle (%)	AS 24h (%)	AS 48h (%)	AS 72h (%)
Raiz	2,24 aA	2,68 aA	0,60 aA	1,23 aA
Caule	3,02 aA	1,85 aA	0,26 aA	2,48 aA
Folhas	1,10 aA	1,10 bA	1,75 aA	1,38 aA

Tabela 5.6– Concentração de isobruceína B (%) nas plantas submetidas ao tratamento com o elicitor AS.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

No tratamento com AS houve incremento no acúmulo de neosergeolida em todas as partes das plantas testadas, após 48 horas de exposição, quando comparadas ao controle. Assim, este se revelou ser o tempo ótimo de exposição de *P. sprucei* a este elicitor, para o metabólito em referência, uma vez que, a partir daí, foi observado queda neste acúmulo. O maior valor observado no acúmulo deste metabólito ocorreu nas folhas após 48 horas (6,79%), com incremento de mais de 100% comparado ao controle (Tabela 5.7).

Partes da planta	Controle (%)	AS 24h (%)	AS 48h (%)	AS 72h (%)
Raiz	2,44 aB	0,76 aB	5,06 bA	1,64 aB
Caule	1,11 aB	1,13 aB	3,87 bA	1,15 aB
Folhas	0,61 aB	1,67 bB	6,79 bA	0,14 aB

Tabela 5.7– Concentração de neosergeolida (%) nas plantas submetidas ao tratamento com o elicitor AS.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

5. 4. 4. Comparação entre os tratamentos no acúmulo de isobruceína B em raízes

Quando comparamos os tratamentos testados, observamos que o maior acúmulo de isobruceína B em raízes aconteceu em plantas elicitadas com salicilato de metila, após 48 horas, cuja concentração alcançou 5,03% da massa de seu extrato seco. Essa concentração foi 87,68% maior que os outros dois tratamentos testados, que acumularam 2,68 e 2,67%, para AS, após 24 h e MeJa, após 72 h, respectivamente. O tempo de exposição de 48 h foi também o tempo ótimo de acúmulo, pois após 72 h esse valor cai para 1,10% da massa do extrato (Tabela 5.8). Este foi o único tratamento com diferenças estatisticamente significativas.

Isobruceína B: raízes			
	MeJa	MeSa	AS
Controle	2,24 aA	2,24 bA	2,24 aA
24 h	0,73 aA	2,39 bA	2,68 aA
48 h	2,04 aB	5,03 aA	0,60 aB
72 h	2,67 aA	1,10 bA	1,23 aA

Tabela 5.8 – Acúmulo de isobruceína B (%) em raízes sob os diversos tratamentos testados.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

5. 4. 5. Comparação entre os tratamentos no acúmulo de neosergeolida em raízes

O maior acúmulo de neosergeolida nas raízes de *P. sprucei* foi observado no tratamento de salicilato de metila após 48 h. Esse tratamento alcançou a concentração de 8,04% e foi 58,89% maior que o tratamento com ácido salicílico, que acumulou 5,06% após 48 h (Tabela 5.9).

Neosergeolida: raízes			
	MeJa	MeSa	AS
Controle	2,44 aA	2,44 bA	2,44 bA
24 h	2,23 aA	1,66 bA	0,76 bA
48 h	3,44 aA	0,97 bB	5,06 aA
72 h	4,82 aA	8,04 aA	1,64 bB

Tabela 5.9 – Acúmulo de neosergeolida (%) em raízes sob os diversos tratamentos testados.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

5. 4. 6. Comparação entre os tratamentos no acúmulo de isobruceína B no caule

No caule, nenhum dos tratamentos estimulou o acúmulo de isobruceína B, com diferenças significativas. Mas o jasmonato de metila e o ácido salicílico inibiram o acúmulo deste metabólito (Tabela 5.10).

Isobruceína B: caule			
	MeJa	MeSa	AS
Controle	3,02 aA	3,02 aA	3,02 aA
24 h	0,48 bA	1,67 aA	1,85 bA
48 h	1,06 aB	3,18 aA	0,26 bB
72 h	2,14 aA	1,28 aA	2,48 aA

Tabela 5.10 – Acúmulo de isobruceína B (%) no caule sob os diversos tratamentos testados.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

5. 4. 7. Comparação entre os tratamentos no acúmulo de neosergeolida no caule

O tratamento com salicilato de metila, após 72 h, resultou no maior acúmulo de neosergeolida no caule da planta, alcançando a concentração de 4,13%, com um incremento de 272,07% no acúmulo do metabólito. O ácido salicílico estimulou um acúmulo 3,87% menor após 48 h (Tabela 5.11).

Neosergeolida: caule			
	MeJa	MeSa	AS
Controle	1,11 aA	1,11 bA	1,11 bA
24 h	1,61 aA	1,19 bA	1,13 bA
48 h	2,07 aB	1,11 bB	3,87 aA
72 h	1,16 aB	4,13 aA	1,15 bB

Tabela 5.11 – Acúmulo de neosergeolida (%) no caule sob os diversos tratamentos testados.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

5. 4. 8. Comparação entre os tratamentos no acúmulo de isobruceína B nas folhas

Quanto ao acúmulo de quassinóides nas folhas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos testados (Tabela 5.12).

Isobruceína B: folhas			
	MeJa	MeSa	AS
Controle	1,10 aA	1,10 aA	1,10 aA
24 h	0,91 aA	0,62 aA	1,10 aA
48 h	1,82 aA	1,05 aA	1,75 aA
72 h	1,06 aA	0,94 aA	1,38 aA

Tabela 5.12 – Acúmulo de isobruceína B (%) nas folhas sob os diversos tratamentos testados.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

5. 4. 9. Comparação entre os tratamentos no acúmulo de neosergeolida nas folhas

Quanto ao acúmulo de neosergeolida em folhas, dois tratamentos, o salicilato de metila após 72 h e o ácido salicílico após 48 h, estimularam um acúmulo muito significativo do metabólito, 9,28 e 6,79%, respectivamente, quando comparados ao controle. Entre eles não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 5.13).

Neosergeolida: folhas			
	MeJa	MeSa	AS
Controle	0,61 aA	0,61 bA	0,61 bA
24 h	0,60 aA	0,25 bA	1,67 bA
48 h	1,89 aB	0,27 bB	6,79 aA
72 h	1,78 aB	9,28 aA	0,14 bB

Tabela 5.13– Acúmulo de neosergeolida (%) nas folhas sob os diversos tratamentos testados.

Observação: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical, dentro de cada período de tempo e entre as partes da planta avaliada, minúscula na horizontal, entre os períodos de tempo e dentro de cada parte da planta avaliada, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

6 – CONCLUSÃO

O presente trabalho determinou os quassinóides isobruceína B e neosergeolida em plantas *in vitro*, populações naturais de *Picrolemma sprucei* Hook. f. e utilizou plantas juvenis desta espécie mantidas em viveiro com o objetivo de analisar o efeito dos elicitores jasmonato de metila, salicilato de metila e ácido salicílico na produção desses quassinóides, marcadores da família Simaroubaceae.

Plantas de *Picrolemma sprucei* Hook. f. germinadas e cultivadas *in vitro*, em meio de cultura de solução salina básica MS (Murashige & Skoog, 1962), após 120 dias de cultivo, não apresentaram os quassinóides isobruceína B e neosergeolida, presentes em populações naturais desta espécie, em níveis detectáveis por Cromografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Em plantas juvenis de populações naturais desta espécie, a ocorrência desses quais se mostrou variada nas suas concentrações e proporções de ocorrência entre os vários órgãos da planta que os produzem.

Nessas plantas, a maior concentração do quassinóide isobruceína B foi de 0,95% do extrato seco, enquanto que a de neosergeolida foi de 2,37%, ambas determinadas nas folhas.

Quanto à elicitação de plantas juvenis cultivadas em viveiro, o maior acúmulo de isobruceína B foi de 5,03% nas raízes.

O maior acúmulo de neosergeolida foi de 9,28% nas folhas.

O salicilato de metila foi o melhor elicitor testado, estimulando os maiores acúmulos tanto de isobruceína B quanto de neosergeolida nas raízes, caule e, para neosergeolida, nas folhas também.

O salicilato de metila estimulou o maior incremento no acúmulo de neosergeolida observado, que foi de 1.421,31%, ocorrido nas folhas.

O maior incremento no acúmulo de isobruceína B foi de 124,55%, estimulado pelo salicilato de metila e ocorrido após 48 horas nas raízes.

7 – PERSPECTIVAS

1. Determinar a concentração de isobruceína B e neosergeolida em plantas adultas de populações naturais para compará-las com as das plantas juvenis;
2. Ampliar o tempo de avaliação da elicitação das plantas cultivadas em viveiro;
3. Repetir as análises dos metabólitos aqui apresentados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
4. Determinar a concentração de isobruceína B e neosergeolida em plantas germinadas em viveiro;

5. Ajustar a metodologia de elicitação *in vivo* para definir a melhor concentração e volume dos elicitores utilizados;
6. Determinar se há diferença na concentração de quassinóides de plantas crescidas em diferentes graus de sombreamento;
7. Determinar a concentração de isobruceína B e neosergeolida de plantas aclimatizadas e recolocadas em seu habitat natural (após cultivo *in vitro*), com diferentes idades, a fim de avaliar quando a planta começa a produzi-los.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais e ritualísticas. Salvador, Editora da Universidade Federal da Bahia, 192 p. (2000).
- ALMEIDA, M. M. B. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides na última década. *Química Nova*, v. 30 (4): p. 935-951 (2007).
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Química Nova na Escola*. Caderno Temático, c, p. 10-15. (2001).
- AMORIM, R. C. N.; POHLIT, A. M. *Picrolemma sprucei* Hook. f.: uso tradicional, princípios ativos e seus derivados semissintéticos, exploração comercial e econômica. *Fitos: Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos*, 2 (1): p. 19-26. (2006).
- ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of *Chincona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. New York, v. 87: p. 253-256. (2003).
- ANDRADE-NETO, V. F. Estudo da atividade antimalárica experimental e ação tóxica de esquizonticidas sanguíneos e esquizonticidas teciduais de extratos vegetais e moléculas

isoladas. Tese de Doutorado, 1 v., 155 p., Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais. (2004).

ARIKAT, N. A.; JAWAD, F. M.; KARAM, N. S.; SHIBLI, R.A. Micropropagation and accumulation of essential oils in Wild Sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, vol. 100: p. 193-202. (2004).

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized method. *Journal of Clinical Pathology*. Vol. 45: p. 493-496. (1966).

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J. C.; ESTERRE, P. H.; DEHANO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 98: p. 45-54. (2005).

BHAGWATH, S. G.; HJORTSO, M. A. Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubine. A production in hairy cultures of *Ambrósia artemisiifolia*. *Journal of Biotechnology*, vol. 80: p. 159-167. (2000).

BIONDI, S.; FORMALÉ, S.; OKSMAN-CALDENTY, K. M.; EEVA, M.; AGOSTANI, S.; BAGNI, N. Jasmonate induces over-accumulation of methyl putrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. *Plant Cell reports*. Vol. 19 (7): p. 691-697 (2000).

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, vol. 161: p. 839-851. (2001).

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. *Química Nova*, vol. 17 (5): p. 405-445. (1994).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. RDC nº 48. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Publicado no D.O. U. em 18 de março de 2004, (2004).

- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acessado via rede de computadores mundial, internet, por meio do site <http://portal.saude.gov.br> rem 04/09/2007. (2007).
- CARVALHO, L. H.; FERRARI, V. M. S.; BRANDÃO, M. G. L.; KRETLI, A. U. Plantas brasileiras: alternativas no tratamento da malária. *Ciência Hoje*, vol. 22 (127): p. 62-68. (1997).
- CASTAÑEDA, P.; PÉREZ, L. M. Calcium íon promotes the response of *Citrus limon* against fungal elicitors or wounding. *Phytochemistry*, vol. 42 (3): p. 595-598. (1996).
- COLLIN, H. A. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, vol. 34: p. 119-134. (2001).
- CRAGG, G. C.; NEWMAN, D. J. SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and Development. *Journal of Natural Products*, vol. 60: p. 52-60. (1997).
- CREELMAN, R. A.; TIERNEY, M. L.; MULLET, J. E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, vol. 89: p. 4938-4941. (1992).
- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 48: p. 355-381. (1997).
- CRUZ, M. A. S.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, vol. 15: p. 28-34. (2000).
- DI STASI, L. C.; SANTOS, C. M.; HIRUMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia. São Paulo: Editora Unesp, 149 p. (1989).
- DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant Cell and tissue culture: alternatives for metabolite Production. *Biotechnology Advances*, vol. 13 (3): p. 125-453. (1995).
- DITTRICH, H.; KUTCHAN, T, M.; ZENK, M. H. The jasmonate precursor, 12-oxo-phytyldienoic acid, induces phytoalexins synthesis in *Petroselinum crispum* cell

- cultures. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, vol. 309 (1): p. 33-36. (1992).
- DONG, H. D.; ZHONG, J. J. Significant improvement of taxane production of in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 8: p. 145-150. (2001).
- DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*, vol. 28 (5): p. 337-346. (2003).
- DUKE, J. A.; MARTINEZ, R. V. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. Florida. USA: CRC Press, 224 p. (1994).
- EBEL, J.; MITHÖFER, A. Early events in the elicitation of plant defense. *Planta*, vol. 206 (3): p. 335-348. (1998).
- EILERT, U.; CONSTABEL, F. Elicitation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cells by fungal homogenates – an induction process. *Journal of Plant Physiology*, vol. 125: p. 167-172. (1986).
- FANDEUR, T.; MORETTI, C.; POLONSKY, J. *In vitro* and *in vivo* assessment of the antimalarial activity of sergeolide. *Planta Medica*, vol. 51: p. 20-23. (1985).
- FERNANDO, E. S.; QUINN, C. Pericarp anatomy and systematics of the Simaroubaceae *sensu lato*. *Australian Journal of Botany*, vol. 40: p. 263-289. (1992).
- FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (Eds.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFSC e Editora da UFRGS, 2ª edição, p. 101-121; 387-415. (2004).

- FUKAMIYA, L. K.; MUHAMMAD, I.; MURAKAMI, C.; OKANO, M.; HARVEY, I.; PELLETIER, J. Structure-activity relationships of quassinoids for eukaryotic protein synthesis. *Cancer Letters*, vol. 220: p. 37-48. (2005).
- FUMAGALI, A.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, E. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 48 (4): p. 627-641, (2008).
- FUNK, C.; GUGLER, K.; BRODELIUS, P. Increased secondary product formation in plant cell suspension culture after treatment with a yeast carbohydrate (elicitor). *Phytochemistry*, vol. 26: p. 401-405. (1987).
- GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. Part 2. *In: Practice*. Edington. England: Exegetics Limited. Vol. 2 (1993).
- GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALMEIDA, M. B. S.; CARVALHO, E. S.; CASCON, V.; ROCHA, L. M. The official use of medicinal plants in public health. *Natural Products Research in Brazil*, vol. 49 (3): p. 339-344. (1997).
- GIRI, C.C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees and overview. *Trees*, vol. 18 (2): p. 115-135. (2004).
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, vol. 30 (2): p. 374-381. (2007).
- GODOY, H. G.; LOYOLA, V. V. M. Effect of acetylsalicylic on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. *Plant Cell Reports*, vol. 16: p. 287-290. (1997).

- GUNDLACH, H.; ZENK, M. H.; MULLER, M. J.; KUTCHAN, T. M. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant Cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89: p. 2389-2393. (1991).
- HESS, D. *Fisiologia vegetal-fundamentos moleculares y bioquímico-fisiológicos del metabolismo y desarrollo*. Barcelona: Ediciones Omega S. A. (1980).
- HIREGOUDAR, L. V.; ASHOK-KUMAR, M. G.; MURTHY, H. N. *In vitro* culture of *Feronia limonia* (L.). Swingle from hypocotyls and intermodal explants. *Biologia Plantarum*, vol.49 (1): p. 41-45. (2005).
- HONDA, H.; LIU, C.; KOBAYASHI, T. Large-scale plant micropropagation. *Advances in Biochemical and Engineering Biotechnology*, vol. 72: p. 157-182. (2001).
- HUGHES, E. H.; SHANKS, J. V. Metabolic engineering of plants for alkaloid Production. *Metabolic Engineering*, vol. 4 (1): p. 41-48. (2002).
- INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLING, F. A. (Eds.). *Allelopaty: organisms, processes and applications*. Washington: DC/ USA. Symposium Series of American Chemical Society Editor, 388 p. (2002).
- IRD. *Farmacopeias tradicionais: qual o seu o papel no combate à malária?* Institut de Recherche pour le Développement. Acessado via Rede Mundial de Computadores em 09 de julho de 2009. (2009).
- KAKEGAWA, K.; KANEKO, Y.; HATTORI, E.; KOIKE, K.; TAKEDA, K. Cell cultures of *Centaurea cyanus* produce malonated anthocyanin in UV light. *Phytochemistry*, vol. 26: p. 2261. (1987).
- KRETTLI, A. U. Malária humana: situação atual, problemas de diagnósticos e imunidade. *Ciência e Cultura*, vol. 42 (8): p. 552-559. (1990).
- KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; FERRARI, W. M. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever or malaria or plants

randomly selected: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 96 (8): p. 1033-1042. (2001).

KUPCHAN, S. M.; BRITTON, R. W.; LACADIE, J. A.; ZIEGLER, M. F.; SIGEL, C. W. The isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent antileukemic quassinoids from *Brucdea antidysenterica*. *Journal of Organic Chemistry*, vol. 40: p. 648-654. (1975).

LEE, Y. J.; CHUNG, E.; LEE, Y. H.; HUH, B.; LEE, S. K. Ginsenoside-Rg1, one of the major active molecules from *Panax ginseng*, is a functional ligand of glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 133: p. 135-140. (1997).

LOURENÇO, M. V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. *Biólogo*, vol. 65 (1/2): 63-65 (2003).

LEVIS-STRAUSS, C. A ciência do concreto. *In: O pensamento selvagem*. Campinas: Editora Papirus, p. 15-20. (1989).

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, vol. 25 (3): p. 429-438. (2002).

MALOSSO, M. Micropropagação *in vitro* de *Acmella oleraceae* (L.) R. K. Jasen e estabelecimento de meio de cultura para conservação dessa espécie em banco de germoplasma *in vitro*. Tese de Doutorado, 1 v., Biotecnologia (Agroflorestal), Universidade Federal do Amazonas. (2007).

MOBOT. Missouri Botanical Garden. Acessado via Rede Mundial de Computadores. URL: www.mobot.org. Consultado em abril de 2008. (2008).

MORETTI, C.; POLONSKY, J.; VUILHORGNE, M.; PRANGE, T. Isolation and structure of sergeolide, a potent cytotoxic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. *Tetrahedron Letters*, vol. 23: p. 647-650. (1982).

- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, vol. 15: p. 473-497. (1962).
- MURAKAMI, C.; FUKAMIYA, N; TAMURA, S.; OKANO, M.; BASTOW, K. F.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H.; LEE, K. Multidrug-resistant cancer cell susceptibility to cytotoxic quassinoids, and cancer chemopreventive effects of quassinoids and cathin alkaloids. *Bioorganic & Medical Chemistry*, vol. 12: p. 4963-4968. (2004).
- NEBULIS-Núcleo de Estudantes de Biologia da Universidade de Lisboa. Acessado via Rede Mundial de Computadores em 09 de julho de 2009. URL: <http://nebulis.fc.pt/content/view/1598/40>. (2009).
- NEVES, D. P. *Parasitologia humana*, 10ª edição, São Paulo: Editora Atheneu. (2002).
- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (Eds.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFSC e Editora da UFRGS, 1ª edição, p. 11-24. (1999).
- NOEDL, H.; WONGSRICHANALAI, C.; WERNSDORFER, W. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends in Parasitology*, vol. 19 (4), p. 175-181. (2003).
- NUNOMURA, R. C. S.; SILVA, E. C. C.; OLIVEIRA, D. F.; BOELONI, N.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. *In vitro* studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). *Acta amazonica*, vol. 36: p. 327-330. (2006).
- OLIVEIRA, F. Q.; JUNQUEIRA, R. G.; STEHMANN, J. R.; BRANDÃO, M. G, L. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na

bibliografia etnomédica brasileira. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Botucatu, vol. 5 (7): p. 23-31. (2003).

OKANO, M.; FUKAMIYA, N.; TAGAHARA, K.; TOKUDA, H.; WASHIMA, A.; NISHINO, H.; LEE, K. Inhibitory effects of quassinoids on Epstein-barr virus activation. *Cancer Letters*, 94: 139-146. (1995).

PASQUALI, G.; PORTO, D. D.; FETT-NETO, A. G. Metabolic engineering of Cell culture versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (4): 287-296. (2006).

PEREIRA, G. K.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C.; RODRIGUES-FILHO, E. Eliciação de plântulas de *Murraya paniculata* com o fungo endofítico *Aspergillus flavus*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, ASBQ 25, Poços de Caldas: Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, vol. 1: p. 122. (2002).

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medical plants. *Phytochemistry*, vol. 56: 237-243. (2001).

POHLIT, A. M.; JABOR, V. A. P.; AMORIM, R. C. N.; COSTA E SILVA, E. C.; LOPES, N. P. LC-ESI-MS determination of quassinoids isobrucein B and neosergeolide in *Picrolemma sprucei* stem infusions. *Journal of Brazilian Chemical Society*, vol. 20 (6): 1065-1070. (2009).

POLONSKY, J.; BHATNAGAR, S.; MORETTI, C. 15-deacetylsergeolide, a potent antileukemic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. *Journal of Natural Products*, vol. 47 (6): 994-996. (1984).

- RAHMAN, S.; FUKAMIYA, N.; OHNO, N.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; TAGAHARA, K.; LEE, K.; OKANO, M. Inhibitory effects of quassinoid derivatives on Epstein-barr virus early antigen activation. *Chemical Pharmacological Bulletin* 45 (4): 675-677. (1997).
- RAO, S. R.; RAVISHAKAR, G. A. Plant cell culture: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, vol. 20: p. 101-153. (2002).
- RIBEIRO, E. L. S.; HOPINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; BRITO, J. M.; COSTA, M. A. S.; MARTINS, L. H. P.; SOUZA, M. A. D.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; SILVA, C. F.; PEREIRA, E. C.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da reserva Duque – Guia de identificação de plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID. Vol. 1, 816 p. (1999).
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e farmacobiotecnologia. São Paulo: Editora Premier, 372 p. (1997).
- ROBERT, A.; CABARET, O. D.; CAZELLES, J.; MEUNIER, B. From mechanistic studies on artemisinin derivatives to a new modular antimalarial drugs. *Accounts of Chemical Research*, vol. 35 (3): p. 167-174. (2002).
- RODRIGUEZ-SAONA, C.; CRAFTS-BRANDNER, S. J.; PARÉ, P. W.; HENNEBERRY, T. J. Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. *Journal of Chemical Ecology*, 27 (4): 679-694. (2001).
- RODRÍGUEZ-GAMBOA, T.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FILHO, E.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BARRIOS CH., M.; CASTRO-CASTILHO, O.; VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Benzoates from the bark of *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae). *Journal of Brazilian Chemistry*, vol. 12 (3): p. 386-390. (2001).

- RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, vol. 8: p. 1809-1818. (1996).
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFSC e Editora da UFRGS, 1ª edição, p. 11-24. (1999).
- SARAIVA, R. C. G. Estudo fitoquímico de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (SIMAROUBACEAE) e dosagem dos princípios antimaláricos nos chás de caule e raiz. Dissertação de mestrado, 1 v., Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Amazonas. (2001).
- SARAIVA, R. C. G.; BARRETO, A. S.; SIANI, A. C.; FERREIRA, J. L. P.; ARAÚJO, R. B.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Estudo anatômico dos caules e folhas de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (SIMAROUBACEAE). *Acta amazonica*, vol. 33 (2): p. 213-219. (2003).
- SATDIVE, R. K.; FUZELE, D. P.; EAPEN, S. Study on Production of ajmalicine in shake flasks by multiple shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Progress*, vol. 19: p. 1071-1075. (2005).
- SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 44: p. 569-589. (1993).
- SCHPECTOR, J. Z. CASTELLANO, E. E.; FHO, E. R.; VIEIRA, I. J. C. A new quassinoid isolated from *Picrolemma pseudocoffea*. *Acta crystallographica*, vol. 50: p. 794-797. (1994).

- SCHUTES, R. E. De plantis xicariis e mundo novo tropicale commentationes. XIX. Biodynamic apocynaceous plants of northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. New York, vol. 1, p. 165-192. (1979).
- SHARAN, M.; TAGUCHI, G.; GONDA, K.; JOUKE T.; SHIMOSAKA M.; HAYASHIDA N.; OKAZAKI M. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and tobacco cell cultures. *Plant Science*, vol. 132 (1): p. 13-19. (1998).
- SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, vol. 85: p. 718-721. (1997).
- SILVA, C. F. N. O uso da cultura de tecidos vegetais na padronização biológica de fitoterápicos utilizando *Bryophyllum calycinum* Salisb. (coirama). Dissertação de mestrado, 1 v., biotecnologia vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro. (2002).
- SILVA, E. C. C.; CAVALCANTI, B. C.; AMORIM, R. C. N.; LUCENA, J. F.; QUADROS, D.; TADEI, W. P.; MONTENEGRO, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; MELO, M. R. S.; ANDRADE-NETO, V. F.; SILVA, L. F. R.; VIEIRA, P. P. R.; POHLIT, A. M. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (1): 48-55. (2009).
- SILVA, E. A. Farmácia verde: remédios à base de plantas nativas e exóticas do Amazonas, Manaus: Edições: Governo do Amazonas, Editora da Universidade Federal do Amazonas. (2003).
- SILVA, S. *Melissa officinalis* (L.): produção estimulada de óleos essenciais nas culturas *in vitro*. Testes de atividade larvicida do hidrolato de plantas micropropagadas sobre *Aedes*

aegypti L. Tese de doutorado, 1 v., 141 p., Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro. (2007).

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. *Óleos voláteis*. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 387-415. (2004).

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul*. 3ª edição, Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 173 p. (1989).

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. *Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos*. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 387-415. (2004).

SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. Involvement and interaction of various signalling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistances to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 71 (3): p. 181-212. (2002).

TAÍZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., California/USA, p. 543. (2002).

TAKEDA, J. Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension-II. Effects of light and 2,4-D on induction and reduction of enzyme activities related to anthocyanin synthesis. *Journal of Experimental Botany*, vol. 41: p. 749. (1990).

- TANI, M.; FUKIU, H.; SHIMOMURA, M.; TTABATA, M. Structure of endogenous oligogalacturonides inducing shikonin biosynthesis in *Lithospermum* cell culture. *Phytochemistry*, vol. 31: p. 2719-2723. (1992).
- THOMAZ, W. W. The American genera of Simaroubaceae and their distribution. *Acta Botanica Brasilia*, vol. 4 (1): p. 11-18. (1990).
- TISCHLER, M.; CARDELLINA II, J. H.; BOYD, M. R.; CRAG, G, M. Cytotoxic quassinoids from *Cedronia granatensis*. *Journal of Natural Products*. Vol. 55 (5): p. 667-671. (1992).
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Acessado via Rede Mundial de Computadores. URL: <http://www.ib.usp.br/~beraldo/Trabalho/ciclo.htm>. Em 18/12/2007.
- VANISREE, M.; LEE, C. Y.; LO, S. F.; NALAWADE, S. M.; LIN, C. Y.; TSAY, H. S. Studies on the Production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. 45: p. 1-22. (2004).
- VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering of secondary metabolic Production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13: p. 181-187. (2002).
- VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. *Plant biotechnology and the Production of alkaloids*. San Diego: Ed. Academic Press, vol. 50. (1998).
- VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 98: p. 351-360. (2005).
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. Plant Drug analysis. Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, 320 p. (1996).
- WALIA, N.; SINHA, S.; BABBAR, S. B. Micropropagation of *Crataeva murvala*. *Biologia Plantarum*, vol. 46 (2): p. 181-185. (2003).

- WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. London: Blackwell Scientific Publications, 1ª ed., 238 p. II, (1994).
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (orgs.). Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Editora Argos, UNOESC. (2001).
- ZABETAKIS, I.; EDWARDS, R.; O'HAGAN, D. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemical*, vol. 50: p. 53-56. (1999).
- ZHANG, W.; CURTIN, C.; KIKUCHI, M.; FRANCO, C. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, vol. 162: p. 459-468. (2002).
- ZHONG, W.; SLADEK, F. M.; DARNELL, J. E. The expression pattern of a *Drosophila* homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggest a determinative role in gut formation. *The EMBO Journal*, vol. 12 (2): p. 537-544. (1993).
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. SANEST. *Sistema de análise estatística para microcomputadores*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 75 p. (1984).
- ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CASTELLANO, E. E. A new quassinoid isolated from *Picrolemma pseudocoffea*. *Acta Crystallographica C50*: P. 794-797. (1994).

ANEXOS

- ANEXO 1A DOSAGENS DE QUASSINÓIDES – ELICITAÇÃO – JASMONATO DE METILA
(24, 48 e 72 h).
- ANEXO 1B DOSAGENS DE QUASSINÓIDES – ELICITAÇÃO – SALICILATO DE METILA
(24, 48 e 72 h).
- ANEXO 1C DOSAGENS DE QUASSINÓIDES – ELICITAÇÃO – ÁCIDO SALICÍLICO (24, 48
e 72 h).
- ANEXO 1D DOSAGENS DE QUASSINÓIDES – ELICITAÇÃO – CONTROLE.
- ANEXO 2A DOSAGENS DE QUASSINÓIDES – MUDAS DE REGENERAÇÃO. PARTE DA
PLANTA: RAÍZES.
- ANEXO 2B DOSAGENS DE QUASSINÓIDES – MUDAS DE REGENERAÇÃO. PARTE DA
PLANTA: CAULE.
- ANEXO 2C DOSAGENS DE QUASSINÓIDES – MUDAS DE REGENERAÇÃO. PARTE DA
PLANTA: FOLHAS.

ANEXO 1 A – DOSAGEM DE QUASSINÓIDES – JASMONATO (24, 48 e 72 h)

DOSAGEM DE QUASSINÓIDES - ELICITAÇÃO

TRATAMENTOS	AMOSTRAS	Massa	Massa	Massa	ISOBRUCEÍNA			NEOSERGEOLIDA		
		seca (g)	seca (mg)	Aplicada (ug)	1ª leitura	% 1ª leitura	MÉDIA	1ª leitura	% 1ª leitura	MÉDIA
	R1	0,1287	128,70	0,19	0,05	0,04	0,04	3,69	2,87	2,87
	R2	0,1166	116,60	0,17	2,15	1,84	1,84	2,01	1,72	1,72
	R3	0,1798	179,80	0,27	1,63	0,91	0,91	1,16	0,65	0,65
	R4	0,1432	143,20	0,21	0,20	0,14	0,14	5,25	3,67	3,67
	MÉDIA						0,73			2,23
JASMONATO DE METILA 24 HS	C1	0,1243	124,30	0,19	0,12	0,10	0,10	1,61	1,30	1,30
	C2	0,0934	93,40	0,14	0,68	0,73	0,73	1,21	1,30	1,30
	C3	0,1665	166,50	0,25	0,35	0,21	0,21	0,18	0,11	0,11
	C4	0,1240	124,00	0,19	1,11	0,90	0,90	4,65	3,75	3,75
	MÉDIA						0,48			1,61
	F1	0,3341	334,10	0,50	2,54	0,76	0,76	1,74	0,52	0,52
	F2	0,4881	488,10	0,73	2,77	0,57	0,57	3,64	0,75	0,75
	F3	0,1744	174,40	0,26	1,46	0,84	0,84	0,87	0,50	0,50
	F4	0,3433	343,30	0,51	5,00	1,46	1,46	2,14	0,62	0,62
	MÉDIA						0,91			0,60
	R1	0,0922	92,20	0,14	4,87	5,28	5,28	1,35	1,46	1,46
	R2	0,1359	135,90	0,20	1,76	1,30	1,30	0,13	0,10	0,10
	R3	0,3906	390,60	0,59	5,31	1,36	1,36	35,20	9,01	9,01
	R4	0,9281	928,10	1,39	2,08	0,22	0,22	29,73	3,20	3,20
	MÉDIA						2,04			3,44
JASMONATO DE METILA	C1	0,1227	122,70	0,18	2,53	2,06	2,06	1,88	1,53	1,53
	C2	0,1431	143,10	0,21	1,14	0,80	0,80	2,36	1,65	1,65
	C3	0,2228	222,80	0,33	1,99	0,89	0,89	4,69	2,11	2,11

48 HS	C4	0,5409	540,90	0,81	2,71	0,50	0,50	16,09	2,97	2,97
	MÉDIA						1,06			2,07
	F1	0,1130	113,00	0,17	2,97	2,63	2,63	1,67	1,48	1,48
	F2	0,1834	183,40	0,28	3,26	1,78	1,78	0,10	0,05	0,05
	F3	0,2075	207,50	0,31	3,86	1,86	1,86	0,54	0,26	0,26
	F4	0,2815	281,50	0,42	2,91	1,03	1,03	5,00	1,78	1,78
	MÉDIA						1,82			0,89
	R1	0,3433	343,30	0,51	1,83	0,53	0,53	17,21	5,01	5,01
	R2	0,0823	82,30	0,12	3,02	3,67	3,67	5,60	6,80	6,80
	R3	0,0821	82,10	0,12	2,93	3,57	3,57	3,21	3,91	3,91
	R4	0,0930	93,00	0,14	2,71	2,91	2,91	3,31	3,56	3,56
	MÉDIA						2,67			4,82
JASMONATO	C1	0,2416	241,60	0,36		0,00	0,00		0,00	0,00
DE	C2	0,0916	91,60	0,14	3,15	3,44	3,44	0,15	0,16	0,16
METILA	C3	0,1015	101,50	0,15	2,49	2,45	2,45	0,32	0,32	0,32
72 HS	C4	0,1262	126,20	0,19	3,36	2,66	2,66	5,23	4,14	4,14
	MÉDIA						2,14			1,16
	F1	0,4189	418,90	0,63	1,34	0,32	0,32	1,38	0,33	0,33
	F2	0,1603	160,30	0,24	1,76	1,10	1,10	1,21	0,75	0,75
	F3	0,1499	149,90	0,22	2,49	1,66	1,66	2,45	1,63	1,63
	F4	0,1846	184,60	0,28	2,14	1,16	1,16	0,73	0,40	0,40
	MÉDIA						1,06			0,78

ANEXO 1 B – DOSAGEM DE QUASSINÓIDES – SALICILATO (24, 48 e 72 h)

DOSAGEM DE QUASSINÓIDES - ELICITAÇÃO

TRATAMENTOS	AMOSTRAS	Massa seca (g)	Massa seca (mg)	Massa Aplicada (ug)	ISOBRUCEÍNA			NEOSERGEOLIDA		
					1ª leitura	% 1ª leitura	MÉDIA	1ª leitura	% 1ª leitura	MÉDIA
	R1	0,1381	138,10	0,21	1,81	1,31	1,31	2,49	1,80	1,80
	R2	0,0862	86,20	0,13	2,92	3,39	3,39	2,81	3,26	3,26
	R3	0,1269	126,90	0,19	2,37	1,87	1,87	0,12	0,09	0,09
	R4	0,1688	168,80	0,25	5,05	2,99	2,99	2,47	1,46	1,46
	MÉDIA						2,39			1,66
SALICILATO DE METILA 24 HS	C1	0,1150	115,00	0,17	1,44	1,25	1,25	0,59	0,51	0,51
	C2	0,1019	101,90	0,15	1,55	1,52	1,52	3,01	2,95	2,95
	C3	0,1111	111,10	0,17	1,55	1,40	1,40	0,37	0,33	0,33
	C4	0,1720	172,00	0,26	4,29	2,49	2,49	1,65	0,96	0,96
	MÉDIA						1,67			1,19
	F1	0,1694	169,40	0,25	2,32	1,37	1,37	0,16	0,09	0,09
	F2	0,2400	240,00	0,36	1,65	0,69	0,69	0,82	0,34	0,34
	F3	0,2442	244,20	0,37	0,96	0,39	0,39	0,44	0,18	0,18
	F4	0,4826	482,60	0,72	0,11	0,02	0,02	1,88	0,39	0,39
	MÉDIA						0,62			0,25
	R1	0,1521	152,10	0,23	9,72	6,39	6,39	2,76	1,81	1,81
	R2	0,1304	130,40	0,20	6,56	5,03	5,03	1,36	1,04	1,04
	R3	0,0969	96,90	0,15	4,22	4,36	4,36	0,67	0,69	0,69
	R4	0,1045	104,50	0,16	4,53	4,33	4,33	0,33	0,32	0,32
	MÉDIA						5,03			0,97
SALICILATO DE METILA 48 HS	C1	0,1120	112,00	0,17	2,17	1,94	1,94	0,79	0,71	0,71
	C2	0,1248	124,80	0,19	5,66	4,54	4,54	1,02	0,82	0,82
	C3	0,1078	107,80	0,16	4,92	4,56	4,56	1,09	1,01	1,01
	C4	0,1155	115,50	0,17	1,94	1,68	1,68	2,21	1,91	1,91

	MÉDIA						3,18			1,11
	F1	0,2382	238,20	0,36	1,72	0,72	0,72	0,28	0,12	0,12
	F2	0,2226	222,60	0,33	1,99	0,89	0,89	0,72	0,32	0,32
	F3	0,1627	162,70	0,24	2,58	1,59	1,59	0,03	0,02	0,02
	F4	0,2465	246,50	0,37	2,42	0,98	0,98	1,49	0,60	0,60
	MÉDIA						1,05			0,27
	R1	0,1291	129,10	0,19	3,6	2,79	2,79	4,75	3,68	3,68
	R2	0,1912	191,20	0,29	0,36	0,19	0,19	15,46	8,09	8,09
	R3	0,1594	159,40	0,24	1,07	0,67	0,67	20,08	12,60	12,60
	R4	0,3204	320,40	0,48	2,36	0,74	0,74	24,99	7,80	7,80
	MÉDIA						1,10			8,04
SALICILATO	C1	0,1643	164,30	0,25	3,2	1,95	1,95	3,87	2,36	2,36
DE	C2	0,1884	188,40	0,28	3,52	1,87	1,87	13,10	6,95	6,95
METILA	C3	0,2006	200,60	0,30	1,57	0,78	0,78	10,37	5,17	5,17
72 HS	C4	0,2832	283,20	0,42	1,49	0,53	0,53	5,80	2,05	2,05
	MÉDIA						1,28			4,13
	F1	0,1611	161,10	0,24	2,19	1,36	1,36	19,42	12,05	12,05
	F2	0,3627	362,70	0,54	2,28	0,63	0,63	37,35	10,30	10,30
	F3	0,3236	323,60	0,49	3,10	0,96	0,96	33,00	10,20	10,20
	F4	0,5531	553,10	0,83	4,49	0,81	0,81	25,25	4,57	4,57
	MÉDIA						0,94			9,28

ANEXO 1 C – DOSAGEM DE QUASSINÓIDES – ÁCIDO SALICÍLICO (24, 48 e 72 h)

DOSAGEM DE QUASSINÓIDES - ELICITAÇÃO

TRATAMENTOS	AMOSTRAS	Massa seca (g)	Massa seca (mg)	Massa Aplicada (ug)	ISOBRUCEÍNA			NEOSERGEOLIDA		
					1ª leitura	% 1ª leitura	MÉDIA	1ª leitura	% 1ª leitura	MÉDIA
	R1	0,1084	108,40	0,16	0,78	0,72	0,72	0,55	0,51	0,51
	R2	0,1069	106,90	0,16	0,30	0,28	0,28	0,39	0,36	0,36
	R3	0,1535	153,50	0,23	6,52	4,25	4,25	1,49	0,97	0,97
	R4	0,2924	292,40	0,44	15,98	5,47	5,47	3,54	1,21	1,21
	MÉDIA						2,68			0,76
ÁCIDO SALICÍLICO 24 HS	C1	0,1379	137,90	0,21	1,49	1,08	1,08	0,31	0,22	0,22
	C2	0,0991	99,10	0,15	6,10	6,16	6,16	0,48	0,48	0,48
	C3	0,1288	128,80	0,19	0,20	0,16	0,16	2,06	1,60	1,60
	C4	0,2113	211,30	0,32	0,04	0,02	0,02	4,69	2,22	2,22
	MÉDIA						1,85			1,13
	F1	0,1258	125,80	0,19	1,17	0,93	0,93	3,05	2,42	2,42
	F2	0,1623	162,30	0,24	2,08	1,28	1,28	1,64	1,01	1,01
	F3	0,1895	189,50	0,28	3,91	2,06	2,06	2,43	1,28	1,28
	F4	0,4009	400,90	0,60	0,48	0,12	0,12	7,80	1,95	1,95
	MÉDIA						1,10			1,67
	R1	0,2745	274,50	0,41	3,00	1,09	1,09	13,93	5,07	5,07
	R2	0,1610	161,00	0,24	0,93	0,58	0,58	9,49	5,89	5,89
	R3	0,1388	138,80	0,21	0,73	0,53	0,53	6,95	5,01	5,01
	R4	0,1112	111,20	0,17	0,21	0,19	0,19	4,76	4,28	4,28
	MÉDIA						0,60			5,06
ÁCIDO SALICÍLICO 48 HS	C1	0,2813	281,30	0,42	1,10	0,39	0,39	22,73	8,08	8,08
	C2	0,1214	121,40	0,18	0,03	0,02	0,02	4,42	3,64	3,64
	C3	0,1733	173,30	0,26	0,68	0,39	0,39	3,43	1,98	1,98
	C4	0,1113	111,30	0,17	0,26	0,23	0,23	1,98	1,78	1,78

	MÉDIA					0,26			3,87	
	F1	0,6208	620,80	0,93	1,13	0,18	0,18	23,94	3,86	3,86
	F2	0,1969	196,90	0,30	3,25	1,65	1,65	15,39	7,82	7,82
	F3	0,2509	250,90	0,38	3,00	1,20	1,20	18,96	7,56	7,56
	F4	0,1114	111,40	0,17	4,44	3,99	3,99	8,83	7,93	7,93
	MÉDIA					1,75			6,79	
	R1	0,00	0,00	0,00	2,18	#DIV/0!	#DIV/0!	2,19	#DIV/0!	#DIV/0!
	R2	0,00	0,00	0,00	2,51	#DIV/0!	#DIV/0!	1,63	#DIV/0!	#DIV/0!
	R3	0,00	0,00	0,00	2,98	#DIV/0!	#DIV/0!	7,21	#DIV/0!	#DIV/0!
	R4	0,00	0,00	0,00	1,99	#DIV/0!	#DIV/0!	1,45	#DIV/0!	#DIV/0!
	MÉDIA					#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!	#DIV/0!
ÁCIDO SALICÍLICO 72 HS	C1	0,00	0,00	0,00	3,96	#DIV/0!	#DIV/0!	2,35	#DIV/0!	#DIV/0!
	C2	0,00	0,00	0,00	3,23	#DIV/0!	#DIV/0!	1,65	#DIV/0!	#DIV/0!
	C3	0,00	0,00	0,00	4,19	#DIV/0!	#DIV/0!	3,08	#DIV/0!	#DIV/0!
	C4	0,00	0,00	0,00	3,63	#DIV/0!	#DIV/0!	0,13	#DIV/0!	#DIV/0!
	MÉDIA	0,00	0,00	0,00		#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!	#DIV/0!
	F1	0,00	0,00	0,00	4,86	#DIV/0!	#DIV/0!	0,04	#DIV/0!	#DIV/0!
	F2	0,00	0,00	0,00	5,53	#DIV/0!	#DIV/0!	0,03	#DIV/0!	#DIV/0!
	F3	0,00	0,00	0,00	2,43	#DIV/0!	#DIV/0!	0,86	#DIV/0!	#DIV/0!
	F4	0,00	0,00	0,00	1,73	#DIV/0!	#DIV/0!	0,44	#DIV/0!	#DIV/0!
	MÉDIA	0,00	0,00	0,00		#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!	#DIV/0!

ANEXO 1 D – DOSAGEM DE QUASSINÓIDES – ELICITAÇÃO - CONTROLE

	R1	0,0427	42,70	0,06	0,94	2,20	2,20	0,06	0,14	0,14
	R2	0,0217	21,70	0,03	0,83	3,82	3,82	0,29	1,34	1,34
	R3	0,0566	56,60	0,08	0,98	1,73	1,73	2,57	4,54	4,54
	R4	0,0538	53,80	0,08	0,65	1,21	1,21	2,01	3,74	3,74
	MÉDIA						2,24			2,44
BRANCO	C1	0,0955	95,50	0,14	0,93	0,97	0,97	0,66	0,69	0,69
	C2	0,0234	23,40	0,04	0,86	3,68	3,68	0,01	0,06	0,06
	C3	0,0264	26,40	0,04	1,22	4,62	4,62	0,23	0,87	0,87
	C4	0,0300	30,00	0,05	0,84	2,80	2,80	0,85	2,83	2,83
	MÉDIA						3,02			1,11
	F1	0,0669	66,90	0,10	0,91	1,36	1,36	0,03	0,04	0,04
	F2	0,0581	58,10	0,09	1,01	1,74	1,74	1,20	2,07	2,07
	F3	0,1449	144,90	0,22	0,93	0,64	0,64	0,36	0,25	0,25
	F4	0,0938	93,80	0,14	0,61	0,65	0,65	0,08	0,09	0,09
	MÉDIA						1,10			0,61

ANEXO 2A – DOSAGEM DE QUASSINÓIDES - MUDAS DE REGENERAÇÃO

PARTE DA PLANTA: RAÍZES

AMOSTRAS	Massa seca (g)	Massa seca (mg)	Massa Aplicada (ug)	ISOBRUCEÍNA						NEOSERGEOLINA			
				1ª leitura	2ª leitura	% 1ª leitura	% 2ª leitura	MÉDIA	DESVIO	1ª leitura	replicata	% 1ª leitura	% 2ª
R1	0,6632	663,20	0,99	1,62	2,54	0,24	0,38	0,31	0,10	8,32	5,27	1,25	
R2	1,0399	1039,90	1,56	2,74	3,93	0,26	0,38	0,32	0,08	13,09	6,40	1,26	
R3	1,2220	1222,00	1,83	3,22	3,51	0,26	0,29	0,28	0,02	5,36	6,04	0,44	
R4	0,5504	550,40	0,83	0,74	3,44	0,13	0,63	0,38	0,35	2,95	2,00	0,54	
R5	1,1406	1140,60	1,71	2,51	3,88	0,22	0,34	0,28	0,08	5,26	5,33	0,46	
R6	0,9507	950,70	1,43	3,02	1,88	0,32	0,20	0,26	0,08	0,55		0,06	
R7	0,8280	828,00	1,24	1,46	1,08	0,18	0,13	0,15	0,03	5,09	2,76	0,61	
R8	2,6266	2626,60	3,94	4,58	5,75	0,17	0,22	0,20	0,03	9,06	3,51	0,34	
R9	0,1896	189,60	0,28	1,20	1,55	0,63	0,82	0,73	0,13	3,36	0,01	1,77	
R10	5,4429	5442,90	8,16	4,63	4,03	0,09	0,07	0,08	0,01	10,20	7,26	0,19	
R11	3,1008	3100,80	4,65	2,89	1,73	0,09	0,06	0,07	0,03	8,99	6,98	0,29	
R12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R13	2,1930	2193,00	3,29	1,85	2,86	0,08	0,13	0,11	0,03	1,90	3,81	0,09	
R14	0,4851	485,10	0,73	1,19	2,75	0,25	0,57	0,41	0,23	2,45	2,33	0,51	
R15	0,3761	376,10	0,56	1,93	3,05	0,51	0,81	0,66	0,21	0,85	2,39	0,23	

ANEXO 2B – DOSAGEM DE QUASSINÓIDES - MUDAS DE REGENERAÇÃO

LEITURA DAS PLACAS - MUDAS DE REGENERAÇÃO

PARTE DA PLANTA: CAULE

AMOSTRAS	Massa seca (g)	Massa seca (mg)	Massa Aplicada (ug)	ISOBRUCEÍNA						NEOSERGEOLIDA				
				1ª leitura	2ª leitura	% 1ª leitura	% 2ª leitura	MÉDIA	DESVIO	1ª leitura	replicata	% 1ª leitura	% 2ª leitura	MÉDIA
C1	0,5905	590,50	0,89	2,28	2,62	0,39	0,44	0,41	0,04	1,11	0,72	0,19	0,12	0,00
C2	0,8999	899,90	1,35	2,61	1,72	0,29	0,19	0,24	0,07	1,50	1,03	0,17	0,11	0,00
C3	0,5886	588,60	0,88		3,68	0,00	0,63	0,63	0,44	1,27	1,97	0,22	0,33	0,00
C4	0,7209	720,90	1,08	1,62		0,22	0,00	0,22	0,16	0,66		0,09	0,00	0,00
C5	1,1372	1137,20	1,71	0,96		0,08	0,00	0,08	0,06	4,02		0,35	0,00	0,00
C6	0,8226	822,60	1,23	1,48		0,18	0,00	0,18	0,13	4,61		0,56	0,00	0,00
C7	0,7776	777,60	1,17	2,27		0,29	0,00	0,29	0,21	1,11		0,14	0,00	0,00
C8	1,6485	1648,50	2,47	1,57		0,10	0,00	0,10	0,07	5,87		0,36	0,00	0,00
C9	0,1270	127,00	0,19	0,22	1,95	0,17	1,54	0,85	0,96	0,38	1,27	0,30	1,00	0,00
C10	1,6537	1653,70	2,48	1,63	3,94	0,10	0,24	0,17	0,10	1,18	1,74	0,07	0,11	0,00
C11	1,5754	1575,40	2,36	1,62	0,99	0,10	0,06	0,08	0,03	2,99	2,41	0,19	0,15	0,00
C12	2,8552	2855,20	4,28	3,47	3,24	0,12	0,11	0,12	0,01	3,47	1,72	0,12	0,06	0,00
C13	0,9690	969,00	1,45	1,94	1,61	0,20	0,17	0,18	0,02	1,23	0,65	0,13	0,07	0,00
C14	1,5750	1575,00	2,36	1,31		0,08	0,00	0,04	0,06	4,84		0,31	0,00	0,00
C15	0,4717	471,70	0,71	1,95		0,41	0,00	0,21	0,29	0,74		0,16	0,00	0,00

ANEXO 2C – DOSAGEM DE QUASSINÓIDES - MUDAS DE REGENERAÇÃO

LEITURA DAS PLACAS - MUDAS DE REGENERAÇÃO

PARTE DA PLANTA: FOLHAS

AMOSTRAS	Massa seca (g)	Massa seca (mg)	Massa Aplicada (ug)	ISOBRUCEÍNA						NEOSERGEOLIDA				
				1ª leitura	2ª leitura	% 1ª leitura	% 2ª leitura	MÉDIA	DESVIO	1ª leitura	replicata	% 1ª leitura	% 2ª leitura	MÉDIA
F1	0,2422	242,20	0,36	1,04		0,43	0,00	0,21	0,30	2,13		0,88	0,00	0,44
F2	0,3160	316,00	0,47	1,68		0,53	0,00	0,27	0,38	7,13		2,26	0,00	1,13
F3	0,1650	165,00	0,25	1,34		0,81	0,00	0,41	0,57	7,81		4,73	0,00	2,37
F4	0,1514	151,40	0,23	1,11		0,73	0,00	0,37	0,52	4,04		2,67	0,00	1,33
F5	0,1922	192,20	0,29	1,36	1,29	0,71	0,67	0,69	0,03	0,15	1,49	0,08	0,78	0,43
F6	0,6404	640,40	0,96	1,52	1,71	0,24	0,27	0,25	0,02	0,72	0,86	0,11	0,13	0,12
F7	0,3878	387,80	0,58	1,23	1,85	0,32	0,48	0,40	0,11	0,91	1,33	0,23	0,34	0,29
F8	0,6334	633,40	0,95	1,33	1,08	0,21	0,17	0,19	0,03	0,70	2,77	0,11	0,44	0,27
F9	0,1803	180,30	0,27	1,70	1,72	0,94	0,95	0,95	0,01	1,91	0,16	1,06	0,09	0,57
F10	1,1838	1183,80	1,78	1,48		0,13	0,00	0,06	0,09	0,86		0,07	0,00	0,04
F11	0,3006	300,60	0,45	0,92		0,31	0,00	0,15	0,22	2,39		0,80	0,00	0,40
F12	1,4032	1403,20	2,10	1,90		0,14	0,00	0,07	0,10	2,98		0,21	0,00	0,11
F13	0,8755	875,50	1,31	1,62		0,19	0,00	0,09	0,13	3,67		0,42	0,00	0,21
F14	0,5641	564,10	0,85	2,32		0,41	0,00	0,21	0,29	3,12		0,55	0,00	0,28
F15	0,1413	141,30	0,21	0,39		0,28	0,00	0,14	0,20	1,49		1,05	0,00	0,53