

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
MINAS GERAIS

MARIA GESSI TEIXEIRA

Uso do ácido salicílico e do ácido jasmônico na produção de metabólitos secundários no cultivo de calos de Bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.)

Alfenas/MG
2016

Maria Gessi Teixeira

Uso do ácido salicílico e do ácido jasmônico na produção de metabólitos secundários no cultivo de calos de Bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG.

Orientador: Prof. Dr. Breno Regis Santos
Coorientadora: Dr^a. Marília Carvalho

Alfenas/MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Teixeira, Maria Gessi.

Uso do ácido salicílico e ácido jasmônico na produção de metabólitos secundários no cultivo de calos de Bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.) / Maria Gessi Teixeira. – Alfenas - MG, 2016.

87 f.

Orientador: Breno Régis Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Compostos bioativos. 2. Plantas medicinais. 3. Compostos Fenólicos. 4. Flavonoides. 5. Curva de crescimento. I. Santos, Breno Régis. II. Título.

CDD-660.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1449 (Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



MARIA GESSI TEIXEIRA

“Uso de ácido salicílico e ácido jasmônico na produção de metabólitos secundários no cultivo de calos de Bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.)”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 02 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Breno Régis Santos

Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: _____

Prof. Dr. Douglas José Marques

Instituição: UNIFENAS

Assinatura: _____

Prof. Dr. Wellington Marota Barbosa

Instituição: IFSULDEMINAS

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Breno Régis Santos, pela dedicação, pelos ensinamentos e por ter me animado e incentivado tanto.

A minha coorientadora Dr^a. Marília Carvalho, pela amizade, paciência e por ter dedicado tamanho tempo para me ajudar.

Ao Prof. Sandro Barbosa, por colaborar com o trabalho e estar sempre disposto a tirar minhas dúvidas, me explicando com toda paciência.

Ao Prof. Plínio Rodrigues dos Santos Filho, que tanto me ajudou e me ensinou das complicadas questões da bioquímica.

Aos estudantes Milena Rocha, Marco Aurélio Leite e tantos outros que me ajudaram a conduzir a parte prática deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Biogen, por tornar os trabalhos de bancada mais agradáveis e divertidos.

Ao Prof. Marcelo Henrique dos Santos da UFV que forneceu as sementes de Bacupari.

Ao Prof. José Marcello Salabert de Campos UFJF, por receber a mim e minhas colegas em seu departamento e nos ensinar sobre citometria de fluxo.

A Natália de Freitas Chagas, pela ajuda nas análises histológicas.

Ao Prof. Wellington Marota Barbosa, por ter dado todo apoio para eu fazer este mestrado.

Ao IFSULDEMINAS e a CAPES (AUX-PE 2297/2011).

A toda minha família e, principalmente, a minha filha Dora, pelo apoio e pela compreensão.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa jornada que resultou neste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO GERAL

A *Garcinia brasiliensis*, conhecida como Bacupari, é uma espécie que se destaca por apresentar metabólitos secundários com várias atividades biológicas. Porém, na natureza a produção destes compostos é muito pequena. Para aumentar a produção de metabólitos secundários, de interesse econômico ou medicinal, vem sendo estudadas estratégias biotecnológicas como produção destes compostos *in vitro*. A adição de elicitores, tais qual o ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (AJ), no meio de cultura em cultivo de células pode ser uma alternativa para maximizar a produção destes compostos. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito elicitor do AS e do AJ na produção de compostos fenólicos e flavonoides totais em calos de embriões zigóticos de *G. brasiliensis*. Para calogênese foram testadas diferentes combinações da 2-iP (0; 9; 18; 36; 72 μM e 2,4-D (0; 2,05; 10,26; 18,47; 28,73 μM) em meio de cultura Wood Plant Medium (WPM). Cortes de calos com 20 dias foram corados com azul de toluidina e lugol para avaliações histológicas. As áreas cobertas por calos nos explantes foram medidas por meio do programa ImageJ[®]. Para indução da produção de compostos fenólicos e flavonoides totais os calos foram subcultivados em meio WPM contendo AS (0,1; 1; 10; 100 μM) na ausência de 2-iP e 2,4-D e AS (0,1; 1; 10; 100 μM) com presença de 72 μM de 2-iP e 28,73 μM de 2,4-D e AJ nas concentrações 0,1; 1; 10; 100 μM . Os calos ficaram incubados por 150 dias, a 25° C e ausência de fotoperíodo. A cada 30 dias, calos foram submetidos à análise de conteúdo de fenólicos e flavonoides totais. Para determinação da cinética dos calos, estes foram pesados a cada 30 dias (para tratamentos com AS) e 15 dias (para tratamentos com AJ), traçando-se a curva de crescimento. Os calos com 30 e 90 dias de incubação foram analisados quanto ao teor de fukugetina e 7-epiclusianona. Ao fazer as avaliações histológicas pode-se notar que as células dos calos expostos as concentrações que proporcionaram maior calogênese (72 μM de 2-iP com 28,73 μM de 2,4-D) se mostraram de tamanhos bem variados e com espaço intercelular, caracterizando um tecido desorganizado. Quanto a área dos calos, constatou-se que o tratamento que melhor proporcionou calogênese foi 72 μM de 2-iP com 28,73 μM de 2,4-D. Na elicitação, altas concentrações de AS (10 e 100 μM) e maior tempo de exposição (120 e 150 dias) não implicaram maior acúmulo de compostos fenólicos e flavonoides totais. A concentração de 0,1 μM de AS foi eficiente na produção de fukugetina e 7-epiclusianona quando os calos ficam expostos 30 dias em meio de cultura. Porém, quando o AS foi adicionado ao meio juntamente com 2-iP e 2,4-D, a concentração que mais elicitou à

produção de fukugetina e 7-epiclusianona foi 10 μM de AS com 90 dias de exposição. A concentração de 0,1 μM de AJ promoveu o incremento da massa dos calos de *G. brasiliensis* e, com aumento do tempo de exposição, foi favorável a produção de fenóis e de flavonoides. As maiores concentrações testadas de AJ (10 e 100 μM) foram as mais eficientes na estimulação da produção da fukugetina e 7-epiclusianona quando os calos permaneceram 90 dias expostos ao elicitador. Para a produção de fukugetina, a condição mais favorável foi a exposição por 30 dias em meio de cultura WPM contendo 10 μM de AJ. Enfim, pode-se concluir que para obter melhor calogênese em embriões de Bacupari é necessário altas concentrações de 2-iP e 2,4-D. O AS e o AJ demonstraram serem elicitores abióticos eficiente na otimização de metabólitos secundários em calos de *G. brasiliensis*. Levando em consideração a curva de crescimento dos calos de Bacupari, pode-se concluir que o melhor período para a extração dos metabólitos secundários dos calos de *G. brasiliensis* foi o início da fase estacionária.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Plantas medicinais. Calogênese. Fenólicos. Flavonoides. Fukugentina. 7-epiclusianona. Curva de crescimento.

ABSTRACT

Garcinia brasiliensis, known as Bacupari, is a species that stands out for presenting secondary metabolites with different biological activities. However, the nature of the production thereof is very small. To increase production of secondary metabolites, economic and medical interest, biotechnological strategies have been studied as production of these compounds *in vitro*. The addition of elicitors, such that salicylic acid (SA) and jasmonic acid (AJ), in the culture medium for cell culture may be an alternative to maximize the production of these compounds. In this context, the work was to evaluate the effect of elicitor AS and AJ in the production of phenolics and total flavonoids in callus of zygotic embryos of *G. brasiliensis*. For callus induction were tested different combinations of 2-iP (0; 9; 18; 36; 72 μM) and 2,4-D (0; 2.05; 10.26; 18.47; 28.73 μM) in the medium of culture Wood Plant Medium (WPM). Callus with 20 days were stained with toluidine blue and lugol for histological evaluation. The areas covered by callus on explants were measured through ImageJ® program. For induction of phenolic compounds and total flavonoid callus were subcultured on WPM containing AS (0.1, 1, 10, 100 μM) in the absence of 2-iP and 2,4-D and AS (0.1, 1, 10, 100 μM) with presence of 72 μM 2-iP and 28.73 μM of 2,4-D and AJ in concentrations 0.1, 1, 10; 100 μM . The callus were incubated for 150 days at 25 ° C and absence of photoperiod. Every 30 days, callus were subjected to phenolic content analysis and total flavonoid. To determine the kinetics of calluses, these were weighed every 30 days (for treatments with AS) and 15 days (for treatments AJ) to the growth curve. Callus with 30 and 90 days of incubation were analyzed for content of fukugetin and 7-epiclusianone. By making the histological evaluations can be noted that the cells of calluses exposed to the conditions that gave greater callus formation (72 μM of 2-iP with 28.73 μM of 2,4-D) have proved very varied sizes and intercellular space, featuring a disorganized tissue. The area of callus, it was found that the treatment gave better callus induction was 72 μM 2-iP with 28.73 μM 2,4-D. In elicitation, high concentrations of AS (10 and 100 μM) and longer exposure time (120 and 150 days) did not entail greater accumulation of phenolic compounds and total flavonoids. The concentration of 0.1 μM AS was efficient in producing fukugetina and 7-epiclusianone in callus when they are exposed 30 days in culture medium. But when the AS was added to the medium with 2-iP and 2,4-D, the concentration that elicited the production of more fukugetina and 7-epiclusianone was 10 μM AS with 90 days of exposure. The concentration of 0.1 μM AJ promoted the increase of the mass of calluses and *G. brasiliensis*, increasing the exposure

time was favorable production of phenols and flavonoids. The highest concentrations tested AJ (10 and 100 μM) were more efficient in stimulating the production of fukugetina and 7-epiclusianone when the calli 90 days remained exposed to the elicitor. For the production of fukugetin, the most favorable condition for the exposure was 30 days in WPM containing 10 μM of AJ. Anyway, it can conclude that for better callus induction in Bacupari embryos is necessary high concentrations of 2-iP and 2,4-D. The AS and AJ shown to be effective abiotic elicitors on the optimization of secondary metabolites in callus of *G. brasiliensis*. Taking into account the growth curve of bacupari callus, it can be concluded that the best period for the extraction of secondary metabolites of *G. brasiliensis* callus was the early stationary phase.

Keywords: Bioactive compounds. Medicinal plants. Callus formation. Phenolic. Flavonoids. Fukugentin. 7-epiclusianone. Growth curve.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4-D	- ácido 2,4-diclorofenoxilacético
2-iP	- 2-Isopenteniladenina
AJ	- ácido jasmônico
AS	- ácido salicílico
B.O.D.	- câmara de germinação (Biochemical Oxygen Demand)
BAP	- 6-benzilaminopurina
FAA	- formaldeído, ácido acético e etanol
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid chromatography)
MS	- meio de cultura Murashige e Skoog
PAL	- fenilalanina amônia liase
pH	- potencial hidrogeniônico
UV	- ultra violeta
v.v⁻¹	- volume por volume
WPM	- meio de cultura Wood Plant Medium
µg.mg⁻¹MS	- micrograma por miligrama de massa seca de extrato
µM	- micromolar

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Introdução geral.....	12
1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1	<i>Garcinia brasiliensis</i> : ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA	14
1.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS.....	15
1.2.1	Compostos fenólicos e flavonóides.....	16
1.2.2	Produção de metabólitos secundários <i>in vitro</i>.....	17
1.3	USO DE ELICITORES NA INDUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	18
1.3.1	Ácido salicílico como indutor da produção se compostos fenólicos e flavonoides totais.....	19
1.3.2	Ácido jasmônico como indutor de compostos fenólicos e flavonoides totais.....	20
	REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 2	Efeito do 2-iP e 2,4-D na calogênese em embriões zigóticos de <i>Garcinia brasiliensis</i>.....	28
1	INTRODUÇÃO.....	28
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1	INFLUÊNCIA DO 2-IP E 2,4-D NA INDUÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.....	33
3.2	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E HISTOUÍMICAS.....	35
4	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3	Efeito elicitor do ácido salicílico na produção de metabólitos secundários em calos de <i>Garcinia brasiliensis</i>.....	45
1	INTRODUÇÃO.....	45
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1	CALOGÊNESE DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE BACUPARI.....	47
2.2	INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	47
2.2.1	Utilização de Ácido Salicílico como Elicitor	48

2.2.2	Ausência de 2,4-d e 2-iP	48
2.2.3	Presença de 2,4-D e 2-iP	48
2.3	ENSAIOS FITOQUÍMICOS	48
2.3.1	Preparo dos extratos	49
2.3.2	Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos	49
2.3.3	Determinação do conteúdo de flavonoides totais	50
2.4	CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS	50
2.5	DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA FUKUGENTINA E 7-EPICLUSIANONA	50
2.6	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DNA E NÍVEL DE PLOIDIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	51
2.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1	USO DO ÁCIDO SALICÍLICO COMO ELICITOR	52
3.2	USO DO ÁCIDO SALICÍLICO COMO ELICITOR E AUSÊNCIA DE 2-IP E 2,4-D	52
3.2.1	Teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e curva de crescimento	52
3.3	CONTEÚDO DE FUKUGETINA E 7-EPICLUSIANONA NA AUSÊNCIA DE 2IP E 2,4-D	56
3.4	USO DO ÁCIDO SALICÍLICO COMO ELICITOR E PRESENÇA DE 2-IP E 2,4-D	57
3.4.1	Teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e curva de crescimento	58
3.5	CONTEÚDO DE FUKUGETINA E 7-EPICLUSIANONA	62
3.6	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DNA E NÍVEL DE PLOIDIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	63
4	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO 4 Indução da produção de metabólitos secundários em calos de <i>Garcinia brasiliensis</i> usando ácido jasmônico como elicitor		71
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1	CALOGÊNESE DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE BACUPARI	73
2.2	ENSAIOS FITOQUÍMICOS	74

2.2.1	Preparo dos extratos	74
2.2.2	Determinação do conteúdo totaça de compostos fenólicos	74
2.2.3	Determinação do conteúdo total dos flavonoides totais	75
2.3	CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS.....	75
2.4	DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUKUGENTINA E 7- EPICLUSIANONA.....	75
2.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	76
3	RESULTADO E DISCUSSÃO	77
3.1	USO DOO ÁCIDO JASMÔNICO COMO ELICITOR	77
3.2	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES TOTAIS E CURVA DE CRESCIMENTO.....	77
3.3	CONTEÚDO DE FUKUGENTINA E 7-EPICLUSIANONA.....	82
4	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	84

CAPÍTULO 1 Introdução geral

A *Garcinia brasiliensis* Mart., conhecida como Bacupari (MARTINS et al., 2011), é uma espécie nativa da região amazônica e cultivada em todo território brasileiro (COELHO et al., 2008). Esta planta destaca-se por apresentar compostos com várias atividades biológicas, tais como propriedade anti-anafilática (NEVES et al., 2007), propriedade anti-HIV (REUTRAKUL, 2007), atividade antimicrobiana (NALDONI et al., 2009), antitumoral (CUNHA, 2014), anti-inflamatória, efeito antiproliferativo em células de câncer humano, agente anticárie e antiplaca bacteriana (MURATA et al., 2010), atividade leishmanicida (PEREIRA et al., 2011) e esquitossomicida (CASTRO et al., 2015).

As evidências de que plantas, como a *G. brasiliensis*, possuem compostos secundários de interesse, somadas a grande busca atual na utilização de produtos naturais com aplicações medicinais e as pequenas quantidades normalmente existentes nas plantas, como também as preocupantes consequências ambientais geradas pela coleta predatória e indiscriminada das plantas em seu habitat, realçam o interesse pela utilização das tecnologias de cultura de células de plantas (FUMAGALI et al., 2008).

Para aumentar a produção desses metabólitos secundários, de interesse econômico ou medicinal, vem sendo estudadas estratégias como a adição de elicitores, como o ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (AJ), no meio de cultura em cultivo de células *in vitro* (DIOS-LOPEZ et al., 2011; LARGIA et al., 2015; PEREZ-ALONSO et al., 2014; PITTA-ALVAREZ et al., 2000; SAHU et al., 2013).

Tanto o AS quanto o AJ são hormônios que atuam na defesa da planta contra insetos biotrópicos e necrotrópicos, respectivamente (PIETERSE et al., 2012). Ambas as moléculas também foram usadas para otimizar a produção de uma variedade de metabólitos secundários em um grande número de variedade de plantas, tais como antocianinas em culturas de calos de *Rosa hybrida* (RAM et al., 2013), ácido romarínico na cultura *in vitro* de *Solenostemon scutellarioides* (SAHU et al., 2013), isoflavonas em cultura de raiz de soja (THEBORAL et al., 2014), terpenoides em culturas de células em suspensão de *Catharanthus roseus* (SAIMAN et al., 2014) e compostos fenólicos e flavonoides totais em cultura de raiz adventícias de *Eleutherococcus koreanum* (LEE; PARK; PAEK, 2015).

Os estímulos externos por elicitores são capazes de provocar alterações na célula vegetal que conduzem a uma série de reações, favorecendo eficientemente o acúmulo de metabólitos secundários. Eles ligam-se a uma proteína do receptor na membrana

plasmática, que eventualmente ativam genes em particular, como parte da resposta de defesa através de vias de transdução de sinal, o que resulta na síntese de metabólitos secundários (SUDHA; RAVISHANKAR, 2002).

Dentre os principais metabólitos secundários com atividades bioativas destacam-se os compostos fenólicos (GUPTA et al., 2010). Os fenólicos são caracterizados por possuírem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). São classificados em função do número de anéis fenólicos e dos elementos químicos que se ligam a esses anéis. Estes compostos são constituídos por uma vasta diversidade de substâncias que são divididas em classes, como por exemplo, ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (MANACH et al., 2004).

Há muitos estudos que pesquisam a produção de metabólitos secundários na cultura de calos (BARRIOS et al., 2009; BELCHÍ-NAVARRO et al., 2011; CASTRO et al., 2016; DIOS-LÓPEZ et al., 2011). Calos são massas celulares em grande parte desorganizadas e não diferenciadas, que crescem a partir de órgãos ou tecidos vegetais em condições estéreis (GEORGE, 2008).

Para um bom entendimento do desenvolvimento dos calos, é necessário estipular a cinética de crescimento dos calos (FEITOSA et al., 2013). Normalmente, os metabólitos secundários são encontrados nos calos, em maiores concentrações, quando não há síntese de biomassa, sendo portanto, a fase estacionária o período em que estes compostos são sintetizados mais ativamente (BOURGAUD et al., 2001).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a alteração na produção de compostos fenólicos e flavonoides totais em calos de *G. brasiliensi* utilizando como elicitador o ácido salicílico e o ácido jasmônico.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

A seguir, é apresentada uma revisão de literatura dos temas abordados nesta dissertação, com intuito de gerar embasamento teórico para a análise e discussão dos resultados.

1.1 *Garcinia brasiliensis*: ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA

A *G. brasiliensis* é nativa da Amazônia, pertence a família Clusiaceae. Tem crescimento muito lento, apresenta os primeiros dois pares de folhas, em média, com 244 dias após a germinação. O fruto é indeiscente, do tipo bacoide campomanesoidio, arredondado, com estaminódios persistentes. A polpa que envolve as sementes é alva, adocicada e escassa. As sementes são elipsoides, marrons com linhas longitudinais mais claras e, internamente são amarelas e exsudam látex. As sementes apresentam dispersão zoocórica (CORREIA; LIMA; SILVA, 2013). É uma árvore de tamanho médio (9 a 14 m), piramidal e tem forma de circular a semicircular. Suas folhas são de tamanho grande a médio. As flores aparecem isoladas ou em grupo, e tem pedúnculo curto. O estigma é redondo a elipsoide e floresce de agosto a setembro (FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004). A *G. brasiliensis* é conhecida como bacuri, bacuripari, bacupari e bacopari (FIGUEIREDO; LEITÃO-FILHO; BEGOSSI, 1993). A planta é apogâmica, com sementes agamospérmicas que são usadas como emplasto em ferimentos em comunidades tradicionais no Rio de Janeiro, na Amazônia e São Paulo. Seu caule e a casca são infundidos ou macerados e usados como laxante ou contra dermatite. A resina é usada contra doenças de pele e feridas (AGRA; FREITAS; BARBOSA FILHO, 2007).

O gênero *Garcinia* tem demonstrado pelos estudos fitoquímicos, ser possuidor de uma grande diversidade de metabólitos secundários como os compostos fenólicos (benzofenonas, xantonas e flavonoides). Muitos desses compostos são princípios ativos com propriedades farmacológicas contra várias doenças (SANTA-CECILIA et al., 2013; SANTOS FILHO et al., 2014).

Plantas da família Clusiaceae possuem alguns compostos (xantonas, cumarinas, biflavonoides e benzofenonas) que apresentam propriedades antiinflamatória, antioxidante,

anticonvulsiva e citotóxica. Tais compostos são importantes para a elaboração de possíveis medicamentos que possuam propriedades farmacológicas já identificadas, com ação na terapêutica de diversas doenças, como câncer, mal de Alzheimer e Parkinson (SANTOS FILHO et al., 2013).

1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS

As plantas possuem a capacidade de produzir diversidades de moléculas orgânicas de grande complexidade estrutural como os metabólitos secundários, também chamados de compostos especiais. Vários desses compostos são por elas empregados em combate de agentes patogênicos e herbívoros; outros têm uma função crucial na proteção da planta contra agentes abióticos, como os raios ultravioletas. Muitas dessas substâncias químicas produzidas pelas plantas despertam grande interesse tanto do ponto de vista agrícola como no que se refere a sua atividade farmacológica (PEIXOTO NETO; CAETANO, 2005).

Os metabólitos secundários são substâncias não utilizadas pelo metabolismo básico (crescimento, respiração, fotossíntese) e produzidas em quantidade muito pequena pelas plantas (CROTEAU et al., 2000). Embora todos os organismos usem os mesmos tipos de metabólitos primários, as plantas podem diferenciar-se completamente em seus metabólitos secundários. Há mais de 10 mil metabólitos secundários vegetais conhecidos. Alguns são produzidos por uma única espécie, enquanto outros são característicos de gêneros ou mesmo de famílias (SADAVA et al., 2009). Essas substâncias podem ter função protetora para planta e, em alguns casos, serem usadas para atrair polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Por possuírem extensas atividades biológicas, os metabólitos secundários de plantas são utilizados há séculos na medicina popular e nos dias atuais, como medicamentos, cosméticos, matéria prima para as indústrias químicas e farmacêuticas, nas áreas de alimentos, agrônômica, perfumaria e outras (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

1.2.1 Compostos fenólicos e flavonoides

Compostos fenólicos são sintetizados pelas plantas muitas vezes como defesa a pressões ecológicas e fisiológicas como patógenos e ataque de insetos, radiação ultra violeta (UV) e ferimentos (NAPAL et al., 2010). Compostos fenólicos de plantas são classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base no número de unidades de fenol na molécula. Assim, compreendem fenóis simples, cumarinas, linhanos, linhinas, taninos condensados e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonoides (SOTO-VACA et al., 2012).

Os principais compostos fenólicos encontrados em plantas da família Clusiaceae são xantonas, cumarinas, biflavonoides e benzofenonas, cujos constituintes são biossintetizados em função de mecanismos de defesa da planta (ACUÑA et al., 2009).

Os flavonoides compreendem o mais comum grupo de compostos fenólicos de plantas. Mais de 5000 flavonoides diferentes já foram descritos (ROSS; KASUM, 2002).

Devido a sua ação antioxidante, os flavonoides têm sido associados a resultados benéficos à saúde humana. Diversos estudos epidemiológicos evidenciam que o consumo elevado de flavonoides ajuda a proteger contra doenças crônicas, como as cardiovasculares (PEREIRA; CARDOSO, 2012). No entanto, a maioria das plantas produz quantidades muito pequenas deste composto (SÉVENIER, 2002). Os flavonoides são subdivididos em vários grupos, tais como: antocianinas, flavonóis, flavonas, flavanonas e benzofenonas (ROSS; KASUM, 2002).

As Benzofenonas como a 7-epiclusianona e o biflavonoide fukugetina (ou morelloflavone) foram identificadas em extratos etanólicos de folhas de *G. brasiliensis* (SANTA-CECÍLIA et al., 2012).

A 7-epiclusianona é uma benzofenona tetraprenilada que apresenta várias atividades biológicas como efeito vasodilatador do endotélio (CRUZ et al., 2006), efeito antianafilático (NEVES et al., 2007), anti-HIV (PICCINELLI et al., 2005), antimicrobial (ALMEIDA et al., 2008; MURATA et al., 2010; NALDONI et al., 2009), antiespasmódico (COELHO et al., 2008), e atividades leishmanicidas (PEREIRA et al., 2010) e esquistossomicida (CASTRO et al., 2015).

A 7-epiclusianona é encontrada em abundância em extratos da casca e da semente de Bacupari. Este composto mostrou-se eficiente tanto quanto à clorexidina (antibiótico sintético mais forte usado pelos dentistas) além de possuir a vantagem de que a

substância natural pode apenas matar as bactérias que causam doenças na boca, não escurece os dentes, não tem cheiro, nem gosto ruim (MURATA, 2010).

Testes *in vitro* mostraram que a fukugetina é um potente inibidor de *Trypanosoma cruzi* (ASSIS et al., 2012; GONTIJO et al., 2015) e *Leishmania amazonensis* (PEREIRA et al., 2011). Possui atividade contra algumas bactérias gram-positivas como a *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* (VERDI et al., 2004). Há também comprovação que esta molécula inibe a tirosinase, enzima envolvida na formação de melanina (MASUDA et al., 2005) como também a cisteína e aserina (PEREIRA et al., 2011), além de possuir atividade anti-inflamatória e anti-oxidante (ARWA et al., 2015; OTUKI et al., 2011). Em testes com camudongo, a fukugetina inibiu o crescimento de tumores relacionados ao câncer de próstata (PANG et al., 2009).

Dentre os biflavonoides, a fukugetina é o representante mais frequente nas espécies do gênero *Garcinia*. Este grupo de metabólito secundário é empregado como marcador quimiosistemático da família Clusiaceae (FERREIRA; CARVALHO; SILVA, 2012).

1.2.2 Produção de metabólitos secundários *in vitro*

Nas plantas *in vivo*, os metabólitos secundários são produzidos em quantidades muito pequenas e geralmente é de difícil extração (FUMAGALI et al., 2008). Para isso, a cultura de células vegetais *in vitro* vem sendo empregada para a produção de metabólitos secundários de interesse. Estudos realizados com diferentes espécies têm demonstrado que vários fatores influenciam a produção *in vitro* de metabólitos secundários, como os fatores químicos (composição salina do meio de cultura, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH, composição, reguladores de crescimento), fatores biológicos (tipos e condição fisiológica dos explantes, características genéticas), e fatores físicos (temperatura, luminosidade, fotoperíodo) (GORELICK; BERNSTEIN, 2014).

Do ponto de vista ecológico e econômico, pesquisas visando à produção destes metabólitos secundários em cultura *in vitro* são vantajosas. As culturas de células de plantas podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos secundários dentro de um período de cultivo de duas semanas. Isto é muito favorável em relação à produção na planta *in vivo*, para

as quais o espaço de tempo para o acúmulo destes metabólitos pode variar de uma estação para plantas anuais ou diversos anos no caso das plantas perenes (CROTEAU et al., 2000).

Diferentes compostos com atividades biológicas vêm sendo encontrados em culturas *in vitro* tais como os flavonoides e os estilbenos (MANEECHAI et al., 2012), esteróides (LOREDO-CARRILLO et al., 2013), cardenolídeos (SAHIN; VERMA; GUREL, 2013), ácidos fenólicos (SZOPA; EKIERT, 2014) e benzofenóis em *Byrsonima verbascifolia* (CASTRO et al., 2016). A cultura de tecido de plantas *in vitro* tem vantagens na obtenção de compostos bioativos, com um sistema definido de produção e em períodos curtos, assegurando um suplemento contínuo de metabólitos de interesse. Além disso, esta técnica também pode permitir a produção de novos compostos que normalmente não são encontrados na planta *in vivo* (LOREDO-CARRILLO et al., 2013).

Muitos metabólitos secundários podem ser obtidos na cultura de calos (BARRIOS et al., 2009; CASTRO et al., 2016; LAKHOTIA et al., 2014; LINGAKUMAR, ASHA E VAIRAMATHI, 2014).

O calo é um sistema de células pouco diferenciadas e não organizadas. Pode ser obtido a partir da cultura *in vitro* de fragmento de tecido ou órgão vegetal isolado da planta-mãe, cultivado em meio de cultura contendo reguladores de crescimento exógenos (TERMIGNONI, 2005).

Ao usar a técnica de produção de compostos secundários em calos é importante conhecer a cinética do crescimento destes para saber em qual fase da calogênese há maior produção de metabólitos secundários. Segundo BOURGAUD et al., 2001, os metabólitos secundários são encontrados em maiores concentrações na fase em que não há crescimento dos calos, fase estacionária ou platô. Quando não há produção de biomassa os metabólitos secundários são sintetizados mais ativamente.

A diminuição da produção de metabólitos secundários na fase em que há crescimento muito ativo de calos pode ser explicada pela alocação de carbono estar distribuída preferencialmente com o metabolismo primário. Assim, quando o crescimento pausa, altas quantidades de carbono não são mais necessárias para o metabolismo primário e os compostos secundários podem ser sintetizados (MACHADO et al., 2006).

1.3 USO DE ELICITORES NA INDUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Para a utilização de técnicas como a produção de metabólitos secundários *in vitro* é fundamental a determinação dos fatores que interferem na síntese dos metabólitos, por

exemplo, o emprego de metodologias utilizando elicitores no meio de cultivo com a finalidade de incrementar a produção de compostos de interesse (ZABALA et al., 2009).

A elicitação consiste na estimulação de um estresse químico ou físico nas células para induzir a produção de metabólitos secundários que frequentemente não são produzidos. Existe grande quantidade de elicitores que, conforme suas origens podem ser classificados em bióticos e abióticos. Elicitores abióticos: sais de metais pesados, radiação UV, ozônio, estresse térmico e osmótico. Elicitores bióticos: extrato de levedura, ácido salicílico, etileno, quitina, micélios de fungos patogênicos e jasmonatos (ZHAO, DAVIS E VERPOORTE, 2005). Normalmente os elicitores atuam reduzindo o tempo necessário para se conseguir altas concentrações do produto de interesse (FUMAGALI et al., 2008).

O emprego de elicitores é atualmente o método mais comum para aumentar a produção de metabólitos secundários em cultivos *in vitro* de células vegetais. Naturalmente os elicitores estimulam pontualmente a produção de metabólitos secundários devido, principalmente, ao ataque de patógenos. No cultivo de células *in vitro* a resposta é global, o elicitor entra em contato com toda a biomassa celular, portanto, neste caso a quantidade total de metabólitos sintetizados é muito maior que nas plantas (GIRI; ZAHEER, 2016).

1.3.1 Ácido salicílico como indutor da produção de compostos fenólicos e flavonoides totais

O ácido salicílico (AS) é um elicitor que age como um mensageiro que ativa a resistência contra patógenos incluindo a síntese de proteínas que são enzimas que degradam polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos ou alteram a sua arquitetura, prejudicando o desenvolvimento do microrganismo e impedindo seu crescimento (CAMPOS, 2009). Atua também como sinalizador e mensageiro de moléculas que defendem as plantas contra estresses abióticos (METWALLY et al., 2003; ORABI et al., 2015).

O AS ativa a fenilalanina amônia liase, uma enzima chave entre o metabolismo primário e secundário, envolvida na rota da produção de compostos do metabolismo secundário (DURRANT; DONG 2004). Regula funções de alguns processos fisiológicos como o crescimento e desenvolvimento das plantas, absorção e transporte de íons e permeabilidade da membrana plasmática (SIMAEI et al., 2012). Estímulos exógenos com AS alteram as atividades antioxidantes de enzimas e aumentam a tolerância das plantas ao estresse abiótico. Averiguou-se que o AS tem efeitos diferentes sobre a adaptação ao estresse

e nas respostas aos danos que dependem da espécie de planta, concentração, método e tempo de exposição do AS (METWALLY et al., 2003).

Alguns estudos relatam a eficiência do AS como elicitador da produção de metabólitos secundários no cultivo de células. Como por exemplo, aumento na produção de saponinas na cultura de *Bacopa monnieri*, propanona e lactona na suspensão celular de *Polygonum minus* (SHUKOR et al., 2013) e acúmulo de antraquinonas no cultivo de células de *Rubia tinctorum* (ORBAN et al., 2008).

1.3.2 Ácido jasmônico como indutor de compostos fenólicos e flavonoides totais

Os jasmonatos são fitohormônios lipídicos que agem como moléculas mensageiras que estimulam a resposta das plantas a diferentes situações de estresse e envolvem-se em processos de desenvolvimento. Algumas das situações de estresse reguladas por estes fitohormônios são: feridas, exposição a ozônio, seca e ataque por patógenos e pragas (LORENZO; SOLANO, 2004). Essas substâncias endógenas das plantas têm um importante papel no processo de tradução de sinais que regulam os genes de defesa. Estão envolvidos na defesa contra os insetos herbívoros e infecções após a qual ocorre a produção de compostos de baixo e alto peso molecular utilizados na defesa como os compostos fenólicos (PINTO-ZAVALLOS, 2013).

Os jasmonatos estão sendo amplamente utilizados em aplicações exógenas como agentes estimulantes para produção de diversos metabólitos secundários (FRANCESCHI; KREKLING; CHRISTIANSEN, 2010). Alguns trabalhos reportam que baixas concentrações de jasmonato (até 10 μM) em meio de cultura favorecem a produção de compostos fenólicos (ALI; ABBASI; ALI, 2015; GUMEROVA, AKULOV, RUMYANTSEVA, 2015; RINCÓN-PÉREZ, et al., 2016). Pesquisas frequentes demonstram a eficiência dos jasmonatos na indução de metabólitos secundários no cultivo de células quando adicionado ao meio de cultura. Como por exemplo, alteração da produção de antocianinas principais em *Vitis vinifera* (CURTIN, et al., 2003), síntese de quitinases, β -1,3-glucosidases e peroxidases em *Solanum lycopersicum* (BELCHÍ-NAVARRO et al., 2013) fenólicos e flavonoides totais em *Eleutherococcus koreanum* (LEE; PARK; PAEK, 2015). Elicitação com 0,5 μM de jasmonato de metila influenciou a produção do composto fenólico betalaina em cultura de calo de *Bougainvillea* (LAKHOTIA et al. 2014).

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 114-140, jan./mar. 2007.
- ALI, M.; ABBASI, B. H.; ALI, G. S. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Países Baixos, v. 120, n. 3, p. 1099-1106, nov. 2015.
- ARWA, P. S.; ZERAIK, M. L.; XIMENES, V. F.; DA FONSECA, L. M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **Journal of ethnopharmacology**, Irlanda, v. 174, p. 410-418, nov. 2015.
- BARRIOS, H.; ZHANG, Y.; SANDOVAL, C.; XIAO, Z. Increase of taxol production in *Taxus globosa* Shoot callus by Chlorocholine Chloride. **The Open Natural Products Journal**, Pequim, v. 2, p. 33-37, dez. 2009.
- BELCHÍ-NAVARRO, S.; ALMAGRO, L.; SABATER-JARA, A. B.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.; BRU R.; PEDREÑO, M. A. Early signaling events in grapevine cells elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. **Plant Physiology and Biochemistry**, Índia, v. 62, p. 107-110, jan. 2013.
- BELCHÍ-NAVARRO, S.; PEDREÑO M. A.; CORCHETE, P. Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cell cultures treated with β -cyclodextrins. **Biotechnology Letter**, Países Baixos, v. 33, n. 1, p. 179–184, jan. 2011.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, Irlanda, v. 161, p. 839–851, jun. 2001.
- CAMPOS I. H. Dos; VELOSO M. P.; JULIANO M. A.; ALVES L. C.; DORIGUETTO MARTINS, F. T.; ASSIS D. M.; SANTOS M. A. C. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Píses Baixos, v. 44, p. 1230–1239, mar. 2009.
- CASTRO, A. H. F.; BRAGA, K. D. Q.; SOUSA, F. M. D.; COIMBRA, M. C.; CHAGAS, R. C. R. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.(Malpighiaceae). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 143-151, jan./mar. 2016.
- CASTRO, A. P.; DE MATTOS, A. C.; PEREIRA, N. A.; ANCHIETA, N. F.; SILVA, M. S.; DIAS, D. F.; MARQUES, M. J. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Médica**, Alemanha, v.8, n. 19, 733-741, nov. 2015.
- COELHO, L. P.; SERRA, M. F.; DE AGUIAR PIRES, A. L.; CORDEIRO, R. S. B.; E SILVA, P. M. R.; DOS SANTOS, M. H.; MARTINS, M. A. 7-Epiclusianone, a

tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Estados Unidos, v. 327, n. 1, p. 206-214, jun. 2008.

CORREIA, M. C. R.; DE LIMA, H. A.; DA SILVA, R. C. P. Caracterização dos frutos, sementes e plântulas de espécies de Clusiaceae das restingas do Rio de Janeiro. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 1, p. 061-073, nov. 2013.

CROTEAU, R.; KUTCHAN T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 24, p. 1250-1251.

CUNHA B. L.; FRANÇA, J. P.; MORAES, A. A.; CHAVES, A. L.; GAIBA, S.; FONTANA, R.; SACRAMENTO, C. K.; FERREIRA, L. M.; FRANÇA, L. P. Evaluation of antimicrobial and antitumoral activity of *Garcinia mangostana* L. (mangosteen) grown in Southeast Brazil. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 29, n. 2, jun. 2014.

CURTIN, C.; ZHANG, W; FRANCO, C. Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. **Biotechnology Letters**, Países Baixos, v. 25, n. 14, p. 1131-5, jul. 2003.

DIOS-LÓPEZ, Alonso de et al. Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. **Revista Chapingo**. México, v. 17, n. 2, p. 77-87, mai/ago. 2011.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Estados Unidos, v. 42, p. 185-209, set. 2004.

FEITOSA, L. S.; DA COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. DE F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M. P.; BLANK, A. F. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L.(Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, Índia, v. 29, n. 2, p. 370-377, mar/abr. 2013.

FIGUEIREDO, G. M.; LEITÃO-FILHO, H.; BEGOSSI, A. Ethnobotany of Atlantic Forest Coastal Communities: diversity of plant uses in Gamboa (Itacuruça Island, Brazil). **Human Ecology**. Rússia, v. 2, n. 4, p. 419-430, dez. 1993.

FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, Arraial do Cabo, v. 18, n. 1, p. 177-190, ago. 2004.

FRANCESCHI, V.R.; KREKLING, T.; CHRISTIANSEN, E. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. **Ameriican Journal of Botany**, Estados Unidos, v. 89, n. 4, p. 578-586, jun. 2002.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. DE F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA A. J. de. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy, Maringá, v.18, n. 4, p. 627-641, out. 2008.

GEORGE, E. F.; DEBERGH P. C. Plant Tissue Culture Procedure: Background. In: GEORGE, E.F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3. ed., Dordrecht: Springer, p.1-28, 2008.

GIRI, C. C.; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Países Baixos, v. 126, n. 1, p. 1-18, jul. 2016.

GUMEROVA, E. A.; AKULOV, A. N.; RUMYANTSEVA, N. I. Effect of methyl jasmonate on growth characteristics and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of tartary buckwheat. **Russian Journal of Plant Physiology**, Rússia, v. 62, n. 2, p. 195-203, mar. 2015.

GUPTA, S.; CHAUHAN, D.; MEHLA, K.; SOOD, P.; NAIR, A. An overview of nutraceuticals: Current scenario. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 1, p. 55–62, maio. 2010.

LAKHOTIA, P.; PAL, S. K.; SINGH, S. K.; SINGH, M. C.; PRASAD, K. V.; KISHAN, S. Influence of biotic and abiotic elicitors on production of betalain pigments in bougainvillea callus cultures. **Indian Journal Horti**c, Índia, v. 71, p. 373–378, jan. 2014.

LARGIA, M. J. V.; POTHIRAJ, G.; SHILPHA, J.; RAMESH, M. Methyl jasmonate and salicylic acid synergism enhances bacoside A content in shoot cultures of *Bacopa monnieri* (L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Países Baixos, v. 122, n. 1, p. 9-20, ago. 2015.

LEE, E. J.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Países Baixos, n. 120, v. 1, p. 1-10, set. 2015.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 91, n.1, p. 131-137, maio. 2005.

LINGAKUMAR, K., ASHA, A., & VAIRAMATHI, S. P. Comparative Effects of Auxins, Jasmonic Acid and Salicylic Acid on Callus Initiation and Organogenesis in *Vigna mungo* (L.) Hepper Using Hypocotyl Explant. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Estados Unidos, v. 10, n. 1, jan. 2014.

LOREDO-CARRILLO, S. E.; SANTOS-DÍAZ, M. L.; LEYVA, E.; SANTOS-DÍAZ, M. S. Establishment of callus from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers and effect of abiotic stress on flavonoids and sterols accumulation. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 312-318, out. 2013.

- LORENZO, O; SOLANO, R. Señalización de ácido jasmónico e interacciones com otras hormonas. In MARTÍN, M. D. R.; RODRÍGUEZ, C. N. **Metabolismo y modo de acción de fitohormonas**. Salamanca. Ediciones Universidad de Salamanca. p. 79-80, 2004.
- MACHADO, F. A. P. S. A; CAPELASSO M.; OLIVEIRA, A.J.B.; ZAMUNER, M. L.M.; MANGOLIN, C. A., MACHADO, M. F. P. S. Alkaloid production and Isozymes expression from cell suspension culture of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). **Journal of Plant Sciences**, Estados Unidos, v. 1, p. 324-331, jun. 2006.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Estados Unidos, v. 79, p. 727-747, maio. 2004.
- MANEECHAI, S. *et al.* Flavonoid and stilbenoid production in callus cultures of *Artocarpus lakoocha*. **Phytochemistry**, Reino Unido, v. 81, p. 42-49, set. 2012.
- MARTINS, F. T.; DOS SANTOS, M. H.; COELHO, C. P.; BARBOSA, L. C.; DIAS, G. C.; FRACCA, M. P.; DORIGUETTO, A. C. A powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylated benzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Países Baixos, v. 54, n. 3, p. 451-457, fev. 2011.
- METWALLY, A.; FINKEMEIER, I.; GEORGI, M.; DIETZ K. J. Salicylic Acid Alleviates the Cadmium Toxicity in barley Seedlings. **Plant Physiology**, Estados Unidos, v. 132, n. 1, p. 272-281, 2003.
- MURATA, R. M.; ALMEIDA L. S. B.; FRANCO, E. M.; YATSUDA, R.; SANTOS, M. H. DOS; ALENCAR S. M. DE; KOO H.; ROSALEN P. L. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries *in vivo* by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, Reino Unido, v. 26, n. 7, p. 865–872, out. 2010.
- NALDONI, F. J.; CLAUDINO, A. L. R.; CRUZ, Jr. J. W.; CHAVASCO, J. K.; FARIA E SILVA, P.M; VELOSO, M. P.; SANTOS M. H. Dos; Antimicrobial activity of enzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, Estados Unidos, v. 12, n. 2, p. 403–407, maio. 2009.
- NEVES, J. S., COELHO, L. P., CORDEIRO, R. S. B., VELOSO, M. P., SILVA, P. M. R., DOS SANTOS, M.H., MARTINS, M.A. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, Alemanha, v.73, p. 644–649, jan. 2007.
- ORABI, S. A.; DAWOOD, M. G.; SALMAN, S. R. Comparative study between the physiological role of hydrogen peroxide and salicylic acid in alleviating the harmful effect of low temperature on tomato plants grown under sand-ponic culture. **Scientia Agriculturae**, República Checa, n. 9, p. 49-59, jan. 2015.
- ORBAN, N.; IMRE, B.; ZOLTAN, S.; BELA, D. Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures. **Dyes Pigments**, Países Baixos, v. 77, p. 249–257, nov. 2008.

PEIXOTO NETO, P. A. de S.; CAETANO, L. C. **Plantas medicinais do popular ao científico**, UFAL, Maceió, 2005.

PEREIRA, I. O.; ASSIS, D. M.; JULIANO, M. A.; CUNHA, R. L.; BARBIERI, C. L.; SACRAMENTO, L. V. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as Leishmania protease inhibitors. **Journal Of Medicinal Food**, Estados Unidos, n. 14, v.6, p. 557-562, maio. 2011.

PÉREZ-ALONSO, N. L.; LABRADA F. A.; PÉREZ, A. C.; PÉREZ, A. P.; SOSA, R.; MOLLINEDA, A; GONZÁLEZ, E. J. Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Colômbia, v. XVI, n. 1, p. 51-61, jun. 2014.

PIETERSE, C. M.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S. C. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Reino Unido, v. 28, p. 489-521, nov. 2012.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; MARTINS, C. B.; PELLEGRINO, A. C.; ZARBIN, P. H. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, Brasil, n. 36, p. 1395-1405, out. 2013.

PITTA-ALVAREZ, S. I.; SPOLLANSKY, T. C.; GIULIETTI, A. M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**, Estados Unidos, v. 26, n. 2, p. 252-258, fev. 2000.

RAM, M.; PRASAD, K. V.; SINGH, S. K.; HADA, B. S.; KUMAR, S.. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Países Baixos, v.113, n. 3, 459-467, out. 2013.

REUTRAKUL, V.; ANANTACHOKE, N.; POHMAKOTR, M.; JAIPETCH, T.; SOPHASAN, S.; YOOSOOK, C.; KASISIT, J.; NAPASWAT, C.; SANTISUK, T.; TUCHINDA, P. Cytotoxic and anti-HIV-1 xanthenes from the resin and fruits of *Garcinia hanburyi*. **Planta Medica**, República Checa, v. 73, p. 33-40, out. 2007.

RINCÓN-PÉREZ, J.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, L.; RUÍZ-VALDIVIEZO, V. M.; ABUD-ARCHILA, M.; LUJÁN-HIDALGO, M. C.; RUIZ-LAU, GUTIÉRREZ-MICELI, F. A. Fatty Acids Profile, Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Elicited Callus of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. **Journal of Oleo Science**, Japão, v. 65, n. 4, p. 311-318, set. 2016.

SAHIN, G.; VERMA, S. K.; GUREL, E. Calcium and magnesium elimination enhances accumulation of cardenolides in callus cultures of endemic *Digitalis species* of Turkey. **Plant Physiology and Biochemistry**, Países Baixos, v. 73, p. 139-143, dez. 2013.

SAHU, R.; GANGOPADHYAY, M.; DEWANJEE, S. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Polônia, v. 35, n. 5, p. 1473-1481, maio. 2013.

- SAIMAN, M. Z.; MUSTAFA, N. R.; POMAHOCŇOVÁ, B.; VERBERNE, M., VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; SCHULTE, A. E. Analysis of metabolites in the terpenoid pathway of *Catharanthus roseus* cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Países Baixos, v. 117, n. 2, p. 225-239, maio. 2014.
- SANTA-CECÍLIA, F.V.; ABREU, F.A.; DA SILVA, M.A.; DE CASTRO, E.M.; SANTOS, M.H. Estudo farmacobotânico das folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 15, n. 3, p. 397-404, set. 2013.
- SANTOS FILHO, P. R.; DE CARVALHO, R. B. F.; DA COSTA JÚNIOR, J. S.; DE FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, 94, n. 2, p.161-168, fev. 2013.
- SANTOS FILHO, P. R.; SANTOS, B. R.; BARBOSA, S.; VIEIRA, L. R.; FREITAS, N. C. de; DIAS, D. F.; SANTOS, M. H. dos. Growth curve, biochemical profile and phytochemical analyses in calli obtained from the procambium segments of Bacupari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.57, n.3, p. 326-333, maio/jun. 2014.
- SHUKOR, M. F. A.; ISMAIL, I.; ZAINAL Z.; NOOR, N. M. Development of a *Polygonum minus* cell suspension culture system and analysis of secondary metabolites enhanced by elicitation. **Acta Physiologiae Plantarum**. Polônia, v. 35, p. 1675–1689, maio. 2013.
- SIMAEI, M.; KHAVARI-NEJAD, R. A.; BERNARD, F.. Exogenous application of salicylic acid and nitric oxide on the ionic contents and enzymatic activities in NaCl-stressed soybean plants. **American Journal of Plant Sciences**, Estados Unidos, v. 3, p. 1495-1503, out. 2012.
- SUDHA ,G.; RAVISHANKAR, G.; Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Países Baixos, v. 71, p. 181–212, dez. 2002.
- SZOPA, A.; EKIERT, H. Production of biologically active phenolic acids in *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott *in vitro* cultures cultivated on different variants of the Murashige and Skoog medium. **Plant Growth Regulators**, v. 72, n. 1, p. 51-58, jan. 2014.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2005.
- THEBORAL, J.; SIVANANDHAN, G.; SUBRAMANYAM, K.; ARUN, M.; SELVARAJ, N.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Enhanced production of isoflavones by elicitation in hairy root cultures of Soybean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** , v. 117, n.3, 477-481. 2014.
- ZABALA, M. A.; VELÁSQUEZ, M. J. A.; CARDONA, A. M. A.; FLÓREZ, J. M. R.; VALLEJO, C. M. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, Colômbia, v. 62, n. 1, p. 4881-4895. ago. 2009.

VERDI, L.G.; PIZZOLATTI, M. G.; MONTANHER, A. B. P.; BRIGHENTE, I. M.; SMÂNIA JÚNIOR A.; SMÂNIA, E. F, A.; SIMIONATTO, E. L.; MONACHE, F. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**. Brasil, v. 75, n. 3, p. 360-363, jun. 2004.

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

CAPÍTULO 2 – Efeito do 2-iP e 2,4-D na calogênese em embriões zigóticos de *Garcinia brasiliensis*

A seguir é apresentada uma introdução do tema abordado neste capítulo com o propósito de criar embasamento teórico para a análise e discussão dos resultados.

1 INTRODUÇÃO

A *Garcinia brasiliensis*, conhecida como Bacupari pertencente à família Clusiaceae (ou Guttiferae). Nativa da região amazônica, é cultivada em todo território brasileiro. Além da produção de frutos apreciados pela população, destaca-se por apresentar atividades farmacológicas (NASCIMENTO et al., 2002).

Garcinia (ou *Rheedia*) é o gênero mais abundante da família Clusiaceae e apresenta uma diversidade considerável de metabólitos como os derivados fenólicos oxigenados e prenilados, por exemplo, as xantonas, os flavanoides, ácidos fenólicos e benzofenonas (CHIN; KINGHORN, 2008).

Algumas das atividades biológicas dessa espécie já relatadas são: propriedade esquitossomicida (CASTRO et al., 2015), atividade antimicrobiana (ALMEIDA et al., 2008; NALDONI et al., 2009), antitumoral (CUNHA, 2014), atividade leishmanicida (PEREIRA et al., 2011).

A procura por plantas como a *G. brasiliensis*, que possuem compostos de interesse econômico e medicinal, podem gerar coletas predatórias e indiscriminadas em seu habitat podendo levar a planta a extinção (FUMAGALI et al., 2008). Sendo assim, há necessidade de criar estratégias que permitem a obtenção de plantas *in vitro* ou até mesmo de calos que possuem as propriedades bioativas da planta matriz.

O calo é um sistema de células pouco diferenciadas e não organizadas obtido *in vitro*. Pode ser formado a partir do cultivo de fragmento de tecido ou órgão vegetal isolado da planta matriz, inoculado em meio de cultura contendo reguladores de crescimento exógenos (TERMIGNONI, 2005).

O sucesso na obtenção de calos resultante da adição de auxina e citocinina em meio de cultura já foi muitas vezes relato na literatura (CASTRO et al, 2016;

LUCZKIEWICZ, KOKOTKIEWICZ, GLOD, 2014; PILATTI, 2011). Esses compostos são fitorreguladores que agem na interação dos processos de competência, indução, determinação e diferenciação celular, podendo levar a organogênese *in vitro* (SOARES et al, 2007)

O conhecimento mais detalhado da estrutura do calo por meio de análises histológicas pode gerar informações importantes para a seleção de células com maior capacidade organogênica ou que gerará maior massa calogênica.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a calogênese em embriões zigóticos de *G. brasiliensis* utilizando diferentes combinações entre 2-iP e 2,4-D.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *Garcinia brasiliensis* foram coletados de plantas situadas no município de Viçosa, MG, na segunda quinzena de fevereiro de 2015. Esses frutos foram despulpados e suas sementes permaneceram por 30 dias sobre a bancada do laboratório a temperatura de 22°C para secagem e retirada do tegumento (Figura 1).



Figura 1- Sementes (A) e embriões (B) de *G. brasiliensis*.
Fonte: Da autora.

Para a desinfestação dos embriões foi utilizado álcool 70% por 2 minutos e, posteriormente, hipoclorito de sódio a uma concentração 2,5% de cloro ativo por 15 minutos. A seguir, os embriões foram enxaguados por, no mínimo, três vezes em água destilada e autoclavada. Este processo foi feito em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e radiação UV por 20 minutos.

Os embriões foram segmentados transversalmente e inoculados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo 30 mL de meio de cultura, sendo 10 segmentos por placa (Figura 2).

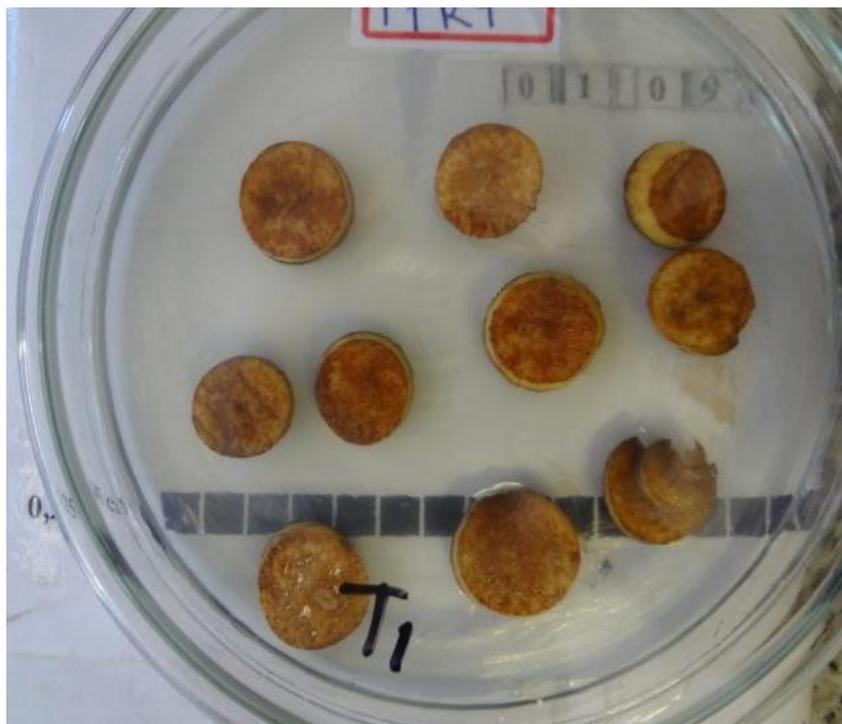


Figura 2- Placa de Petri com segmentos de embriões zigóticos de *G. brasiliensis*.
Fonte: Da autora.

O meio de cultura utilizado foi o WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar, e diferentes combinações da citocinina 2-Isopenteniladenina (2-iP) (0; 9; 18; 36; $72 \text{ } \mu\text{M}$) e da auxina ácido 2,4-diclorofenoxilacético (2,4-D) (0; 2,05; 10,26; 18,47; $28,73 \text{ } \mu\text{M}$). O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem que foi efetuada a 121° C , pressão de 1,0 atm e por um período de 20 minutos.

Foram utilizados 25 tratamentos com 10 repetições. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (5 concentrações de 2-iP x 5 concentrações de 2,4-D x 10 repetições), sendo cada placa uma repetição. Após a inoculação, as placas permaneceram em B.O.D. a 30° C na ausência de luz.

Para determinar o tratamento que melhor proporcionou calogênese nos explantes, a área coberta por calos foi avaliada por meio do programa Image J[®] ao 16º e ao 24º dia após inoculação.

Trinta dias após a inoculação foi avaliado o número de explantes com calo, brotos e raízes; e com sessenta dias, os explantes que apresentaram calogênese foram transferidos para meio de cultura contendo $72 \text{ } \mu\text{M}$ 2-iP + $28,73 \text{ } \mu\text{M}$ 2,4-D, onde permaneceram em subcultivo até 135 dias para a utilização em experimentos posteriores.

Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de significância pelo teste Scott-Knott, utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2014).

2.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foram feitas análises histológicas e histoquímicas nos calos obtidos após 20 dias de incubação. Para isto três amostras de calos de cada tratamento foram fixadas em solução FAA 70% (formaldeído, ácido acético e etanol a 70 %, na proporção de 1:1:18 v.v⁻¹) (JOHANSEN, 1940) por 72 horas, seguido de desidratação em série etílica (60, 70, 80, 90 e 100%) expondo o material por uma hora em cada série. Posteriormente, as amostras foram infiltradas em resina epoxi (Historesin® Leica) de acordo com protocolo do fabricante. Cortes com espessura de 2 µm foram obtidos em micrótomo manual (Easypath EP-31-20091), corados com solução de azul de toluidina a 0,05% (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1965) e lugol 10%. As lâminas foram seladas com Entellan®.

As fotomicrografias foram obtidas a partir de câmera digital acoplada em microscópio de luz Zeiss Axio Scop.A1 utilizando o sistema de captura de imagem digital AxioVision 4.8.

Após a confecção das lâminas, foram observados as estruturas histológicas e aspectos histoquímicos presentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão trata dos resultados obtidos neste trabalho e respectivas discussões.

3.1 INFLUÊNCIA DO 2-IP E 2,4-D NA INDUÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

A presença da auxina 2,4-D associada a concentrações entre 18 e 72 μM de 2-iP foi essencial para a calogênese em embriões zigóticos de Bacupari (Figura 3). A interação entre 2,4-D e 2-iP estimulou o desenvolvimento de calos na espécie. Quando a auxina está presente no meio de cultura por si só, há o aumento das quinases dependentes de ciclina e a adição de citocininas torna-se necessária para a ativação das quinases (VERDEIL et al., 2007). As quinases são enzimas responsáveis pela fosforilação de ATP e, conseqüentemente, a produção e energia nas células. Portanto, a combinação de auxina e citocinina é necessária para a indução da divisão celular pelo favorecimento do ciclo celular (GUERRA et al., 1999; TAIZ; ZEIGER, 2013). Do 16° ao 24° dia, os explantes do tratamento com 72 μM 2-iP + 28,73 μM 2,4-D apresentaram incremento na área dos calos de 0,08 para 0,1675 cm^2 do 16° dia ao 24° dia (Figura 3). A ação efetiva da interação entre auxinas e citocininas na indução de calos em diferentes explantes já foi verificada em vários estudos (CASTRO et al, 2016; LUCZKIEWICZ, KOKOTKIEWICZ, GLOD, 2014; PILATTI, 2011).

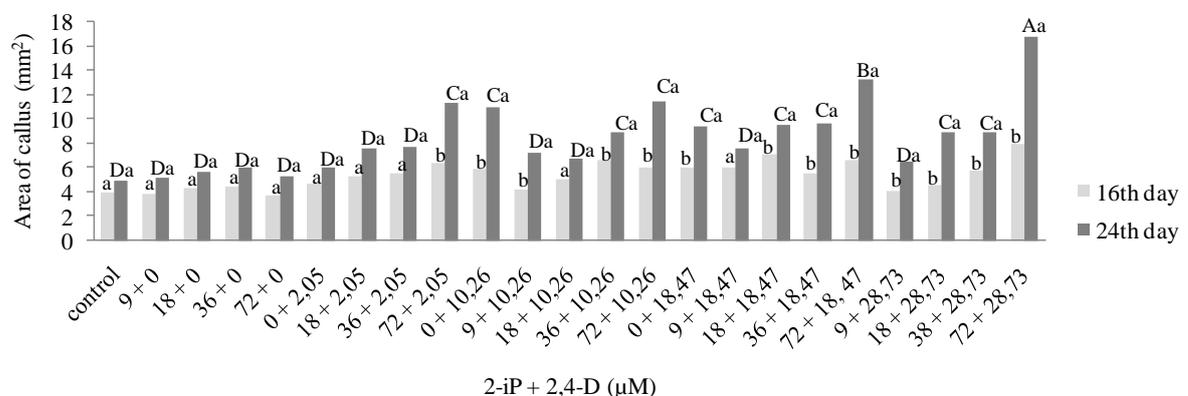


Figura 3- Valores médios das áreas dos calos ao 16° e ao 24° dia. Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não diferem entre si. Médias do 24° dia seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott, $\alpha = 5\%$.

Ao trigésimo oitavo dia após a inoculação, os explantes apresentavam cinco formações: brotos, múltiplas raízes, radícula, calos nas bordas e calos espalhados pela superfície do segmento de embrião zigótico (Figura 4). Foi observado que o crescimento inicial dos calos ocorreu na região do procâmbio do embrião, expandindo-se posteriormente para a borda e toda a superfície do explante.

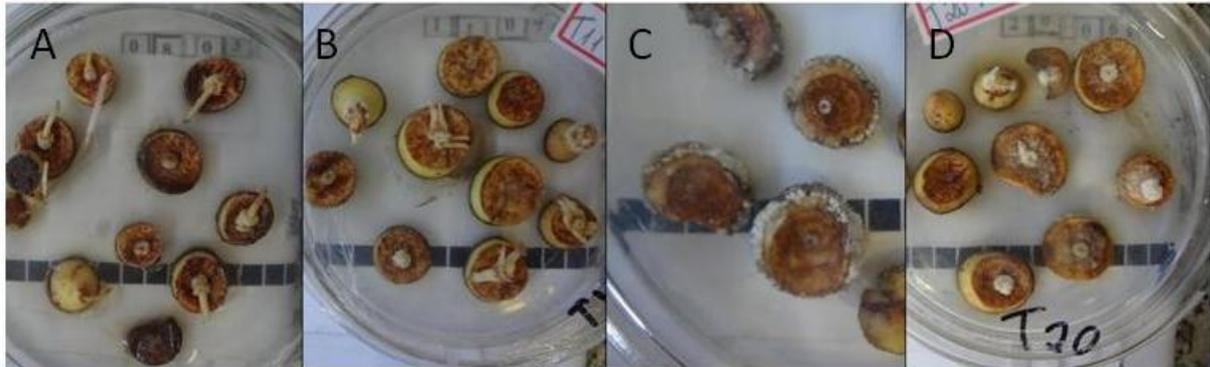


Figura 4- Explantes com brotos (A), múltiplas raízes (B), calos nas bordas (C) e calos espalhados (D).

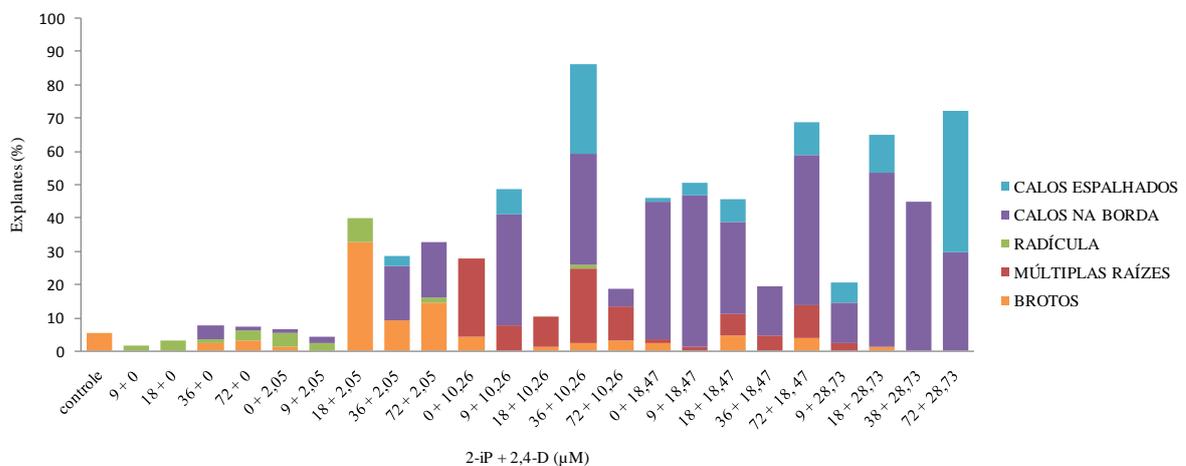


Figura 5- Porcentagem de explantes com brotos, múltiplas raízes, radícula, calos na borda e calos espalhados ao 38º dia após a inoculação em meio de cultivo com 2-iP e 2,4-D.

O tratamento que proporcionou maior número de explantes com brotos e radícula foi 18 µM 2-iP + 2,05 µM 2,4-D (Figura 5). Respalhando o resultado obtido, Vieira e Monteiro (2002) relatam que as citocininas desencadeiam divisões celulares, estimulando o desenvolvimento de porções de tecidos meristemáticos que culminam no surgimento de brotações. A maior porcentagem de explantes com múltiplas raízes foi observada no tratamento suplementado com 0 µM 2-iP + 10,26 µM 2,4-D (23,71 %) (Figura 5).

O tratamento que proporcionou maior formação de calos foi a concentração de 72 µM 2-iP + 28,73 µM 2,4-D (72,33% de explantes com formação de calos, sendo 29,78%

dos explantes com calos nas bordas e 42,55% com calos espalhados). Os explantes expostos nestas com concentrações de 2-iP e 2,4-D não apresentaram formação de radícula, brotos e múltiplas raízes (Figura 5).

3.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS

As secções histológicas dos calos de Bacupari demonstraram a formação de áreas meristemáticas, com células pequenas, isodiamétricas com citoplasma denso (Figura 6). Foram observados três tipos de células morfologicamente diferentes. O tipo I foi caracterizado por células pequenas e isodiamétricas, formando grupos de células. O tipo II, constituída por células arredondadas e tamanhas medianos, presente na periferia de aglomerados de células ou espalhados entre os aglomerados embrionários e tipo III, células bem maiores geralmente presentes nas extremidades dos cortes (Figura 6).

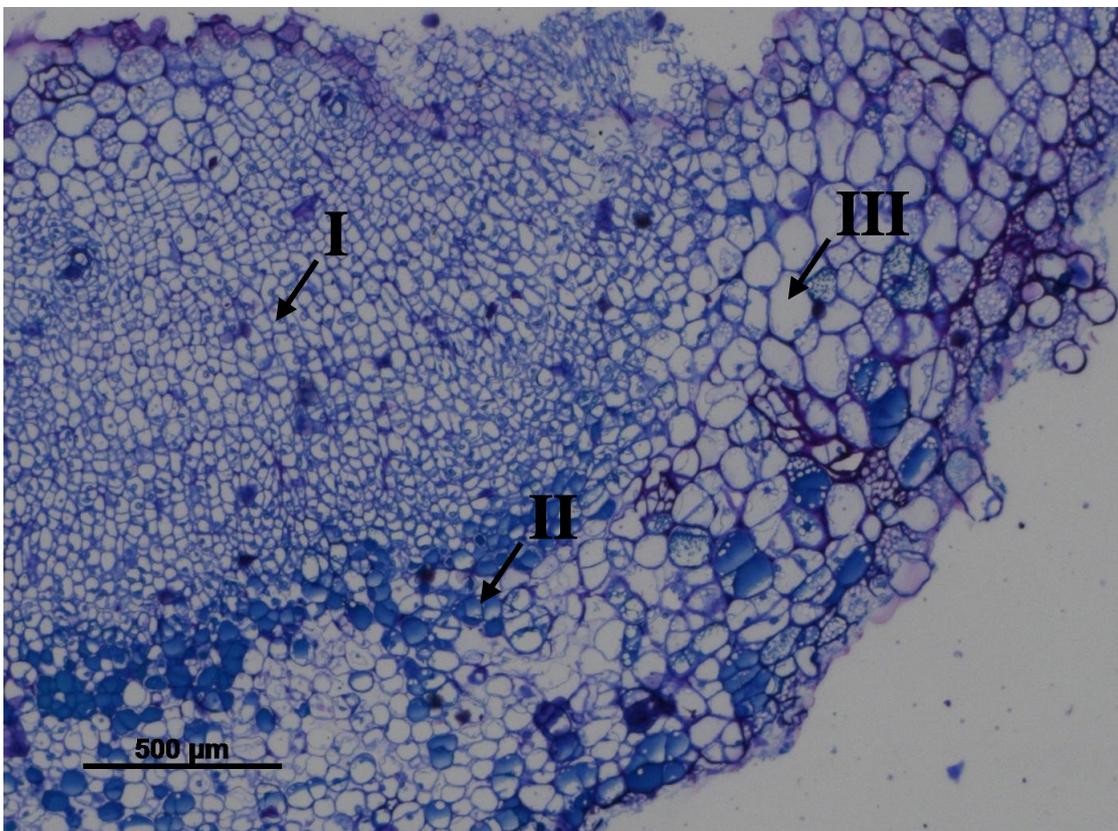


Figura 6- Fotomicrografia de calo proveniente do tratamento com 10,26 µM de 2,4-D e ausência de 2i-P submetido a coloração de azul de toluidina. Células pequenas e isodiamétricas, formando grupos de células (I); células arredondadas, presentes na periferia de aglomerados de células ou espalhados entre os aglomerados embrionários (II); células bem maiores, geralmente presentes nas extremidades dos cortes (III).

Fonte: Da autora.

Calos expostos a 18 μM 2-iP + 0 μM 2,4-D apresentaram coloração intensa, especialmente nas suas extremidades, onde foram observadas células de maiores dimensões (Figura 7). Segundo Figueiredo et al. (2007) tal aspecto trata-se de um calo não embriogênico com presença de células grandes, alongadas, vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado.

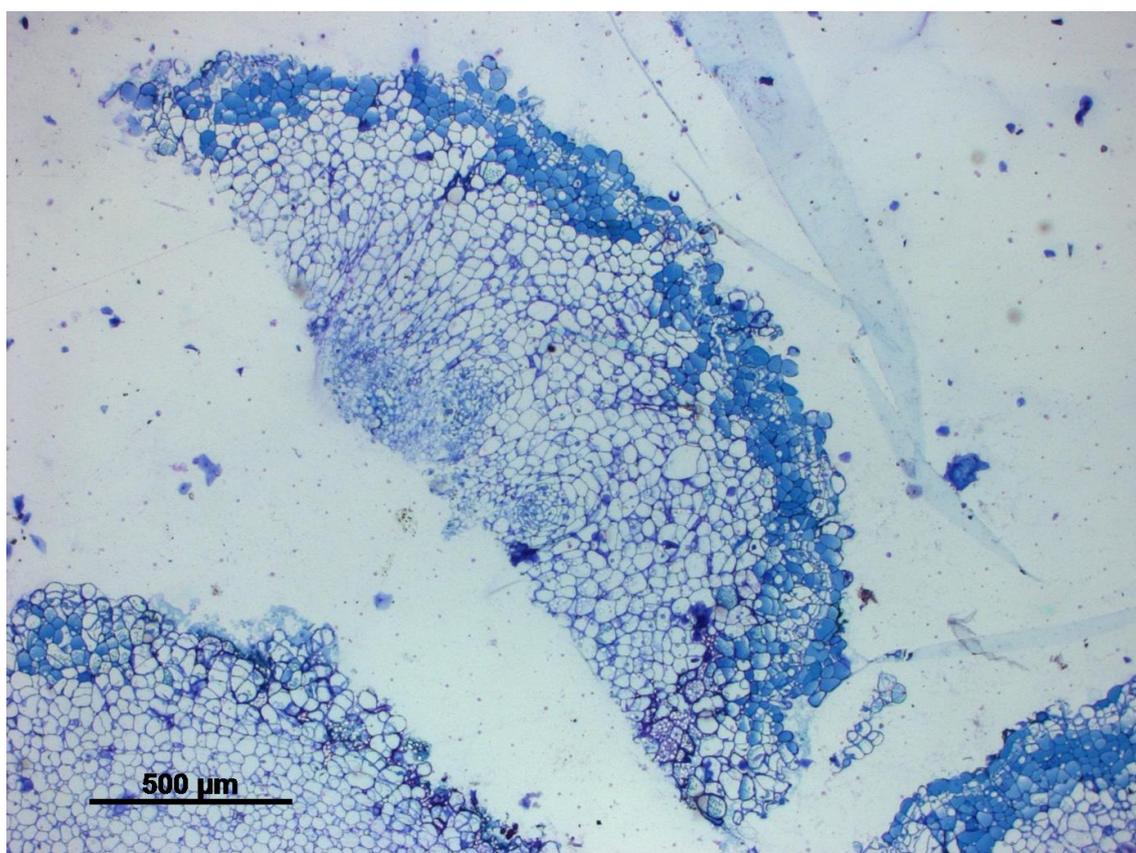


Figura 7- Fotomicrografia de calo proveniente do tratamento 18 μM 2-iP + 0 μM 2,4-D submetido a coloração de azul de toluidina.

Fonte: Da autora.

Na caracterização histológica dos calos dos tratamentos com 18 μM 2-iP + 0 μM 2,4-D (Figura 8 A); 18 μM 2-iP + 2,05 μM 2,4-D (Figura 8 B); 36 μM 2-iP + 2,05 μM 2,4-D (Figura 8 C); 0 μM 2-iP + 10,26 μM 2,4-D (Figura 8 D); 72 μM 2-iP + 2,05 μM 2,4-D (Figura 8 E) e 36 μM 2-iP + 10,26 μM 2,4-D (Figura 8 F) foram observadas regiões onde as células estão dispostas de forma concêntrica com formato mais achatado e alongado, sugerindo o início de formação de estrutura tubular especializada. Segundo Termignoni (2005), os arranjos concêntricos de células podem constituir centros com atividade

meristemática, indicando que os calos já estariam em um estágio de desenvolvimento tardio, quando as células começam a se rediferenciar e originar estruturas e órgãos. Em muitos dos cortes foram observadas estruturas que, provavelmente são amiloplastos (Figura 9). Estruturas semelhantes também foram encontradas em calos de *Cedrela fissilis* por Bakos (2009).

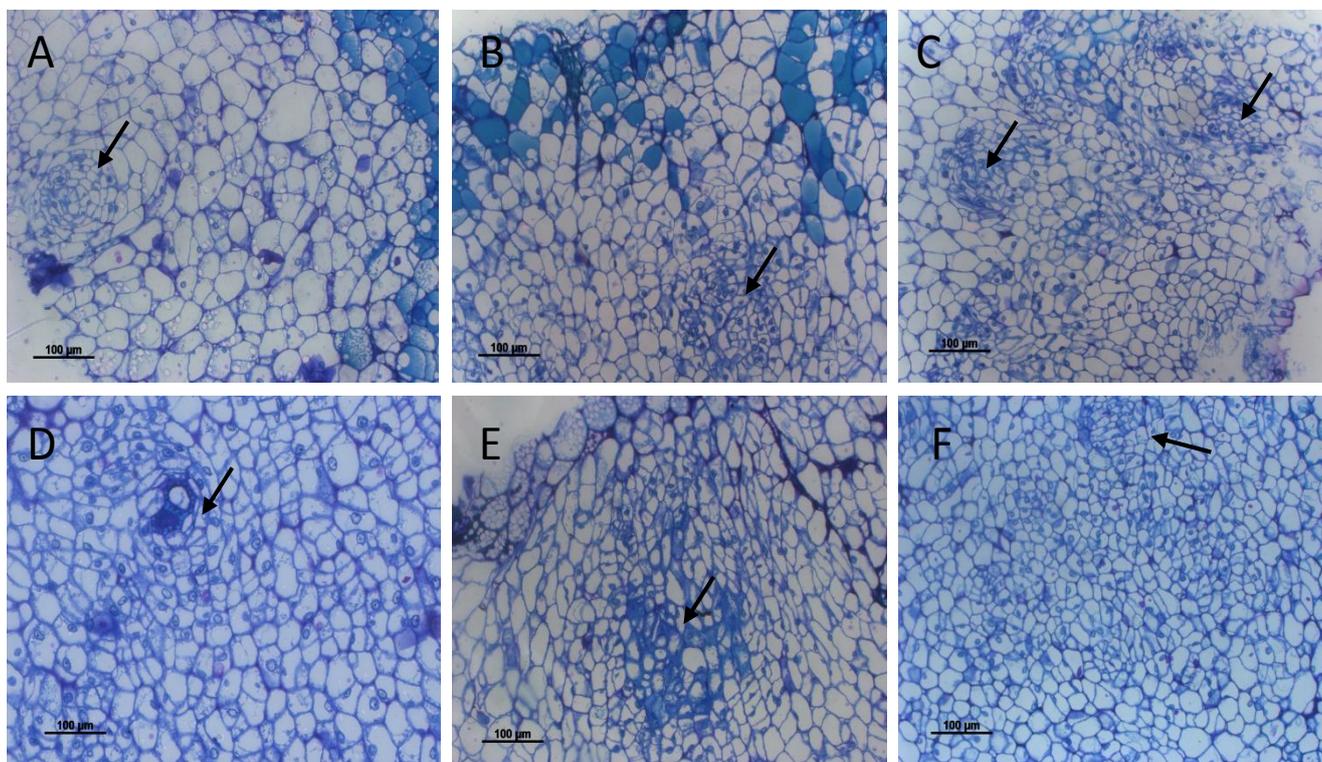


Figura 8- Fotomicrografia de calos submetidos a coloração de azul de toluidina. 18 μM 2-iP + 0 μM 2,4-D (A); 18 μM 2-iP + 2,05 μM 2,4-D (B); 36 μM 2-iP + 2,05 μM 2,4-D (C); 0 μM 2-iP + 10,26 μM 2,4-D (D); 72 μM 2-iP + 2,05 μM 2,4-D (E); 36 μM 2-iP + 10,26 μM 2,4-D (F). As setas indicam os arranjos concêntricos.

Fonte: Da autora.

Nos tratamentos com 72 μM 2-iP + 2,05 μM 2,4-D e 18 μM 2-iP + 10,26 μM 2,4-D, as paredes celulares apresentaram leve reação metacromática, produzindo uma coloração violácea (Figura 9) podendo indicar a presença de pectina. A metacromasia também foi observada em algumas amostras quando regiões do tecido foram coradas de verde, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos (Figura 10).

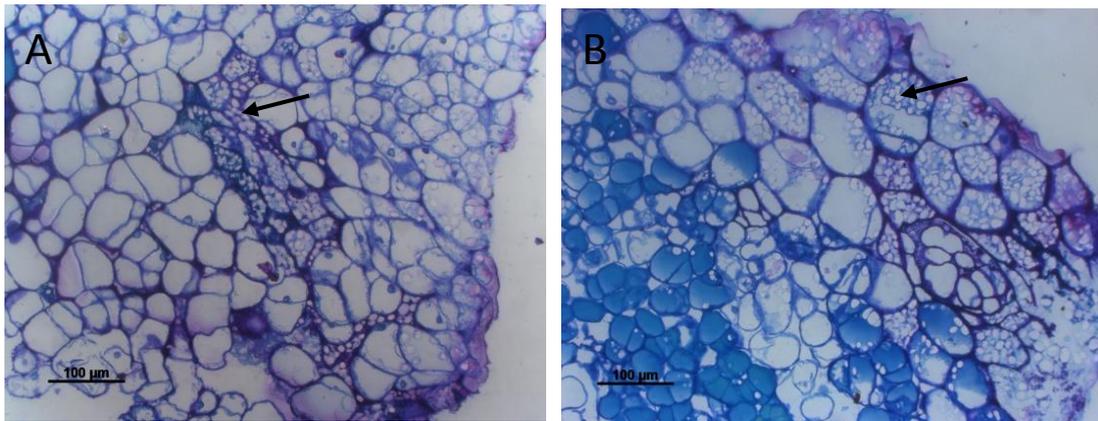


Figura 9- Fotomicrografia de calos submetidos a coloração de azul de toluidina. 36 μM 2-iP + 2,05 μM 2,4-D (A); 9 μM 2-iP + 10,26 μM 2,4-D (B). As setas indicam possíveis amiloplastos.
Fonte: Da autora.

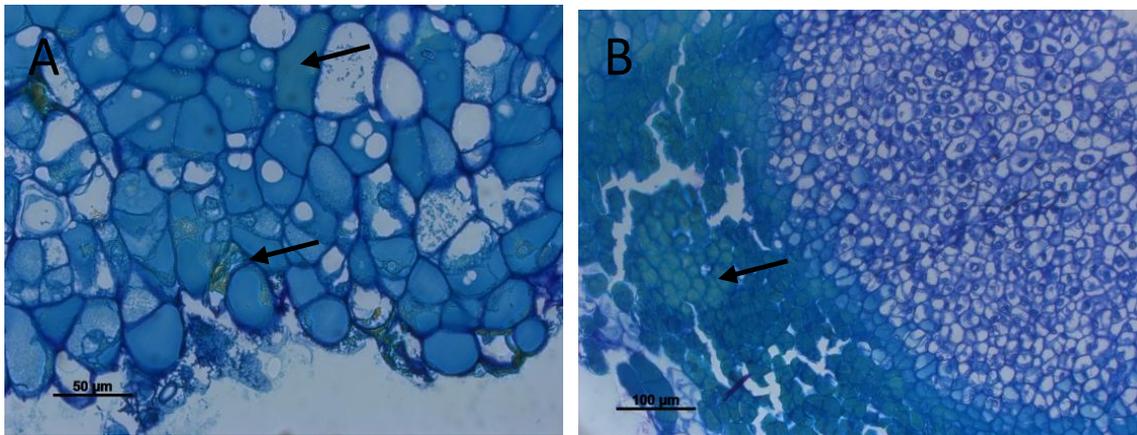


Figura 10- Fotomicrografia de calos submetidos a coloração de azul de toluidina. 36 μM 2-iP + 0 μM 2,4-D (A); 9 μM 2-iP + 10,26 μM 2,4-D (B). As setas indicam regiões coradas de verde, sendo um indicativo de presença de compostos fenólicos.
Fonte: Da autora.

O azul de toluidina é um corante metacromático, que exibe coloração diferente de acordo com o substrato que reage. Mucilagens e paredes ricas em pectinas coram de roxo; paredes celulósicas coram de azul, e paredes lignificadas e fenólicas não estruturais coram de verde (VENTRELLA et al., 2013). Algumas plantas possuem a mucilagem como uma fração da composição polissacarídica que, *in vivo* atua como um reservatório de água, pois é um produto do metabolismo interno (KUMAR, SHARMA, CHATTOPADHYAY, 2012; QADRY, 2008).

O tratamento que apresentou maior calogênese, 72 μM 2-iP + 28,73 μM 2,4-D, as células se mostraram de tamanhos bem variados e com espaço intercelular (Figura 11).

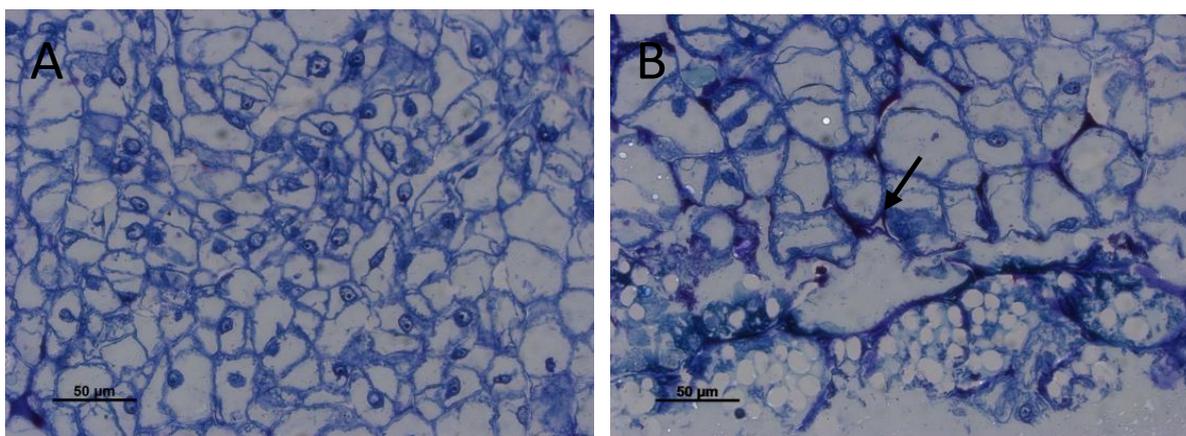


Figura 11- Fotomicrografia de calos submetidos a coloração de azul de toluidina evidenciando a parede celular em cultivos em tratamento com $72 \mu\text{M}$ 2-iP + $28,73 \mu\text{M}$ 2,4-D. A seta indica espaço intercelular, demonstrando um tecido desorganizado.

Fonte: Da autora.

O teste com lugol foi positivo em todos os cortes de calo avaliados, identificando histoquimicamente os grãos de amido com coloração roxa (Figura 12). Porém, para os tratamentos com $0 \mu\text{M}$ 2-iP + $2,05 \mu\text{M}$ 2,4-D; $72 \mu\text{M}$ 2-iP + $2,05 \mu\text{M}$ 2,4-D; $36 \mu\text{M}$ 2-iP + $18,47 \mu\text{M}$ 2,4-D; $72 \mu\text{M}$ 2-iP + $18,47 \mu\text{M}$ 2,4-D; $18 \mu\text{M}$ 2-iP + $28,73 \mu\text{M}$ 2,4-D e $72 \mu\text{M}$ 2-iP + $28,73 \mu\text{M}$ 2,4-D houve pouca presença de grãos de amido corados (Figura 12).

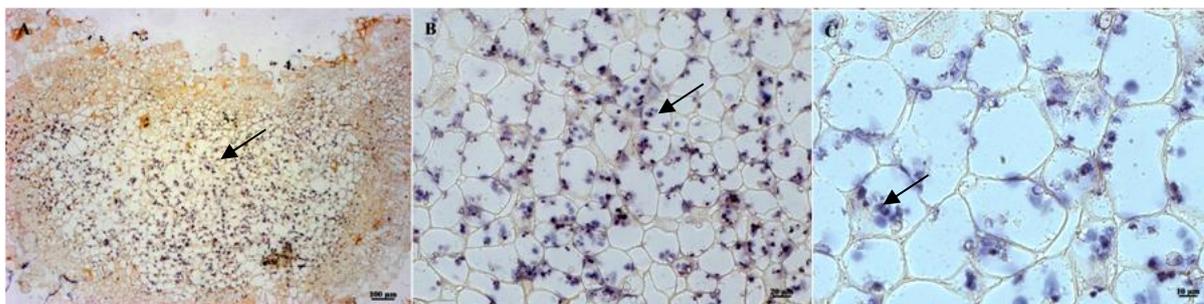


Figura 12- Imagens capturadas pelo microscópio de luz mostrando os aspectos histológicos e histoquímicos de calos de *G. brasiliensis* expostos ao tratamento $36 \mu\text{M}$ 2-iP + $0 \mu\text{M}$ 2,4-D no período de 20 dias. As setas indicam a presença de grânulos de amido corados de roxo.

Fonte: Da autora

A maioria das amostras apresentou maior concentração de amiloplastos na região central dos calos, onde há maior número de células pequenas, isodiamétricas e nucleadas, pequenos vacúolos, parede celular fina. Tais características podem ser atribuídas a células em divisão com início de morfogênese. Na literatura há relatos de que a presença de inúmeros amiloplastos está relacionada com a alta atividade metabólica, pois o amido é fonte primária de energia para a divisão celular (CHIAVEGATTO, 2014; NOGUEIRA et al., 2008; PÁDUA, 2013). O acúmulo intenso deste carboidrato pode ser indicativo de desenvolvimento

tardio e de diferenciação ocorrendo no calo, já que a organogênese requer uma considerável quantidade de energia e que esta poderia derivar da degradação do amido. Segundo Fortes e Pais (2000) ciclos de acumulação e mobilização de amido podem ser características de células envolvidas na morfogênese.

O amido é uma importante fonte de reserva energética para o processo de crescimento e manutenção da planta, participando do metabolismo primário, porém é importante considerar que o amido pode servir como fontes de esqueletos de carbono disponíveis para a biossíntese das moléculas dos metabólitos secundários (TAIZ e ZEIGER, 2013).

4 CONCLUSÕES

Para uma eficiente calogênese em embriões zigóticos de *G. brasiliensis* é necessária a combinação de altas concentrações de 2-iP e 2,4-D (72 e 28,73, respectivamente)

Combinações de diferentes concentrações de 2-iP e 2,4-D induziram diferenças morfológicas nos calos como também o aparecimento de brotos (18 μM de 2-iP + 2,05 de μM 2,4-D) , múltiplas raízes (ausência de 2-iP de μM + 10,26 de μM 2,4-D) e raízes (ausência de 2,4-D + 18 μM de 2-iP). Tais fatores podem, portanto, ser manipulados de forma a se obter calos ou estruturas com diferentes características conforme o interesse.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. S. B. D. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, Alemanha, v. 15, n. 10, p. 886-891, out. 2008.
- BAKOS, F.; SZABÓ, L.; OLMEDILLA, A. Histological comparison between wheat embryos developing *in vitro* from isolated zygotes and those developing *in vivo*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 22, p. 15–25, mar. 2009.
- CASTRO, A. H. F. et al. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.(Malpighiaceae). **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 143-151, jan./mar. 2016.
- CASTRO, A. P. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, Alemanha, v.8, n. 19, 733-741, jan. 2015.
- CHIAVEGATTO, R. B. et al. Cell Viability, Cel viability, mitotic index and callus morphology of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae). **Tropical Plant Biology**, Estados Unidos, v. 8, p. 87–97, dez. 2015.
- CHIN, Y.; KINGHORN, A. D. Structural characterization, biological effects, and synthetic studies on xanthenes from mangosteen (*Garcinia mangostana*), a popular botanical dietary supplement. **Organic Chemistry**, Estados Unidos, v. 5, p. 355–364, nov. 2008.
- CUNHA B. L. et al. Evaluation of antimicrobial and antitumoral activity of *Garcinia mangostana* L. (mangosteen) grown in Southeast Brazil. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 29, n. 2, jun. 2014.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, mar./abr. 2014.
- FORTES, A. M., PAIS, M. S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabaceae): histological studies and changes in the starch content. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 7, p. 971-979, jul. 2000.
- FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Brasil, v.18, n. 4, p. 627-641, out./dez. 2008.
- GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, I. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA: Brasília, v. 2, p. 533–568, 1999.
- JOHANSEN D. Plant microtechniques. **McGraw Hill Publication**, New York. 1940.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S. K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, Brasil, v. 89, 86-125, set. 2013.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Estados Unidos, v. 30, p. 421-427, 1980.

LUCZKIEWICZ, M.; KOKOTKIEWICZ, A.; GLOD, D. Plant growth regulators affect biosynthesis and accumulation profile of isoflavone phytoestrogens in high-productive *in vitro* cultures of *Genista tinctoria*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Estados Unidos, v. 118, p. 419-429, set. 2014.

MURATA, R. M. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries *in vivo* by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, Reino Unido, v. 26, n. 7, p. 865-872, out. 2010.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, Estados Unidos, v. 12, n. 2, p. 403-407, maio. 2009.

NASCIMENTO, W. M. O.; DE CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. Caracterização morfológica da semente e da plântula de bacurizinho (*Rheedia acuminata* (Ruiz et Pav.) Plachon et Triana - CLUSIACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 555-558, 2002.

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, Alemanha, v. 73, p. 644-649, 2007.

NOGUEIRA, R. C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, set. 2008.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, Austria, v. 59, n. 2, p. 368-373, jun. 1965.

PÁDUA, M. S. et al. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) proembryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 1545-1556, nov. 2013.

PEREIRA, I. O. et al. Natural Products from *Garcinia brasiliensis* as Leishmania Protease Inhibitors. **Journal of Medicinal Food**, Estados Unidos, v. 14, n. 6, p. 557-562, maio. 2011.

QADRY, J. S. Shah and Qadry's Pharmacognosy. **Ahmedabad, India: BS Shah Prakashan**, 2008.

REUTRAKUL, V. et al. Cytotoxic and anti-HIV-1 xanthenes from the resin and fruits of *Garcinia hanburyi*. **Planta Medica**, Alemanha, v. 73, p. 33-40, 2007.

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Artmed, 2013.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2005.

VENTRELLA, M. C. et al. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. Viçosa, UFV, 2013.

VERDEIL J. L. et al. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends Plant Science**, v. 12, p.245–252, jun. 2007.

VIEIRA, E. L.; MONTEIRO, C. A. Hormônios vegetais. In: CASTRO, P. R. C., SENA, J. O. A. DE, KLUGE, R. A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: EDUEM, p. 79-104, 2002.

CAPÍTULO 3 Efeito elicitor do ácido salicílico na produção de metabólitos secundários em calos de *Garcinia brasiliensis*

A seguir é apresentada uma introdução do tema abordado neste capítulo com o propósito de criar embasamento teórico para a análise e discussão dos resultados.

1 INTRODUÇÃO

A *Garcinia* é o gênero que possui mais espécies na família Clusiaceae e apresenta uma diversidade considerável de metabólitos como os derivados fenólicos oxigenados e prenilados, por exemplo, as xantonas, os flavonoides, ácidos fenólicos e benzofenonas (CHIN; KINGHORN, 2008). As quatro principais classes de compostos secundários encontrados na família Clusiaceae são xantonas, cumarinas, biflavonoides e benzofenonas (ACUÑA et al., 2009). Os biflavonoides são comuns na família Clusiaceae, particularmente em *Garcinia* (HAFNER; FRAHM, 1993), onde o composto foi registrado em 32 espécies do gênero (FERREIRA et al., 2012). Os biflavonoides são compostos polifenólicos de ocorrência natural e são onipresentes nas plantas vasculares e apresentam propriedades promissoras (LOBSTEIN-GUTH et al., 1998). No gênero *Garcinia* tem se destacado a ocorrência de biflavonoides dos tipos GB1, GB-1a, morelloflavona (fukugetina) e amentoflavona (WATERMAN et al., 1983). O fato dos biflavonoides apresentarem propriedades biológicas e/ou farmacológicas constitui o seu uso medicinal.

A 7-epiclusianona é uma benzofenona tetraprenilada natural isolada pela primeira vez a partir de frutos de *Rheedia gardneriana* (SANTOS et al., 1999) e apresenta atividade anti-anafilática (NEVES et al., 2007), antimicrobiana (NALDONI et al., 2009), anti-espasmódico (COELHO et al., 2008), anti-proliferativa (MURATA et al., 2010) e leishmanicida (PEREIRA et al., 2010), antibacteriana, antinoceptiva, antioxidante e citotóxica (FERREIRA; CARVALHO; SILVA, 2012).

Para aumentar a produção desses metabólitos secundários, de interesse econômico ou medicinal, vem sendo estudadas estratégias como a adição de elicitores, como o ácido salicílico (AS) no meio de cultura em cultivo de células *in vitro* (PEREZ-ALONSO et al., 2014). A elicitação consiste no estímulo de um estresse químico ou físico nas células para

induzir a produção de metabólitos secundários que frequentemente não são produzidos (LARA, 2014).

O AS atua como uma enzima chave entre o metabolismo primário e secundário, envolvida na rota da produção de compostos do metabolismo secundário (YAN et al., 2013). Atua no sistema antioxidante regulando vários processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas (ORABI et al., 2015) dependendo da sua concentração, tipo da planta/explante, fase de crescimento da planta e condições ambientais (MIURA; TADA, 2014).

Para a utilização de técnicas como o cultivo de células *in vitro* para produção de metabólitos secundários é necessário a determinação das condições de produção ótima, por exemplo, o emprego de metodologias utilizando elicitores no meio de cultivo com a finalidade de incrementar a produção de compostos de interesse (ZABALA et al., 2009). Nesse contexto, o objetivo do estudo foi testar o efeito do ácido salicílico como elicitador na produção de metabólitos secundários em calos de *Garcinia brasiliensis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esta sessão trata do material e métodos utilizados nos experimentos deste trabalho.

2.1 CALOGÊNESE DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE BACUPARI

Frutos de *Garcinia brasiliensis* foram coletados de plantas situadas no município de Viçosa, MG, na segunda quinzena de fevereiro de 2015. Esses frutos foram despulpados e suas sementes permaneceram por 30 dias sobre a bancada do laboratório a temperatura de 22°C para secagem e retirada do tegumento.

Para a desinfestação dos embriões foi utilizado álcool 70% por 2 minutos e, posteriormente, hipoclorito de sódio a uma concentração 2,5% de cloro ativo por 15 minutos. A seguir, os embriões foram enxaguados por, no mínimo, três vezes em água destilada e autoclavada. Este processo foi feito em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e radiação UV por 20 minutos.

Os embriões foram segmentados transversalmente e inoculados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo 30 mL de meio de cultura, sendo 10 segmentos por placa.

O meio de cultura utilizado foi o WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, com a combinação 72 µM 2-iP + 28,73 µM 2,4-D. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem que foi efetuada a 121° C, pressão de 1,0 atm e por um período de 20 minutos.

2.2 INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A sessão a seguir trata do material e métodos realizados para produção de metabólitos secundários.

2.2.1 Utilização do Ácido Salicílico como Elicitor

O AS foi utilizado como elicitor em meio de cultura WPM com ausência e presença de 72 μM de 2-iP e 28,73 μM de 2,4-D.

2.2.2 Ausência de 2,4-D e 2-iP

Após 45 dias, os calos foram separados do segmento de embrião zigótico e inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura WPM com AS (0,1; 1; 10; 100 μM) e ausência de AS. Foi adicionado ao meio 150 mg.L^{-1} de ácido ascórbico para evitar oxidação conforme Werner et al (2008). Os tubos foram levados para B.O.D., a 25 °C e ausência de fotoperíodo.

2.2.3 Presença de 2,4-D e 2-iP

Após 60 dias de cultivo, os calos foram separados do segmento de embrião zigótico e inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura WPM com 72 μM de 2-iP e 28,73 μM de 2,4-D e diferentes concentrações de AS (0,1; 1; 10; 100 μM) e ausência de AS. Foi adicionado ao meio 150 mg.L^{-1} de ácido ascórbico. Os tubos foram levados para B.O.D., a 25 °C e ausência de fotoperíodo.

2.3 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

Os calos expostos ao AS foram utilizados para os testes fitoquímicos realizados a cada 30 dias em um período total de 150 dias; com o intuito de determinar o conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides totais, epiclusianona e fukugetina.

2.3.1 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos os calos foram pesados e para cada 100 mg de amostra foi adicionado 1mL de álcool absoluto para a maceração das amostras. Estas foram agitadas em agitador orbital Marconi MA-420 por 2 horas a 223 rpm. As amostras foram centrifugadas por 30 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi coletado em tubos falcon de massa conhecida. Repetiu-se a operação até o sobrenadante ficar incolor. Os tubos falcons foram colocados abertos em banho maria a 45°C até completa secagem do líquido etanólico da extração dos calos. Da massa seca que permaneceu no tubo foi preparado um extrato etanólico 1%. Para cada 10 mg de massa seca foi adicionado 1 mL de álcool absoluto (SANTOS FILHO, 2014, adaptado).

Para tanto, foram usados 5 calos de cada tratamento, totalizando 5 repetições por tratamento.

Os extratos foram utilizados para a determinação do conteúdo dos compostos fenólicos e flavonoides totais como também para quantificação de 7-epiclusianona e fukugetina.

2.3.2 Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado como descrito por Ainsworth e Gillespie (2007). Desta forma, alíquotas de 10 µL de solução de extrato etanólico de calo 1% foram misturadas com 240 µL de água destilada e com 1,25 mL do reagent Folin-Ciocalteu 10%. Após 8 min, foi adicionado 1,0 mL de carbonato de sódio 4%. As amostras foram incubadas por 2 horas na ausência de luz. A absorbância foi medida a 740 nm. A concentração de fenólicos foi calculada a partir de uma curva padrão de ácido gálico.

2.3.3 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

Alíquotas de 5 μ L de solução de extrato etanólico de calo 1% foram misturadas com 2,445 mL de etanol 80%, 50 μ L de acetato de potássio 10% e 50 μ L de nitrato de alumínio. Para o branco da amostra fez-se o mesmo, porém não foi acrescentado o nitrato de alumínio. Em seguida, as amostras foram incubadas por 40 min a temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 415 nm. A concentração de flavonóides foi calculada a partir de uma curva padrão de quercetina (PARK et al., 1997).

2.4 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

As curvas de crescimento dos calos foram obtidas a partir da pesagem antes da inoculação e a cada 30 dias. Para determinação da curva de crescimento, pesaram-se 10 calos de cada tratamento realizando o seguinte cálculo: massa do dia da pesagem menos massa inicial que era a massa do calo antes da inoculação em meio de cultura com elicitor.

As médias obtidas das diferenças entre as massas foram usadas para traçar as curvas e determinar a cinética de crescimento dos calos.

2.5 DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA FUKUGETINA E 7-EPICLUSIANONA

A análise da produção de fukugetina e 7-epiclusianona foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu LC-100 como descrito por Santa-Cecília et al. (2011). A identificação dos compostos foi feita com base no tempo de retenção e espectro de absorção de compostos padrão previamente isolados e caracterizados no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da Unifal-MG.

Foram analisadas amostras de calos com 30 e 90 dias expostos ao AS com ausência e presença de 2,4-D e 2-iP.

2.6 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DNA E NÍVEL DE PLOIDIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os calos foram coletados aos 150 dias após a inoculação. Aproximadamente 20-30 mg de calos foram triturados com auxílio de uma lâmina de bisturi em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para obtenção da suspensão nuclear (DOLEŽEL, 1997). O tecido triturado foi aspirado através de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear filtrada em uma malha de 50 μm . A suspensão nuclear foi corada com 25 μL de uma solução composta de iodeto de propídeo ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 5 μL de RNase. Os histogramas foram obtidos no citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson) com o programa Cell Quest.

2.7 DELIENAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 5 concentrações de AS (0,1; 1; 10 e 100 μM) e controle utilizando-se 10 repetições para curva de crescimento de calos e 5 repetições para as análises fitoquímicas. Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de significância pelo teste Scott-Knott, utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão trata dos resultados obtidos neste trabalho e respectivas discussões.

3.1 USO DO ÁCIDO SALICÍLICO COMO ELICITOR

A seguir são relatados os resultados das análises dos teores dos compostos fenólicos, flavonoides totais e da curva de crescimento, como também as respectivas discussões, quando os calos foram submetidos aos tratamentos com AS.

3.2 USO DO ÁCIDO SALICÍLICO COMO ELICITOR E AUSÊNCIA DE 2-IP E 2,4-D

Esta sessão trata dos resultados obtidos neste trabalho e respectivas discussões referente ao uso do AS como elicitor e ausência de 2-iP e 2,4-D.

3.2.1 Teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e curva de crescimento

Quanto ao teor de compostos fenólicos, aos 30 dias, todas as concentrações testadas foram favoráveis à produção desses compostos, exceto a concentração 100 μM de AS. Provavelmente, a concentração de 100 μM AS pode ter sido muito alta, resultando na redução da síntese desses compostos (Figura 1 A).

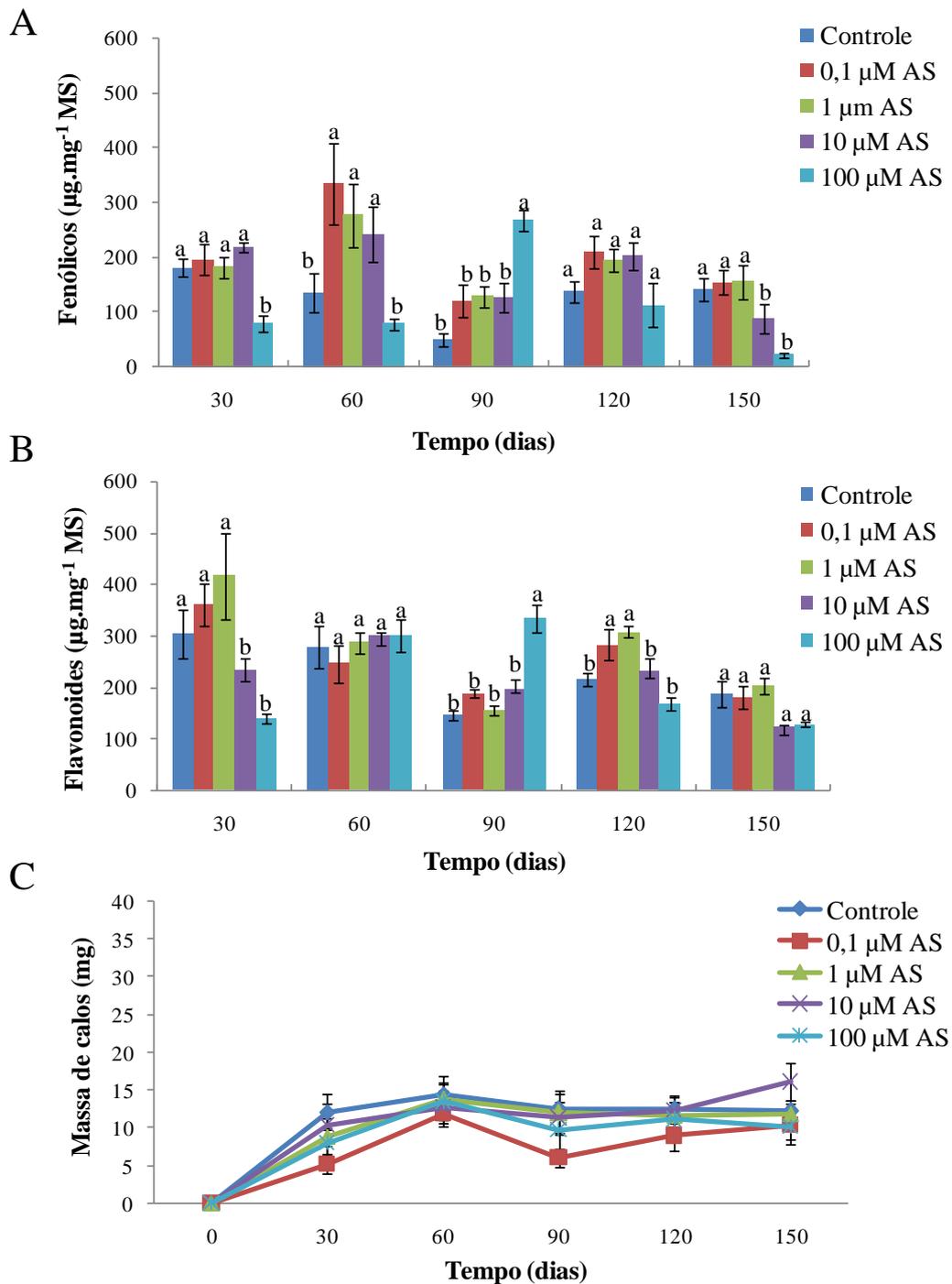


Figura 1. (A) Teor de fenólicos, (B) Teor de flavonoides e (C) massa dos calos de *G. brasiliensis* expostos a diferentes concentrações de ácido salicílico na ausência de 2 iP e 2,4-D em função do tempo de exposição.

Gadzovska et al. (2013) também encontraram maior acúmulo de fenólicos ao usarem baixas concentrações AS (inferior a 100 µM) como elicitador na cultura de calos de *Hypericum perforatum*. O fato do teor de compostos fenólicos dos calos expostos às

concentrações de 0,1; 1 e 10 μM AS ter sido igual ao controle pode ser atribuído ao curto período de tempo em que estes calos estavam expostos aos tratamentos (Figura 1 A).

Aos 60 dias, nos tratamentos controle e 100 μM de AS houve menor produção de compostos fenólicos, indicando que concentrações intermediárias de AS promoveram a síntese de fenólicos. Aos 90 dias de exposição, houve maior produção de compostos fenólicos na concentração de 100 μM de AS (268,1 $\mu\text{g mg}^{-1}\text{MS}$), provavelmente devido ao estresse causado pela alta concentração de AS levando a maior produção de fenóis em que estes se caracterizam como antioxidantes (Figura 1 A). Segundo Tounekti; Hernández; Munné-Bosch (2013), o AS tem sido reconhecido como um mensageiro de sinal de resposta da planta ao estresse abiótico, assim, este composto pode afetar tanto o acúmulo de isoprenoides como de flavonoides para o controle da oxidação.

Aos 120 dias, não houve efeito das concentrações sobre a produção dos compostos fenólicos (Figura 1 A). Aos 150 dias da inoculação, houve redução significativa do teor de compostos fenólicos nas maiores concentrações de 10 e 100 μM de AS, sugerindo que o tempo de exposição dos calos de Bacupari associado às concentrações elevadas de AS resultaram em redução de compostos fenólicos. De uma maneira geral, aos 60 dias de exposição ao AS foi considerado o melhor período para a extração de fenóis em calos de Bacupari, sendo a concentração de 0,1 μM de AS a mais indicada por apresentar uma melhor relação custo/benefício (Figura 1 A).

Quanto ao teor de flavonoides, houve maior produção desses compostos quando comparado ao teor de compostos fenólicos, possivelmente à grande quantidade de biflavonoides produzidos comuns na família Clusiaceae, particularmente em *Garcinia* (HÄFNER, FRAHM, 1993; WATERMAN, HUSSAIN, 1983). Os calos com 30 dias de exposição ao AS tiveram os valores significativamente reduzidos nas concentrações de 10 e 100 μM , sendo os maiores teores encontrados nas concentrações de 0,1 e 1 μM de AS e controle (360,40; 416,86 e 303,40 $\mu\text{g.mg}^{-1}\text{MS}$, respectivamente) (Figura 1 B). Assim como observado para os compostos fenólicos, o curto tempo de exposição ao AS pode ter limitado a produção desses compostos.

Com 60 dias de exposição, embora não tenha sido observada diferença significativa entre as concentrações testadas, foi possível observar que as concentrações de 10 e 100 μM de AS promoveram o aumento dos flavonoides em relação ao período de 30 dias, de modo a se equiparar com o tratamento controle, provavelmente o tempo de exposição de 30 dias não foi suficiente para promover aumentos significativos na produção de flavonoides (Figura 1 B). Aos 90 dias, houve maior produção de flavonoides na concentração 100 μM de

AS, este comportamento foi concomitante à produção de fenólicos, provavelmente o tempo de exposição de 90 dias associada à concentração de 100 μM de AS na ausência de auxina e citocinina seja suficiente para uma produção significativa tanto de compostos fenólicos quanto de flavonoides (Figura 1). Aos 120 dias de exposição, o teor de flavonoides foi significativamente maior nas concentrações de 0,1 e 1 μM de AS quando comparado às demais concentrações. Aos 150 dias de exposição, às diferentes concentrações de AS não influenciaram no teor de flavonoides (Figura 1 B), indicando que o tempo de exposição de 150 dias não favoreceu teores significativos desses compostos.

Em relação à massa de calos, as curvas de crescimento de cada concentração não diferenciaram entre si. Nos tratamentos controle e 10 μM de AS ocorreu desaceleração do crescimento após 30 dias de exposição (Figura 1 C). Segundo Lima et al. (2008), esta desaceleração ocorre como um resultado da utilização total dos nutrientes e o acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultura. No início desta fase de desaceleração do crescimento é apropriado o subcultivo dos calos em novo meio de cultura. O crescimento lento dos calos observado nos primeiros 60 dias da inoculação sem a presença de 2-iP e 2,4-D indica que a ausência destes reguladores no meio limita o crescimento da massa de calos, associado ao estresse de inoculação sofrido pelas células de explantes, devido a adaptação ao novo ambiente e novas condições nutricionais (AL-KHAYRI, 2012), além do choque de osmolaridade sofrido pelos calos (GASPAR et al., 2000; KEVERS et al., 2004).

Os calos, apesar da desaceleração após o primeiro mês, apresentaram aumento de massa até os 60 dias da inoculação, especialmente na concentração 0,1 μM de AS (Figura 1 C). De acordo Silva et al (2005), durante a fase exponencial e linear há o aumento dos níveis de proteínas que está diretamente relacionada ao aumento da atividade mitótica.

O ganho de massa pelos calos logo após inoculação também foi observado por Pohara et al. (2015) ao determinarem a curva de crescimento de calos de *Oryza sativa* em meio líquido NB (NITSCH; NITSCH, 1969) suplementado com 3 mg.L^{-1} de 2,4-D. Estes autores chamaram o ocorrido de crescimento exponencial na fase lag. Segundo Scragg e Allan (1993), a fase lag pode ser considerada como produtora de energia. A fase de crescimento exponencial é considerada como fase biossintética, período em que ocorre máxima divisão celular. Santos Filho et al. (2014), ao determinarem a curva de crescimento de calos de *G. brasiliensis* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 2,22 μM de 6-benzilaminopurina observaram a fase exponencial do 20º ao 60º dia após inoculação e fase linear entre o 60º e 100º dia.

Após 60 dias da inoculação, os calos entraram em uma fase estacionária, com pouca variação na massa (Figura 1 C). De acordo Smith (2013), na fase estacionária ocorre um decréscimo de nutrientes no meio de cultura e redução do O₂ no interior das células. Na concentração 0,1 µM de AS, o crescimento dos calos acompanhou a produção de fenólicos (Figura 1 A, C).

Ao se utilizar 10 µM de AS houve um aumento da massa dos calos com o tempo de exposição, em especial aos 150 dias, enquanto o teor de compostos fenólicos foi reduzido (Figura 1). Este efeito pode ser explicado pelo fato de que a reserva de carbono esteja sendo usada no metabolismo primário. Segundo Machado et al. (2006) quando o crescimento do calo pausa, altas quantidades de carbono não são mais necessárias para o metabolismo primário e os compostos secundários podem ser sintetizados.

3.3 CONTEÚDO DE FUKUGETINA E 7-EPICLUSIANONA NA AUSÊNCIA DE 2IP E 2,4-D

Com o tempo de exposição, houve aumento do teor de fukugetina em todas as concentrações testadas, exceto em calos submetidos à concentração de 100 µM (Figura 2 A). Os maiores conteúdos de fukugetina foram encontrados nos calos expostos a concentração de 0,1 para ambos os períodos, 166,98 µg.mg⁻¹MS aos 30 dias e 216,03 µg.mg⁻¹MS aos 90 dias (Figura 2 A). Os biflavonoides são os polifenóis mais dominantes na maioria das espécies de *Garcinia* (WATERMAN; HUSSAIN 1983). Estes compostos de ocorrência natural são comuns em todas as plantas vasculares e têm muitos efeitos biológicos e farmacológicos favoráveis (SETYAWAN, 2011).

Quanto a 7-epiclusianona, houve redução de seus teores nas concentrações 0,1 e 1 µM AS (Figura 2 B). Foi possível observar que calos expostos às concentrações de 0,1 e 1 µM AS apresentaram teores de fukugetina e 7-epiclusianona inversamente proporcional, onde há o aumento de fukugetina e decréscimo da 7-epiclusianona.

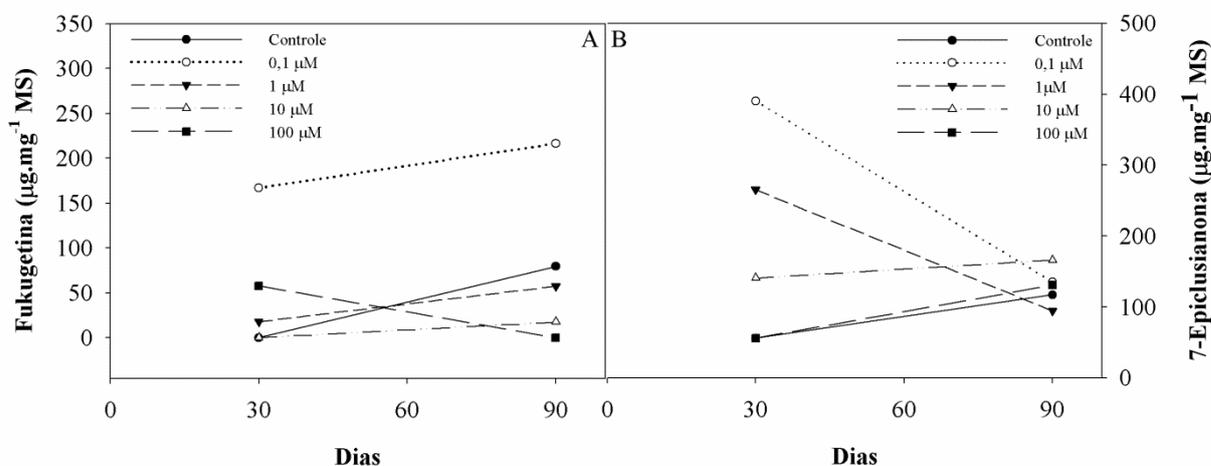


Figura 2. (A) Teor de fukugetina e 7-epiclusianona em calos de *G. brasiliensis* expostos ao AS na ausência de 2-iP e 2,4-D aos 30 e 90 dias.

A alteração da produção de benzofenonas na presença de elicitores, como ocorrido no presente estudo, pode ser explicado na literatura. Segundo Peters, Schmidt e Beerhues (1997), benzofenonas são intermediários na biosíntese de xantonas em plantas. Portanto, seria de esperar que qualquer elemento, como o AS, capaz de aumentar os níveis de compostos fenólicos, também aumentaria a quantidade de xantona presente em plantas (ABREU; MAZZAFERA, 2005) e, conseqüentemente, o conteúdo de 7-epiclusianona.

Observou-se que a redução dos teores de 7-epiclusianona nas concentrações 0,1 e 1,0 µM AS aos 90 dias, quando comparado aos 30 dias, pode estar associada à redução dos compostos fenólicos (Figuras 1 A; Figura 2 B). Já os aumentos de flavonoides e decréscimos de fukugetina podem estar relacionados a outros flavonoides presentes nos calos e que não foram quantificados (Figura 1 B; Figura 2 A).

3.4 USO DO ÁCIDO SALICÍLICO COMO ELICITOR E PRESENÇA DE 2-IP E 2,4-D

A seguir são relatados os resultados das análises dos teores dos compostos fenólicos, flavonoides totais e da curva de crescimento, como também as respectivas discussões, quando os calos foram submetidos aos tratamentos com AS na presença de 2-iP e 2,4-D.

3.4.1 Teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e curva de crescimento

Aos 30 e 60 dias de exposição ao AS, a concentração de 0,1 μM promoveu maior produção de fenólicos (254,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$ e 286,63 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$, respectivamente) em relação às demais concentrações (Figura 3 A). Aos 90 dias, a melhor concentração para a produção de fenólicos foi 10 μM de AS (291,02 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$). Aos 120 dias de exposição, houve redução do teor de compostos fenólicos no controle e no tratamento com 100 μM de AS (Figura 3 A), indicando que concentrações intermediárias foram favoráveis à produção desses compostos. Aos 150 dias, as melhores concentrações para a produção de compostos fenólicos foram 0,1 e 1 μM de AS (Figura 3 A), sugerindo que as maiores concentrações de 10 e 100 μM de A associada a um maior tempo de exposição aos tratamentos não induzem a produção de compostos fenólicos de forma significativa.

Com relação aos teores de flavonoides, aos 30 e 60 dias da inoculação, a concentração de 0,1 μM propiciou maior produção desses compostos (496,07 e 502,14 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$) em relação às demais concentrações. Assim houve o aumento de fenólicos concomitantemente ao aumento dos flavonoides (Figura 3 B). Segundo Hara et al. (2012), baixas concentrações de AS pode aumentar a capacidade antioxidante. Assim, o fato do AS ter proporcionado o aumento tanto de fenóis quanto de flavonoides na concentração 0,1 μM AS pode ser atribuído à sua regulação na síntese e atividade das enzimas antioxidantes (HE et al., 2002; FAYER; BAZAID, 2014), caracterizando assim a ação antioxidante do ácido salicílico.

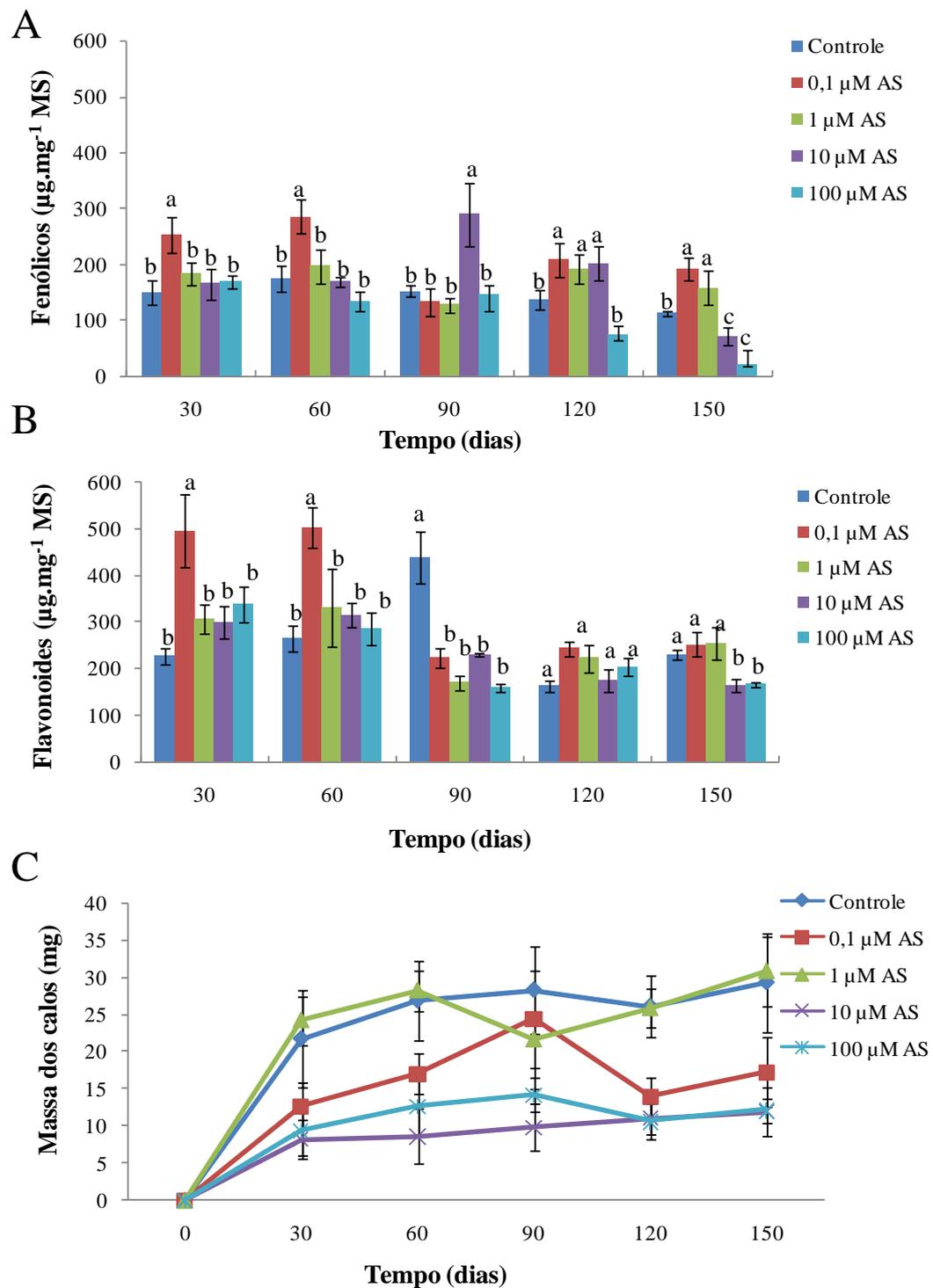


Figura 3. (A) Teor de fenólicos, (B) Teor de flavonoides e (C) massa dos calos de *G. brasiliensis* expostos a diferentes concentrações de ácido salicílico associadas à presença de 2 iP e 2,4-D em função do tempo de exposição.

Aos 90 dias, a presença do AS independentemente de sua concentração reduziu de forma significativa os teores de flavonoides quando comparado ao controle. Aos 120 dias, não houve diferença significativa entre as concentrações. Aos 150 dias, nas concentrações de 10 e 100 μM de AS com auxina e citocinina houve redução significativa do teor de flavonoides, provavelmente a interação dos reguladores + elicitor tenha resultado em uma inibição da síntese desse composto fenólico (Figura 3 B).

A massa de calos demonstrou um rápido aumento nos primeiros 30 dias da inoculação para todas as concentrações testadas quando comparadas as massas dos calos inoculados em meio sem a presença de auxina e citocinina (Figuras 3 C). O crescimento do calo é influenciado por vários fatores como a idade, tipo de explante, tipo e concentração dos reguladores de crescimento (FEITOSA et al. 2013). Assim, o crescimento de calos observado nos primeiros 30 dias no cultivo de Bacupari está relacionado especialmente ao acréscimo do 2iP e 2,4-D.

Calos desenvolvidos no tratamento controle e nas concentrações de 0,1 e 100 μM de AS tiveram uma desaceleração no crescimento do 30° ao 90° dia e declínio do 90° ao 120° dia. Já o tratamento com 1 μM de AS apresentou desaceleração do 30° ao 60° dia e declínio da massa dos calos do 60° ao 120° dia (Figura 3 C). Após 120 dias de exposição ao AS, os calos do controle; 0,1; 1 e 100 μM de AS voltaram a crescer (Figura 3 C).

No tratamento 0,1 μM de AS, o aumento de massa dos calos coincidiu com a redução da produção de fenólicos e flavonoides (Figura 3 C). Isso pode ser atribuído pela interação dos reguladores de crescimento que proporcionaram um aumento de massa, estimulando o metabolismo primário em detrimento ao metabolismo secundário (BOURGAUD et al., 2001).

No tratamento com 100 μM de AS, com o aumento do tempo de exposição, foi observado redução dos compostos fenólicos e flavonoides, seguido do aumento da massa de calos (Figura 2 A, B e 3 C). Com o declínio da massa dos calos dos 90 aos 120 dias, a produção de flavonoides foi aumentada. Quando os calos voltaram a crescer, após os 120 dias, a produção de fenólicos e flavonoides foi reduzida novamente (Figura 3). Segundo Barrios et al. (2009), quando os calos são cultivados em um meio de produção suplementado com alguns elicitores, o estado fisiológico do calo teria de ser alterado com a ação do metabolismo secundário, aumentando a síntese de compostos fenólicos.

A curva de crescimento do tratamento com 10 μM AS não apresentou declínio até o final do experimento, sugerindo que não houve morte celular (Figura 3 C).

Foi possível observar que a curva de crescimento de calos utilizando-se a associação do AS + auxina + citocinina foi maior quando comparada a curva de crescimento na ausência de 2,4-D e 2-iP. Tal comportamento pode ser explicado pelo fato do AS reforçar o crescimento e divisão celular através da regulação de outros hormônios como a auxina, citocinina, giberelina e ABA (ácido abicísico) (ZARGHAMI et al., 2014).

Ao final dos experimentos, os calos da maioria dos tratamentos continham menor teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, isso pode ser atribuído a exsudação dos compostos para o meio de cultivo, resultando em seu escurecimento (Figura 4).

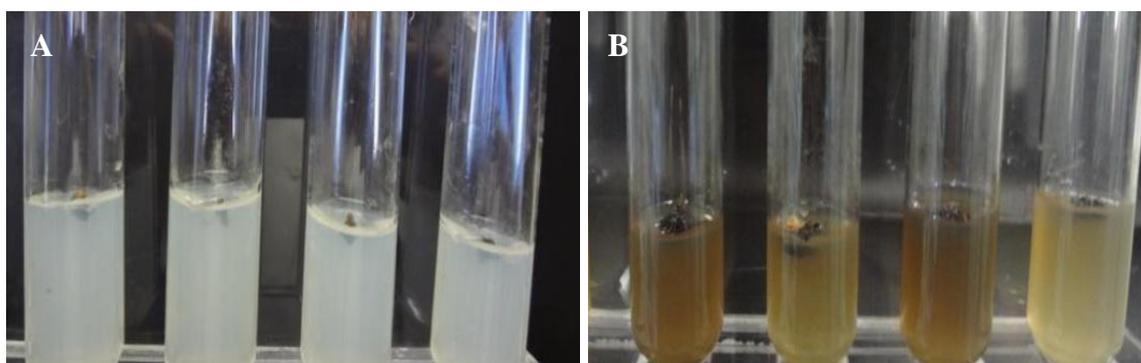


Figura 4. Calos de *G. brasiliensis* expostos ao controle com 38 dias (A) e 150 dias após inoculação (B).

O escurecimento do meio de cultura é um fenômeno que ocorre com frequência. Em experimento recente de Dong et al. (2016) há a confirmação de que o escurecimento é atribuído a uma reação fisiológica enzimática e biossíntese de fenólicos. Estes autores isolaram extrato de meio de cultura escurecido e encontraram flavonoides derivados da via da fenilpropanoide e concluíram que estes são os principais compostos responsáveis por este fenômeno.

O fato de ter sido encontrado menores teores de compostos fenólicos e flavonoides totais nos calos expostos 120 e 150 dias provavelmente é devido à ausência de estruturas de acumulação ou tecido organizado com função de armazenamento (Figura 3).

A ausência de estruturas de acumulação em calos pode ser uma razão para a não acumulação dos compostos fenólicos e estes serem exudados para o meio de cultura. Algumas espécies de plantas armazenam os metabólitos secundários em estruturas especializadas como cavidades para óleos (Myrtaceae), canais de resinas (Pinaceae) ou tricomas granulares (Lamiaceae) (BOIX et al., 2011). A produção de metabólitos secundários é consequência de processos bioquímicos altamente regulados, ou seja, é resultado da integração dos processos de biosíntese, degradação, transporte e acumulação do produto. Para que um determinado composto seja acumulado é preciso que os tecidos que os produzem

contenham os precursores metabólicos deste composto, as enzimas adequadas para convertê-los no produto e as estruturas onde o mesmo ficará armazenado (PLETSCH, 1998).

3.5 CONTEÚDO DE FUKUGETINA E 7-EPICLUSIANONA

Na presença de 2-iP e 2,4-D, com o aumento do tempo de exposição houve maior produção de fukugetina e 7-epiclusianona em calos expostos à concentração 10 μM de AS (Figura 5), mostrando que o AS associado com auxina e citocinina estimularam de forma significativa o acúmulo desses metabólitos secundários. Observou-se que houve maior produção da benzofenona 7-epiclusianona quando comparado ao biflavonoide fukugetina (Figura 5). A obtenção de maior teor de benzofenonas é importante, pois esta substância age na indução de apoptoses e bloqueio do início do ciclo celular na fase G1, e impedindo a transcrição e tradução de importantes reguladores do ciclo celular envolvidos na progressão de células cancerosas. Portanto a 7-epiclusianona pode ser importante na prevenção e tratamento do câncer (PROTIVA et al., 2008).

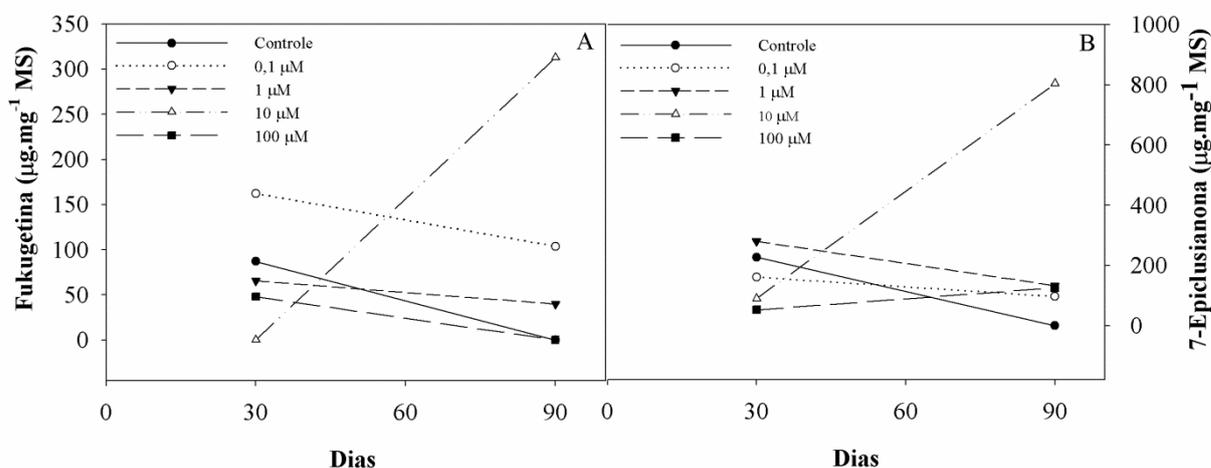


Figura 5. Teor de fukugetina e 7-epiclusianona de calos de *G. brasiliensis* expostos ao AS na presença de 2-iP e 2,4-D aos 30 e 90 dias.

Aos 30 dias não foi encontrado fukugetina nos extratos dos calos da concentração de 10 μM de AS. E aos 90 dias não foi encontrado fukugetina nos calos do controle e da concentração de 100 μM de AS (Figura 5 A).

Quanto a 7-epiclusianona, aos 30 dias, os maiores teores foram encontrados nos extratos dos calos do controle e expostos a 1 μM de AS. Aos 90 dias, os calos do controle não continham 7-epiclusianona e os extratos dos calos expostos a 10 μM de AS foram os que apresentaram maior média no teor deste composto (803,59 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$) um valor oito vezes maior quando comparado à produção observada aos 30 dias (89,92 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$) (Figura 5 B). Estudos envolvendo a atividade antimicrobiana da epiclusianona em sementes de *G. brasiliensis* mostraram que esse composto apresenta atividade citotóxica, quimioprevenção do câncer, antifúngica, antitumoral e inibição de *Staphylococcus aureus* (NALDONI et al., 2009).

Observou-se que o aumento dos teores de fukugetina e 7-epiclusianona na concentração 10 μM AS aos 90 dias, quando comparado aos 30 dias está associado ao aumento dos compostos fenólicos (Figura 5; Figura 3 A). Porém, para os calos do controle, os teores de flavonoides aumentaram enquanto a fukugetina diminuíram. Isso pode ser devido ao fato de haver outros flavonoides, inclusive biflavonoides que não foram quantificados (Figura 3 B, Figura 5 A). A vantagem dos biflavonoides em relação aos flavonoides monoméricos se dá pelo fato de que são compostos farmacologicamente ativos com vantagens farmacocinéticas, apresentando maior biodisponibilidade destes metabólitos em comparação aos flavonoides simples (IWU et al., 1985).

3.6 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DNA E NÍVEL DE PLOIDIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Devido à grande quantidade de metabólitos secundários, os histogramas obtidos pela citometria de fluxo não apresentaram boa qualidade e continham detritos de fundo impossibilitando a análise da quantidade de DNA e nível de ploidia (Figura 6). Os números de núcleos analisados por leitura variaram de 258 a 5805. Isso pode ter sido causado pela inibição do corante iodeto de propídeo pelos compostos secundários ou de partículas de detritos aderidas nas superfícies dos núcleos isolados presentes nas amostras. Segundo PRICE et al. (2000), o modo de ação e a natureza química dos inibidores de fluorescência de iodeto de propídeo é desconhecida, provavelmente envolve um ou mais dos numerosos metabólitos secundários produzidos por plantas.

Pinto et al. (2004) notaram diminuição na fluorescência de iodeto de propídeo na citometria de fluxo de núcleos de *Eucalyptus globulus* e *Solanum Lycopersicum* em

amostras obtidas a partir de folhas de plantas de campo provavelmente por apresentarem maior teor de compostos secundários.

Os métodos convencionais de citometria de fluxo podem falhar com amostras específicas por uma variedade de razões. Um dos problemas pode ser a dificuldade para isolar núcleos intactos suficientes para a análise. Tal inconveniência é frequentemente associada com a estrutura mecânica e química da amostra. Por exemplo, os núcleos podem ser aprisionados no interior das células ou podem colar-se a compostos mucilaginosos. A agregação de partículas de detritos nas superfícies dos núcleos isolados é outro fenômeno que resulta em diminuição da resolução de histogramas. Pode ocorrer também a interferência de compostos citosólicos com o corante do DNA, o que geralmente resulta na diminuição da intensidade de fluorescência.

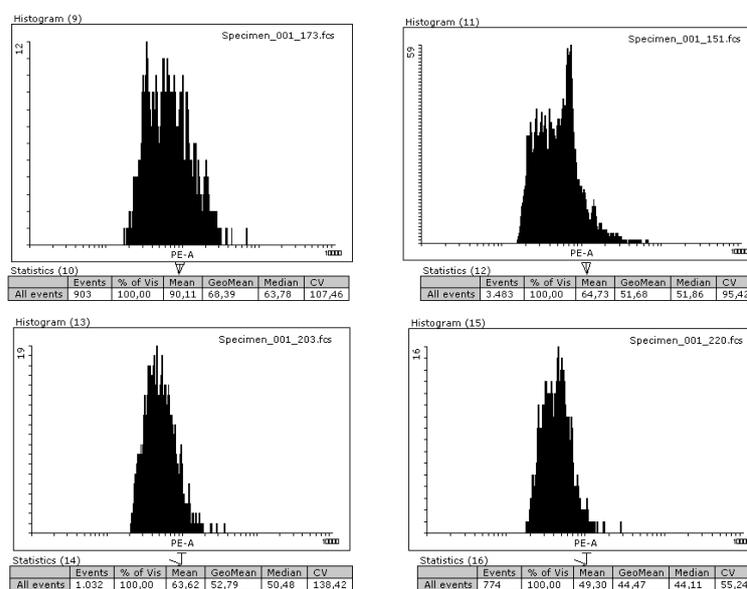


Figura 6. Histogramas resultantes de citometria de fluxo obtidos de calos de *G. brasiliensis* após 150 dias de exposição ao ácido salicílico.

Uma vez que os núcleos da amostra e o padrão podem ser afetados diferencialmente, a estimativa do conteúdo em DNA em unidades absolutas pode ser comprometida, como evidenciado, por exemplo, por uma fraca reprodutibilidade dos resultados. Outra dificuldade na medição de DNA por citometria de fluxo inclui a baixa permeabilidade da membrana plasmática pela maioria dos corantes, pois estes podem ligam-se a moléculas não específicas e a vários pigmentos de interferência ou metabólitos secundários (DOLEŽEL, 2007).

4 CONCLUSÕES

Altas concentrações de AS (10 e 100 μM) e maior tempo de exposição (120 e 150 dias) não implicaram maior acúmulo de compostos fenólicos e flavonoides totais.

O ácido salicílico demonstrou ser um elicitador abiótico eficiente na otimização de metabólitos secundários em calos de *G. brasiliensis*.

O maior tempo de exposição aos elicitadores não garantiram maiores teores de fukugetina e 7-epiclusianona.

Para a extração de metabólitos secundários de calos de *G. brasiliensis*, o melhor período seria no início da fase estacionária.

A associação de AS com auxina e citocinina requer uma maior concentração do elicitador e maior tempo de exposição. Para a utilização de AS na ausência de 2-iP e 2,4-D é necessário a concentração mínima testada do elicitador para a otimização da produção de fukugetina e 7-epiclusianona.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, Reino Unido, v. 2, p. 875-877, abr. 2007.
- ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, Países Baixos, v. 43, n. 3, p. 241-248, mar. 2005.
- ACUNÃ, U. M.; JANCOVSKI, N.; KENNELLY, E. J. Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: potential drugs and lead compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Países Baixos, v. 9, p. 1560-1580, nov. 2009.
- AL-KHAYRI J. M. Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, Emirados Árabes Unidos, v. 24, n. 5, p. 444-455, mar. 2012.
- BARRIOS, H. et al. Increase of taxol production in *Taxus globosa* Shoot callus by Chlorocholine Chloride. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, p. 33-37, 2009.
- BOIX, Y. F. et al. Glandular trichomes of *Rosmarinus officinalis* L.: anatomical and phytochemical analyses of leaf volatiles. **Plant Biosystems**, Reino Unido, v. 145, p. 848-856, 2011.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, Irlanda, v. 161, p. 839-851, 2001.
- CHIN, Y.; KINGHORN, A. D. Structural characterization, biological effects, and synthetic studies on xanthenes from mangosteen (*Garcinia mangostana*), a popular botanical dietary supplement. **Mini-Review in Organic Chemistry**, Países Baixos, v. 5, p. 355-364, 2008.
- COELLHO, L. P. et al. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 1, p. 206-214, out. 2008.
- DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Alemanha, v. 38, p. 285-302, 1997.
- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, Reino Unido, v. 95, p. 99-110, fev. 2005.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature protocols**, Reino Unido, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, set. 2007.
- DONG, Y. S. et al. Mechanisms and effective control of physiological browning phenomena in plant cell cultures. **Physiologia Plantarum**, Reino Unido, v. 156, n. 1, p. 13-28, out. 2016.

- FAYEZ, K. A; BAZAID, S. A. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Science**, v. 13, p. 45-55, jan. 2014.
- FEITOSA, L. S. et al. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L.(Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, Brasil, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, mar./abr. 2014.
- FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G.; SILVA, T. M. S. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. **Química Nova**, Brasil, v. 35, n. 11, p. 2271-2277, out. 2012.
- GADZOVSKA, S. et al. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Países Baixos, v. 113, n. 1, p. 25-39, abr. 2013.
- GASPAR, T. et al. Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Estados Unidos, v. 36, n. 3, p. 171-181, maio. 2000.
- GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Países Baixo, v. 58, p. 613-623, dez. 2012.
- HÄFNER, A.; FRAHM, A. W. Biflavonoids from the heartwood of *Garcinia schomburgkiana* and their structural elucidation as atropisomers. **Planta Medica**, Alemanha, v. 59, n. 1, p. A604-A604, 1993.
- HARA M. et al. Abiotic stress and role of salicylic acid in plants In: **Abiotic Stress Responses in Plants**, eds A. Parvaiza and M.N.V. Prasad (New York, NY: Springer), p. 235-251, 2012.
- HE, Y. L; LIU, Y.L; CHEN, Q; BIAN, A. H.. **Journal Plant Physiology Molecular Biology**, v. 28, p. 89-95, 2002.
- IWU, M. M. **Biflavonoids of Garcinia**: Pharmacological and biological activities. CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBONE, J. B., eds.; ALAN R. LISS, Inc.: New York, 1985.
- KEVERS, C. et al. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell**, Thermotolerance related to antioxidation induced by salicylic acid and heat hardening in tall fescue seedlings **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Países baixos, v. 77, n. 2, p. 181-191, 2004.
- LARA, Z. C. B. **Aproximación proteómica y metabólica de la producción de metabolitos secundarios em líneas celulares elicidadas de *Solanum lycopersicum***. 2014,

198f. Tese (Doutorado em Biologia). Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Cartagena, 2014.

LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n.1, p. 17- 22, jan./fev. 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings International **Plant Propagators Society**, Estados Unidos, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOBSTEIN-GUTH, A. et al. Isolation of amentoflavone from *Ginkgo biloba*. **Planta Medica**, Alemanha, v. 54, p. 555-556, 1998.

MACHADO, F. A. P. S. A. et al. Alkaloid production and Isozymes expression from cell suspension culture of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). **Journal of Plant Sciences**, Estados Unidos, v. 1, p. 324-331, 2006.

MIURA, K.; TADA Y.Y. Regulation of water, salinity and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers in Plant Science Plant Physiology**, v. 5, p. 1-12, jan. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Reino Unido, v. 15, n. 3, p. 473-497, jul.1962.

MURATA, R. M. et al. Antiproliferative effect of benzophenones and their influence on cathepsin activity. **Phytotherapy Research**, Reino Unido, v. 24, n. 3, p. 379–383, ago. 2010.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, Estados Unidos, v. 12, n. 2, p. 403–407, maio. 2009.

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, Alemanha, v. 73, n. 7, p. 644–649, 2007.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Estados Unidos, v. 163, n. 3862, p. 85-87, jan. 1969.

ORABI, S. A.; DAWOOD, M. G. SALMAN, S. R. Comparative study between the physiological role of hydrogen peroxide and salicylic acid in alleviating the harmful effect of low temperature o tomato plants grown under sand-ponic culture. **Scientia Agriculturae**, n. 9, v. 1, p. 49-59, jan. 2015.

PARK, Y. K. et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Brasil, v. 40, p. 97-106, mar. 1997.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, Alemanha, v. 17, n. 5, p. 339–345, set. 2010.

PÉREZ-ALONSO, N. L. et al. Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Colôbia, v. XVI, n. 1, p. 51-61, 2014.

PETERS, S.; SCHMIDT, W.; BEERHUES, L. Regioselective oxidative phenol couplings of 2, 3', 4, 6-tetrahydroxybenzophenone in cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. **Planta**, v. 204, n. 1, p. 64-69, dez. 1997.

PINTO, G. et al. Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**, Alemanha, v. 109, n. 3, 580-587, ago. 2004.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Brasil, v. 4, p. 12-15, 1998.

PRICE, H. J.; HODNETT, G.; JOHNSTON, J. S. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. **Annals of Botany**, Estados Unidos, v. 86, n. 5, p. 929-934, set. 2000.

PROTIVA, P. et al. Growth inhibition of colon cancer cells by polyisoprenylated benzophenones is associated with induction of the endoplasmic reticulum response. **International Journal of Cancer**. Estados Unidos, v. 123, n. 3, p. 687-694, ago. 2008.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, Países baixos, v. 670, p. 280-285, nov. 2011.

SANTOS, M. H. et al. 7-Epiclusianona: a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, Brasil, v. 22, p. 654-660, jan. 1999.

SANTOS FILHO, P. R. et al. Growth curve, biochemical profile and phytochemical analyses in calli obtained from the procambium segments of Bacupari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v.57, n.3, p. 326-333, maio/jun. 2014.

SCRAGG, A. H.; ALLAN, E. J. Picrasma quassioides Bennet (*Japanese quassia* tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlim: Springer-Verlag, 1993. v. 21, p. 249-268.

SETYAWAN, A. D. (2011). Review: natural products from genus *Selaginella* (Selaginellaceae). **Nusantara Bioscience**, Surakata, v. 3, n. 1, p. 44-58, out. 2011.

SILVA, A. L. C. et al. Growth characteristics and dynamics of protein synthesis in callus cultures from *Glycine wightii* (Wight e Arn.) Verdc. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1161-1166, nov.,/dez. 2005.

SMITH, R. H. **Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments**. 3. Ed. Texas: Elsevier, 2013, 188 p.

TOUNEKTI, T.; HERNÁNDEZ, I.; MUNNÉ-BOSCH, S. Salicylic Acid Biosynthesis and Role in Modulating Terpenoid and Flavonoid Metabolism in Plant Responses to Abiotic Stress. In: HAYAT, S.; AHMAD, A.; ALYEMENI, M. N. **Salicylic Acid: Plant Growth and Development**. Índia: Springer. 2013, cap. 8, p. 141-162.

YAN, S. et al. Salicylic acid activates DNA damage responses to potentiate plant immunity. **Molecular cell**, Estados Unidos, v. 52, n. 4, 602-610, nov. 2013.

WATERMAN, P. G.; HUSSAIN, R. A. Systematic significance of xanthenes, benzophenones and biflavonoids in *Garcinia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Reino Unido, v. 11, n.1, p. 21-28, mar. 1983.

WERNER, E. T., et al. Indução da calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Brasil, v. 5, p.1053-1055, jul. 2008.

ZABALA, M. A. et al. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, Colômbia, v. 62, n. 1, p. 4881-4895, abr. 2009.

ZARGHAMI M. et al. Effect of salicylic acid on morphological and ornamental characteristics of petunia hybrida at drought stress. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Science**, Índia, v. 4, p. 523-532, out. 2014.

CAPÍTULO 4 Indução da produção de metabólitos secundários em calos de *Garcinia brasiliensis* usando ácido jasmônico como elicitador

A seguir é apresentada uma introdução do tema abordado neste capítulo com o propósito de criar embasamento teórico para análise e discussão dos resultados.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Garcinia* tem demonstrado pelos estudos fitoquímicos, ser possuidor de uma grande diversidade de metabólitos secundários como os compostos fenólicos (benzofenonas, xantonas e flavonoides). Muitos desses compostos são princípios ativos com propriedades farmacológicas contra várias doenças (SANTA-CECILIA et al., 2013; SANTOS FILHO et al., 2014).

Para aumentar a produção desses metabólitos secundários, de interesse econômico ou medicinal, vem sendo estudadas estratégias como a adição de elicitores, como o ácido jasmônico (AJ), no meio de cultura em cultivo de células *in vitro* (DIOS-LOPEZ et al., 2011; LARGIA et al., 2015; PEREZ-ALONSO et al., 2014; PITTA-ALVAREZ et al., 2000; SAHU et al., 2013). Os estímulos externos por elicitores são capazes de provocar alterações na célula vegetal que conduzem a uma série de reações, favorecendo eficientemente o acúmulo de metabólitos secundários (SUDHA; RAVISHANKAR, 2002).

Os jasmonatos são produzidos a partir de estímulos externos ou de genes de expressão e estão presentes com maior atividade nos tecidos em crescimento. Geralmente, encontram-se presente nas plantas em concentrações menores que 10 μM , porém, seu nível pode variar em função do tecido, do período de desenvolvimento e do estímulo externo (MASON et al., 1992). Em baixa concentração (1 a 10 μM) nos tecidos atua na indução da expressão gênica, relacionada com a defesa da planta, sendo que em concentrações altas (acima de 50 μM) provoca senescência, induzindo a morte celular (MELLO, 2009).

Nesse contexto, são inúmeros fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos especiais, assim há a necessidade de estudos que visem detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que culminem em um material vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos (GOBBO-NETO; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011; GOUVEA et al., 2012; PAVARINI et al., 2012).

Considerando que a *G. brasiliensis* é uma espécie produtora de importantes compostos de interesse medicinal, e tendo em vista que, já se tem conhecimento na literatura da ação do ácido jasmônico (AJ) como indutor desses metabólitos secundários é importante conhecer o desempenho fisiológico da espécie frente ao elicitador de modo a sugerir a melhor concentração de AJ que possibilite uma otimização da produção de compostos fenólicos e flavonoides. Assim, o objetivo do estudo foi testar o efeito do AJ na produção de compostos fenólicos e flavonoides totais em calos de *G. brasiliensis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esta sessão trata do material e métodos utilizados nos experimentos deste trabalho.

2.1 CALOGÊNESE DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE BACUPARI

Frutos de *Garcinia brasiliensis* foram coletados de plantas situadas no município de Viçosa, MG, na segunda quinzena de fevereiro de 2015. Esses frutos foram despulpados e suas sementes permaneceram por 30 dias sobre a bancada do laboratório a temperatura de 22°C para secagem e retirada do tegumento.

Para a desinfestação dos embriões foi utilizado álcool 70% por 2 minutos e, posteriormente, hipoclorito de sódio a uma concentração 2,5% de cloro ativo por 15 minutos. A seguir, os embriões foram enxaguados por, no mínimo, três vezes em água destilada e autoclavada. Este processo foi feito em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e radiação UV por 20 minutos.

Os embriões foram segmentados transversalmente e inoculados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo 30 mL de meio de cultura, sendo 10 segmentos por placa.

O meio de cultura utilizado foi o WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, com a combinação 72 µM 2-iP + 28,73 µM 2,4-D. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem que foi efetuada a 121° C, pressão de 1,0 atm e por um período de 20 minutos.

Após 135 dias, os calos foram separados do segmento de embrião zigótico e inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura WPM com AJ (0,1; 1; 10; 100 µM) e, como controle, ausência de AJ + etanol (0,42 mL.L⁻¹).

O AJ foi diluído previamente em etanol, sendo a concentração final de etanol nos meios de culturas inferior a 0,05%. A solução de AJ, assim como o etanol para o controle, foram adicionadas aos meios de cultivo uma vez esterilizadas mediante filtração utilizando filtros estéreis de 0,22 µm e realizando o processo na câmara de fluxo laminar.

Os tubos foram levados para B.O.D., a 25 °C e ausência de fotoperíodo.

2.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

Os calos expostos ao AJ foram utilizados para os testes fitoquímicos realizados a cada 30 dias em um período total de 150 dias; com o intuito de determinar o conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides totais, epiclusianona e fukugetina.

2.2.1 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos os calos foram pesados e para cada 100 mg de amostra foi adicionado 1mL de álcool absoluto para a maceração das amostras. Estas foram agitadas em agitador orbital Marconi MA-420 por 2 horas a 223 rpm. As amostras foram centrifugadas por 30 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi coletado em tubos falcon de massa conhecida. Repetiu-se a operação até o sobrenadante ficar incolor. Os tubos falcons foram colocados abertos em banho maria a 45°C até completa secagem do líquido etanólico da extração dos calos. Da massa seca que permaneceu no tubo foi preparado um extrato etanólico 1%. Para cada 10 mg de massa seca foi adicionado 1 mL de álcool absoluto (SANTOS FILHO, 2014, adaptado).

Para tanto, foram usados 5 calos de cada tratamento, totalizando 5 repetições por tratamento. Os extratos foram utilizados para a determinação do conteúdo dos compostos fenólicos e flavonoides totais como também para quantificação de 7-epiclusianona e fukugetina.

2.2.2 Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado como descrito por Ainsworth e Gillespie (2007) com modificações. Desta forma, alíquotas de 10 µL de solução de extrato etanólico de calo 1% foram misturadas com 240 µL de água destilada e com 1,25 mL do reagent Folin-Ciocalteu 10%. Após 8 min, foi adicionado 1,0 mL de carbonato de sódio 4%. As amostras foram incubadas por 2 horas na ausência de luz. A absorbância foi medida a 740 nm. A concentração de fenólicos foi calculada a partir de uma curva padrão de ácido gálico.

2.2.3 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

Alíquotas de 5 μ L de solução de extrato etanólico de calo 1% foram misturadas com 2,445 mL de etanol 80%, 50 μ L de acetato de potássio 10% e 50 μ L de nitrato de alumínio.

Para o branco da amostra fez-se o mesmo, porém não foi acrescentado o nitrato de alumínio.

Em seguida, as amostras foram incubadas por 40 min a temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 415 nm. A concentração de flavonóides foi calculada a partir de uma curva padrão de quercetina (PARK et al., 1997).

2.3 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

As curvas de crescimento dos calos foram obtidas a partir da pesagem antes da inoculação e a cada 15 dias. Para determinação da curva de crescimento, pesaram-se 10 calos de cada tratamento realizando o seguinte cálculo: massa do dia da pesagem menos massa inicial que era a massa do calo antes da inoculação em meio de cultura com elicitor.

As médias obtidas das diferenças entre as massas foram usadas para traçar as curvas e determinar a cinética de crescimento dos calos.

2.4 DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA FUKUGETINA E 7-EPICLUSIANONA

A análise da produção de fukugetina e 7-epiclusianona foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu LC-100 como descrito por Santa-Cecília et al. (2011). A identificação dos compostos foi feita com base no tempo de retenção e espectro de absorção de compostos padrão previamente isolados e caracterizados no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da Unifal-MG.

Foram analisadas amostras de calos com 30 e 90 dias de exposição ao AJ.

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 5 concentrações de AJ (0,1; 1; 10 e 100 μM) e controle utilizando-se 10 repetições para curva de crescimento de calos e 5 repetições para as análises fitoquímicas. Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de significância pelo teste Scott-Knott, utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão trata dos resultados obtidos neste trabalho e respectivas discussões.

3.1 USO DO ÁCIDO JASMÔNICO COMO ELICITOR

A seguir são relatados os resultados das análises dos teores dos compostos fenólicos, flavonoides totais e da curva de crescimento, como também as respectivas discussões, quando os calos foram submetidos aos tratamentos com AJ.

3.2 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES TOTAIS E CURVA DE CRESCIMENTO

Ao avaliar o teor de compostos fenólicos presentes nos extratos dos calos expostos ao controle e as diferentes concentrações de AJ, constatou-se que para calos com 30 dias de exposição apenas a concentração de 0,1 μ M de AJ não favoreceu a produção destes compostos (Figura 1 A).

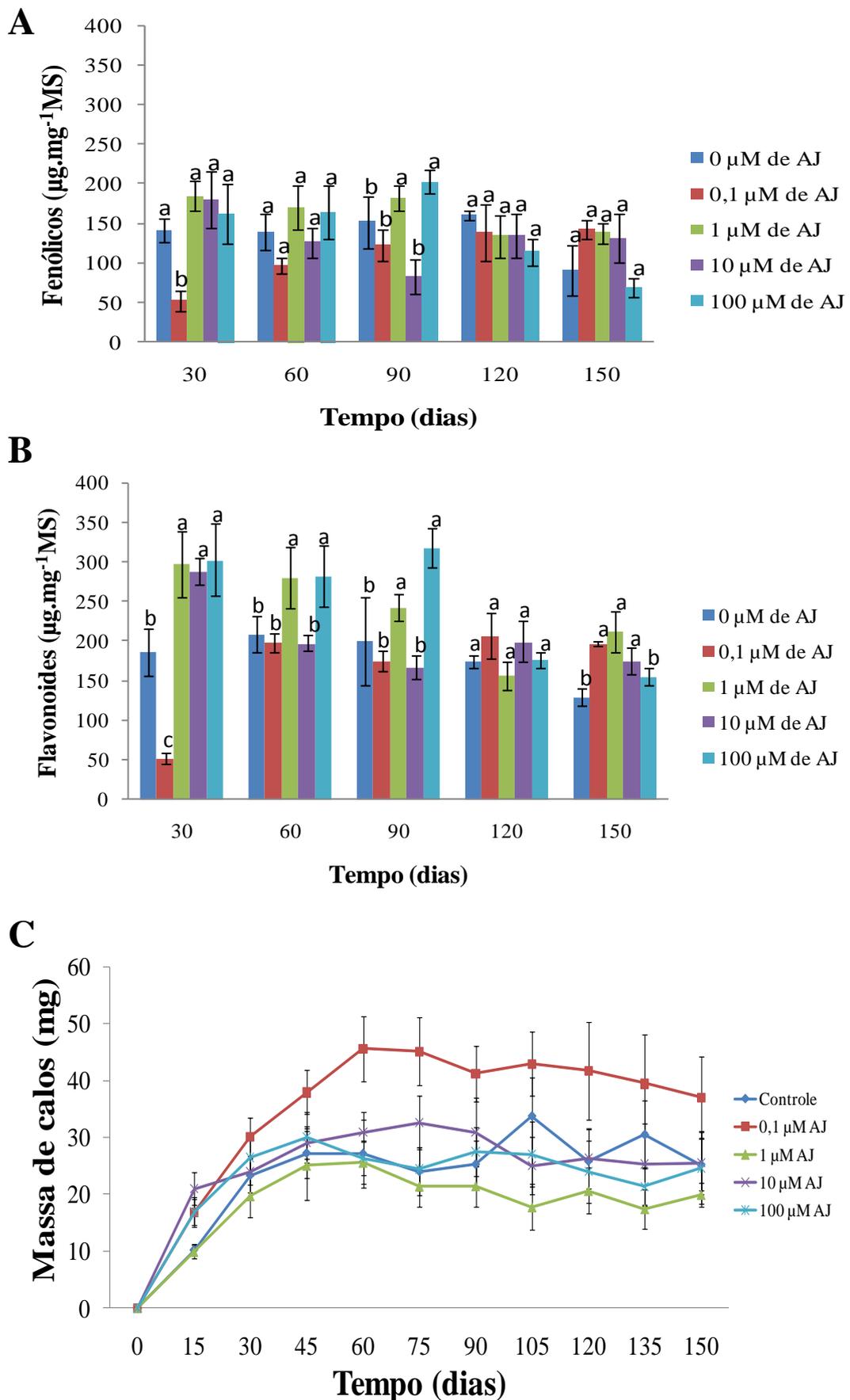


Figura 1. (A) Teor de fenólicos, (B) Teor de flavonoides e (C) massa dos calos de *G. brasiliensis* expostos a diferentes concentrações de AJ em função do tempo de exposição.

Aos 60 dias não houve diferença significativa entre o teor de fenólicos totais presente nos extratos das diferentes concentrações de AJ. Aos 90 dias, os calos cultivado na ausência de elicitor e nas concentrações de 1 e 100 de μM de AJ promoveram maior produção de compostos fenólicos, 151,94; 181,82 e 202,74 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$, respectivamente (Figura 1 A). Estudos sugerem que o AJ age como sendo um composto de sinalização importante no processo de elicitação levando à hiperprodução de vários metabolitos secundários (CHEONG; CHOI, 2003). Eles também têm sido relatados para desempenhar um papel-chave nos processos de transdução de sinal que regulam as respostas de defesa de plantas e mostrado eficaz para aumentar a produção de metabolitos secundários em culturas de células (WALKER, PAL BAIS, VIVANCO, 2002).

Quando os calos ficaram 120 e 150 dias expostos as diferentes concentrações de AJ, seus extratos não apresentaram diferença significativa quanto ao teor de compostos fenólicos (Figura 1 A).

Em relação à produção de flavonoides totais, aos 30 dias de exposição, os calos das concentrações 1, 10 e 100 μM de AJ produziram uma quantidade significativamente maior (297,70; 288,28 e 267,92 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$, respectivamente) (Figura 1 B) quando comparados aos calos do controle e da concentração de 0,1 μM de AJ. Tais resultados estão de acordo com Uppalapati et al. (2005) que afirmam aplicações exógenas de jasmonatos em cultura de células de várias espécies de plantas estimulam positivamente o fluxo de trabalho de vias biossintéticas secundárias, que conduz a um aumento da produção de metabolitos secundários diversificados, incluindo terpenoides, flavonoides, alcaloides e fenilpropanoides. Na cultura de calo de *Vitis vinifera*, a produção de flavonoides totais aumentou ao ser usado como elicitor 10 μM de jsmonato de metila por Çetin e Baydar (2016) e a máxima acumulação do flavonóide antocianina foi reportada por Zhang et al. (2002), ao adicionarem 20 μM de AJ em meio na cultura de células de *V. vinifera*.

Aos 60 e 90 dias, foram encontrados maiores teores de flavonoides nos extratos dos calos expostos as concentrações de 1 e 100 μM de AJ (Figura 1 B). Alguns trabalhos mencionam que baixas concentrações de jasmonato (até 10 μM) em meio de cultura favorecem a produção de metabolitos secundários (ALI; ABBASI; ALI, 2015; GUMEROVA, AKULOV, RUMYANTSEVA, 2015; RINCÓN-PÉREZ, et al., 2016). Porém, também tem sido relatado em outros estudos que a concentração de 100 de μM de jasmonato é eficiente na produção de metabolitos secundários *in vitro*. Na cultura de células de *Hypericum perforatum*, Wang et al. (2015) determinaram que 100 μM de um derivado do AJ, o jasmonato de metila, é a melhor concentração para a produção de flavonóides totais. O acúmulo de polifenóis em

cultura de células de *Linum album* foi reportado por Van Fürden, Humburg e Fuss (2005) após elicitação com 100 μM de jasmonato de metila como também por Ionkova, 2009.

Com 120 dias não houve diferença significativa entre as quantidades de flavonoides totais encontradas nos extratos dos calos expostos a diferentes concentrações de AJ e aos 150 dias, as concentrações intermediárias (0,1; 1 e 10 μM de AJ) que favoreceram maior produção de flavonoides totais pelos calos (Figura 1 B). O aumento do conteúdo do flavonoide daidzeína foi conseguido por Zaheer, Reddy e Giri (2016) quando adicionaram 10 μM de AJ no meio de cultura no cultivo de raiz de *Psoralea corylifolia*.

O fato de o AJ ter induzido a produção de flavonoides totais pode estar relacionado com regulação dos genes e enzimas da via de produção dos compostos fenólicos. Foi identificado por Gális et al. (2006) um fator de transcrição regulado por jasmonato de metila que induz uma série de genes do metabolismo dos fenilpropanoide, além de dirigir o acúmulo de vários fenilpropanoides. Diversas enzimas da rota dos fenólicos são induzidas pelos jasmonatos, dentre as quais a fenilalanina amônia liase (PAL) se destaca (GÁLIS et al., 2006; KIM et al., 2007; MIZUKAMI; TABIRA; ELLIS, 1993; SIRCAR; MITRA, 2008; XIAO et al., 2009). PAL é a primeira enzima da biossíntese de fenilpropanoides em plantas e é uma importante peça na biossíntese de flavonóides (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005). Jasmonatos em culturas de suspensão de células de *Hypericum perforatum* aumentaram a produção de flavonóides por meio da regulação da atividade de PAL (WANG et al., 2015).

Ao observar as curvas de crescimento dos calos (Figura 1 C), nota-se que os calos da concentração 10 μM de AJ tiveram um rápido ganho de massa nos 15 primeiros dias, depois deste período entraram na fase estacionária, não apresentando um aumento significativo; para os calos da concentração de 100 μM de AJ isto ocorreu após os 30 dias. Os calos do controle e da concentração 1 μM de AJ entraram na fase estacionária após os 45 primeiros dias. Os calos da concentração 0,1 μM de AJ tiveram aumento de massa até o 60º dia e depois disso entram na fase estacionária. Segundo Costa et al. (2015) o período ideal para extração dos metabólitos secundários produzidos em calos é na fase estacionária quando a produção de metabólitos primários praticamente cessa e a acumulação de metabólitos secundários começa. No entanto, estudos de diferentes metabólitos secundários devem ser realizados para estabelecer a sua cinética e avaliar os fatores envolvidos na sua produção.

Também é importante ressaltar que 0,1 μM de AJ favoreceu o crescimento dos calos, e estes entraram na fase estacionária aos 60 dias (Figura 1 C). Isto pode ser explicado por relatos na literatura de que a diminuição da produção de metabólitos secundários na fase em que há crescimento muito ativo de calos a alocação de carbono está distribuída

preferencialmente para o metabolismo primário. Assim, quando o crescimento pausa (fase estacionária), altas quantidades de carbono não são mais necessárias para o metabolismo primário e os compostos secundários podem ser sintetizados (BOURGAUD et al., 2001; MACHADO et al., 2006). Geralmente, em culturas de células, na fase exponencial (período em que ocorre máxima divisão celular) muitos metabólitos secundários são produzidos apenas em níveis baixos, ou não são produzidos (CUSIDÓ et al., 2002; MALIK et al., 2011).

Em culturas de células, na fase exponencial (período em que ocorre máxima divisão celular) muitos metabólitos secundários são produzidos apenas em níveis baixos, ou não são produzidos, uma vez que seus precursores primários são necessários para a formação de biomassa. Há evidências de que a indução da produção de metabólitos secundários a partir de compostos primários é mais eficaz na fase estacionária de crescimento. Por esta razão, uma boa estratégia para produção de metabólitos secundários *in vitro* é o estabelecimento de uma cultura de duas fases, na qual as células são primeiro mantidas numa forma ótima para a formação de biomassa e são então transferidos para um meio de produção ótima que estimula a síntese de compostos derivados. Este sistema tem a vantagem de permitir elicitores e precursores biossintéticos a ser adicionado no momento da produção máxima, isto é, na segunda fase da cultura (CUSIDÓ et al., 2002; MALIK et al., 2011).

A concentração que proporcionou maior aumento de massa e fase estacionária mais tardia foi o 0,1 μM de AJ, porém esta concentração não favoreceu a produção de compostos fenólicos e flavonoides totais durante os primeiros 90 dias do experimento, ou seja, na fase em que os calos ainda apresentavam aumento de biomassa (Figura 1 C). Quanto ao aumento de biomassa *in vitro* ao se usar jasmonatos, resultados semelhantes foram observados por Gumerova, Akulov e Rumyantseva (2015), que relataram o acúmulo de biomassa em cultura de células de *Fagopyrum tataricum* ao adicionarem 0,1 μM de jasmonato de metila em meio de cultura. A variação no acúmulo de várias proteínas envolvidas na energia e no metabolismo secundário pode ser causada pelos jasmonatos, sugerindo uma mudança do destino metabólico que pode causar um aumento no acúmulo de metabólitos secundários e/ou aumento da biomassa (RUIZ-MAY et al., 2011). Contudo, o efeito de jasmonatos no crescimento das plantas é variável entre as espécies. Enquanto alguns autores verificaram redução no crescimento (HEIJARI et al., 2005; ROSSATO et al., 2002), outros relataram aumento (AFTAB et al., 2011).

3.3 CONTEÚDO DE FUKUGETINA E 7-EPICLUSIANONA

A concentração de 0,1 μM de AJ não favoreceu a produção de fukugetina, pois o composto não foi encontrado nos calos expostos 30 e 90 dias nesta concentração de jasmonato (Figura 2 A). Nota-se que esta concentração de jasmonato foi a que menos favoreceu a produção de compostos fenólicos e flavonoides totais pelos calos (Figura 2).

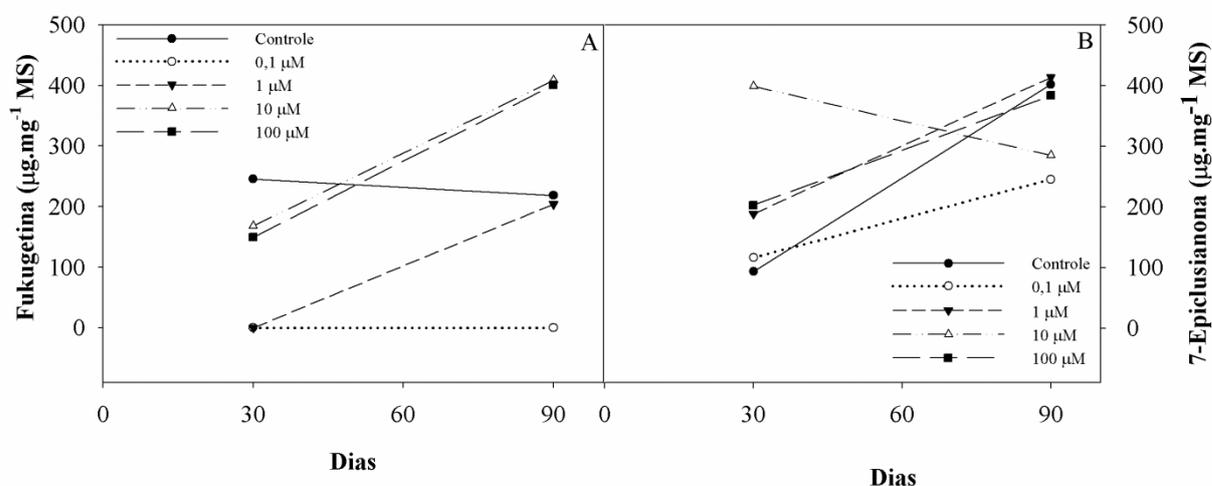


Figura 2. Teor de fukugetina e 7-epiclusianona de calos de *G. brasiliensis* expostos a 30 e 90 dias ao ácido jasmônico.

Os maiores teores de fukugetina foram encontrados nos calos expostos a concentração de 10 e 100 μM de AJ por 90 dias (408,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$ e 400,56 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$, respectivamente) (Figura 2 A).

Os biflavonoides são compostos polifenólicos de ocorrência natural e são onipresentes nas plantas vasculares e apresentam propriedades promissoras (LOBSTEINGUTH et al., 1998). No gênero *Garcinia* tem se destacado a ocorrência de biflavonoides dos tipos GB1, GB-1a, fukugetina e amentoflavona (WATERMAN; HUSSAIN, 1983).

Quanto a 7-epiclusianona, a maior produção foi aos 30 dias para os calos expostos a concentração de 10 μM de AJ (Figura 2 B). Os teores de fukugetina presentes nos extratos dos calos com 90 dias de exposição não se diferenciaram. O fato de o AJ alterar a produção de polifenóis como a 7-epiclusianona pode ser devido à indução da fenilalanina amônia liase (PAL) por jasmonatos, que tem sido observada por diversos autores (GÁLIS et al., 2006; KIM et al., 2007; MIZUKAMI; TABIRA; ELLIS, 1993; SIRCAR; MITRA, 2008; XIAO et al., 2009).

4 CONCLUSÕES

A concentração de 0,1 μM de AJ garantiu o incremento da massa dos calos de *G. brasiliensis* e, com aumento do tempo de exposição, foi favorável a produção de fenóis e de flavonoides.

A concentração de 0,1 μM de AJ não foi favorável para a produção de fukugetina e 7-epiclusianona quando os calos permanecem até 90 dias incubados.

Para a produção de fukugetina, a condição que mais foi favorável foi a exposição por 30 dias em meio de cultura WPM contendo 10 μM de AJ.

REFERÊNCIAS

AFTAB, T. et al. Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in *Artemisia annua* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, Estados Unidos, v. 30, n. 4, p. 425–435, dez. 2011.

AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, Reino Unido, v. 2, p. 875-877, abr. 2007.

ALI, M.; ABBASI, B. H.; ALI, G. S. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Países Baixos, v. 120, n. 3, p. 1099-1106, mar. 2015.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, Irlanda, v. 161, p. 839–851, abr. 2001.

ÇETIN, E. S.; BAYDAR, N. G. Elicitor Applications to Cell Suspension Culture for Production of Phenolic Compounds in Grapevine. **Tarım Bilimleri Dergisi**, Turquia, v. 22, n. 1, p. 42-53, dez. 2016.

CHEONG, J. J.; CHOI, Y. D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **Trends in Genetics**, Seul, v. 19, n. 7, p. 409-413, jul. 2003.

COSTA, J. L. et al. Callus Growth kinetics of physic nut (*Jatropha curcas* L.) and content of fatty acids from crude oil obtained *in vitro*. **Applied biochemistry and biotechnology**, Estados Unidos, v. 176, n. 3, p. 892-902, jun. 2015.

CUSIDÓ, M. R. et al. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of taxus media. **Biotechnology Progress**, Estados Unidos, v.18, n 3, p. 418-423, fev. 2002.

DIOS-LÓPEZ, Alonso de et al. Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. **Revista Chapingo. Serie horticultura**, México, v. 17, n. 2, p. 77-87, maio/ago. 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, mar./abr. 2014.

GÁLIS, I. et al. A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. **The Plant Journal**, Reino Unido, v. 46, n. 4, p. 573-592, abr. 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolites secundários. **Química Nova**, Brasil, v.30, n. 2, p. 374-381, out. 2007.

GOUVEA, D. R., GOBBO-NETO, L., LOPES, N. P. **The influence of biotic and abiotic factors on the production on secondary metabolites in medicinal plants**. In:

Cechinel-Filho, V. (Ed.), *Plant Bioactives and Drug Discovery*. John Wiley & Sons, Inc, New York, NY, USA, 519–452, 2012.

GUMEROVA, E. A.; AKULOV, A. N.; RUMYANTSEVA, N. I. Effect of methyl jasmonate on growth characteristics and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of tartary buckwheat. **Russian Journal of Plant Physiology**, Rússia, v. 62, n. 2, p. 195-203, mar. 2015.

HEIJARI, J. et al. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Reino Unido, v. 115, n. 1, p. 117-124, abr. 2005.

IONKOVA, I. Effect of methyl jasmonate on production of ariltetralin lignans in hairy root cultures of *Linum tauricum*. **Pharmacognosy Research**, Índia, v. 1, p. 102–105, jan. 2009.

KIM, H. J. et al. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 55, n. 25, p. 10366-10372, nov. 2007.

LARGIA, M. J. V. et al. Methyl jasmonate and salicylic acid synergism enhances bacoside A content in shoot cultures of *Bacopa monnieri* (L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Países Baixos, v. 122, n. 1, p. 9-20, fev. 2015.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Estados Unidos, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOBSTEIN-GUTH, A. et al. Isolation of amentoflavone from Ginkgo biloba. **Planta Medica**, Alemanha, v. 54, p. 555-556, 1998.

MACHADO, F. A. P. S. A. et al. Alkaloid production and Isozymes expression from cell suspension culture of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). **Journal of Plant Sciences**, Estados Unidos, v. 1, p. 324-331, 2006.

MALIK, S. et al. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. **Process Biochemistry**, Reino Unido, v. 46, n. 1, p. 23-34, jan. 2011.

MASON, H.S. et al. ALD, D.B.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. **Plant Physiology**, Estados Unidos, v. 98, p. 859-867, mar. 1992.

MELLO, R. **Caracterização dos componentes extracelulares produzidos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) durante resposta de hipersensibilidade**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MIZUKAMI, H.; TABIRA, Y.; ELLIS, B. E. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, Alemanha, v. 12, n. 12, p. 706-709, out. 1993.

- PARK, Y. K. et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Brasil, v. 40, p. 97-106, mar. 1997.
- PAVARINI, D. P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, Países Baixos, v. 176, p. 5-16, set. 2012.
- PÉREZ-ALONSO, N. L. et al. Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Colômbia, v. XVI, n. 1, p. 51-61, 2014.
- PITTA-ALVAREZ, S. I.; SPOLLANSKY, T. C.; GIULIETTI, A. M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**, Estados Unidos, v. 26, n. 2, p. 252-258, fev. 2000.
- RAMAKRISHNA, A., RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling Behavior**, Estados Unidos, v. 6, p.1720–1731, nov. 2011.
- RINCÓN-PÉREZ, J. et al. Fatty Acids Profile, Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Elicited Callus of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. **Journal of Oleo Science**, Japão, v. 65, n. 4, p. 311-318, set. 2016.
- ROSSATO, L. et al. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Reino Unido, v. 53, n. 371, p. 1131-1141, jan. 2002.
- RUIZ-MAY, E. et al. Methyl jasmonate induces ATP biosynthesis deficiency and accumulation of proteins related to secondary metabolism in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots. **Plant and Cell Physiology**, Reino Unido, v. 52, n. 8, p. 1401-1421, jun. 2011.
- SAHU, R.; GANGOPADHYAY, M.; DEWANJEE, S. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Polônia, v. 35, n. 5, p. 1473-1481, maio. 2013.
- SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, Países Baixos, v. 670, p. 280–285, Nov. 2011.
- SANTA-CECÍLIA, F.V.; ABREU, F.A.; DA SILVA, M.A.; DE CASTRO, E.M.; SANTOS, M.H. Estudo farmacobotânico das folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 3, p. 397-404, jan. 2013.
- SANTOS FILHO, P. R. et al. Growth curve, biochemical profile and phytochemical analyses in calli obtained from the procambium segments of Bacupari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.57, n.3, p. 326-333, maio/jun. 2014.

SIRCAR, D.; MITRA, A. Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. **Journal of Plant Physiology, Alemanha**, v. 165, n. 4, p. 407-414, mar. 2008.

SUDHA ,G.; RAVISHANKAR, G.; Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Países Baixos, v. 71, p. 181–212, dez. 2002.

UPPALAPATI, S.R. et al. The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. **Plant Journal**, Reino Unido, v. 42, p. 201–217, fev. 2005.

VAN FÜRDEN, B.; HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, Alemanha, v. 24, p. 312–317, abr. 2005.

WALKER, T. S.; PAL BAIS H.; VIVANCO J. M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, Reino Unido, v. 60, p. 89–293, jun. 2002.

WANG, J. et al. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. **Bioresources and Bioprocessing**, Estados Unidos, n. 2, v. 1, p. 1-9, fev. 2015.

WATERMAN, P. G.; HUSSAIN, R. A. Systematic significance of xanthenes, benzophenones and biflavonoids in *Garcinia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Reino Unido, v. 11, n.1, p. 21-28, mar. 1983.

XIAO, Y. et al. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. **Physiologia Plantarum**, Reino Unido, v. 137, n. 1, p. 1-9, jun. 2009.

ZAHEER , M.; REDDY, V. D.; GIRI, C. C. Enhanced daidzin production from jasmonic and acetyl salicylic acid elicited hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. (Fabaceae). **Natural Product Research**, Reino Unido, v. 30, n. 13, p.1542-1546, jul. 2015.

ZHANG, W. et al. Integration of jasmonic acid and UV-B irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. **Plant Science**, Irlanda, v. 162, p. 459-468, mar. 2002.

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