

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INDUÇÃO E DETECÇÃO DE AZADIRACTINA EM CALOS
DE Azadirachta indica Adr. Juss. (NIM)**

**Fábio Eduardo Scalize
Engenheiro Agrônomo**

**Jaboticabal - São Paulo - Brasil
2003**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INDUÇÃO E DETECÇÃO DE AZADIRACTINA EM CALOS
DE Azadirachta indica Adr. Juss. (NIM)**

Fábio Eduardo Scalize

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira Damião Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA - Área de Concentração Genética e Melhoramento de Plantas.

Jaboticabal - São Paulo
Janeiro – 2003

S282i Scalize, Fábio Eduardo
Indução e detecção de azadiractina em calos de Azadirachta indica Adr. Juss. (Nim)/ Fábio Eduardo Scalize. – – Jaboticabal, 2003
ix, 24 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003
Orientador: Carlos Ferreira Damiao Filho
Banca examinadora: Fabiola Vitti Moro, Hosana Maria Deboni
Navickiene
Bibliografia

1. Calo. 2. Cromatografia. 3. Nim. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 575:633.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

À Dionízia, minha mae,

Dedico

Aos meus familiares e amigos,

Ofereço

Meu afilhado, Vinícius,

Homenageio

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo dom da Vida.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, pelo apoio e incentivo.

Ao Professor Dr. Carlos Ferreira Damião Filho, pela orientação, paciência nas horas de dificuldades amizade.

A Professora Dra. Fabíola Vitti Môro e Dra. Hosana Maria Deboni Navickiene, pela valiosa contribuição nas correções sugeridas.

As técnicas de laboratório Roseli Conceição e Helia, pela grandiosa ajuda na condução dos experimentos realizados e pela amizade que desta convivência diária nos proporcionou.

Ao departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, pela concessão da utilização dos laboratórios.

Ao Instituto de Química de Araraquara, em especial à Profa. Dra. Maysa Furlan que possibilitou a realização das análises via CLAE, nos laboratórios de Química Orgânica.

Ao Programa CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos colegas Érica, Adriana, Guilherme, Inez, Núbia e Rodrigo, pela amizade e companheirismo.

SUMARIO

	pagina
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Coleta Do Material Vegetal	8
3.2. Obtenção dos explantes	8
3.3. Preparo dos meios de cultura	9
3.4. Quantificação de AZA	10
3.5. Preparo dos extratos	11
3.5.1. Extrato de folhas	11
3.5.2. Extrato de calos	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Cultura de tecidos	16
4.2. CLAE	20
5. CONCLUSÕES	22
6. REFERÊNCIAS	23

INDUÇÃO E DETECÇÃO DE AZADIRACTINA EM CALOS DE Azadirachta indica Adr. Juss (NIM)

RESUMO: A preocupação com o ambiente, bem como a busca por um produto natural de amplo uso na agricultura, encontramos a azadiractina, uma substância encontrada em extratos de nim (*Azadirachta indica*), planta indiana que demonstra ser uma alternativa para o controle de insetos praga. Característica que motivaram o presente trabalho, objetivando a obtenção e detecção desta substância em calos de nim (*Azadirachta indica*). Os calos foram obtidos a partir de explantes de peciólulos desta espécie, os quais foram cultivados *in vitro* em meio de Murashige & Skoog, suplementado com diferentes quantidades e tipos de reguladores de crescimento. Os calos foram triturados e submetidos a extrações com solventes orgânicos, concentrados e analisados via CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Dos experimentos realizados, melhores resultados quanto a produção e acúmulo de azadiractina, foram obtidos em extratos de calos cultivados em meio básico contendo 2,0 mg.L⁻¹ de AIA em associação com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, após 12 meses de cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*, azadiractina, calos, cromatografia, nim

AZADIRACHTIN DETECTION FROM CALLI NEEM (Azadirachta indica Adr. Juss.)

ABSTRACT: The concern with the environment, as well as the search of a natural product, the azadirachtin (AZA), widely used in agriculture, motivated the present work aiming this substance detection in neem (*Azadirachta indica*) calli. The calli, obtained by means of leaflets petiolules, was cultivated on Murashige & Skoog (1962) media, supplemented with different amounts and kind of growth regulators. The obtained powdered calli was submitted to organic extraction, and after that was analyzed through High Performance Liquid Chromatography (HPLC). From the experimental treatments, the better results, as the AZA production and accumulation, were obtained in calli extracts cultivated in basic Murashige & Skoog (1962) media containing 2,0 mg.L⁻¹ of AIA in association with 1,0 mg.L⁻¹ of BAP, after 12 months of *in vitro* cultivation.

Keywords: *Azadirachta indica*, azadirachtin, AZA, calli, chromatography neem

1. INTRODUÇÃO

A espécie arbórea *Azadirachta indica* Adr. Juss., cujo nome popular é nim, um dos representantes da família Meliaceae, que compreende espécies como o mogno, cedro, cinamomo, andiroba, entre outras. Esta espécie destaca-se por possuir substâncias que atuam como inseticida, fungicida, bactericida e nematicida (MARTINEZ, 1998). Sua classificação botânica consiste em Reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Rutales, família Meliaceae, gênero *Melia*, espécie *Azadirachta indica* Adr. Juss..

Historicamente o nim é utilizado há mais de 2000 anos na Índia para controle de insetos pragas, nematóides, fungos, bactérias, medicamentos caseiros para o homem e animais. Sua utilização em seres humanos é indicada para o controle de tosse, febre, perda do apetite, anti-helmintico, dentre outras.

Em sua constituição química, detectou-se uma grande quantidade de substâncias químicas, em especial os limonóides e terpenóides, estes últimos totalizando mais de cem compostos, oriundos de diversas partes da planta. Dos componentes químicos presentes nesta planta, com atividade biológica, o mais ativo é a azadirachtina, que por possuir semelhança com o hormônio da ecdise, atua alterando essa transformação, sendo que administrado em altas concentrações pode impedi-la, causando a morte do inseto (MARTINEZ, 1998).

Esta espécie, *A. indica*, foi reconhecida como um recurso renovável de inseticida, nematicida, e fertilizante, sendo que constitui-se de produtos biodegradáveis, não-tóxicos aos animais e seres humanos e de efeito comprovado.

Trabalhos realizados demonstram que extratos de nim podem influenciar mais de 200 espécies de insetos. Produtos de nim agem intervindo em várias fases da vida dos insetos, podendo não matar a praga instantaneamente, mas sim restringindo suas populações através dos efeitos de repelência, inibição alimentar e de postura, perturbação do acasalamento e esterilização, interferência na síntese da ecdisona, inibição da biosíntese da quitina, inibição do crescimento,

mortalidade de jovens e adultos, mortalidade de ovos, deformação de pupas e adultos, redução da fecundidade e longevidade, dentre outros. A ação dos produtos obtidos a partir de plantas de nim, cumprem todas as prioridades relacionadas ao meio ambiente, mantendo-o em equilíbrio sem deixar resíduos que possam ser tóxicos ao ambiente (STONE, 1992 e CUNHA, 2002).

Dentre as características do nim, há registros de que suas sementes contém substâncias bioativas que podem ajudar em estratégias de administração de pragas sem prejuízos ao ambiente, tal fato se reflete em seu grande emprego na Índia, sendo utilizado em lavouras de algodão, café, chá, arroz, especiarias e hortaliças. Outro emprego muito utilizado também, seria a administração de torta de sementes, oriundas de resíduos da extração de óleos, em áreas de cultivo, funcionando como fertilizante. Além de aumentar a fertilidade do solo, confere também proteção às raízes das plantas contra nematóides e formigas. Constitui-se em um excelente redutor do número de insetos de terra, fungos e bactérias. Também é utilizado em culturas como a cana-de-açúcar, banana, pimenta negra, árvores cítricas, jasmim, rosas e leguminosas (FUNDAÇÃO NIM, 2000).

Como controlador da erosão da terra, salinização, purificador de ar natural, exalando oxigênio, mantendo o nível do mesmo na atmosfera equilibrado, também possui a habilidade de recuperar solos degradados.

Curiosamente, na Índia, a sombra das árvores de nim não só resfriam o ambiente como também previnem doenças. Durante os meses quentes de verão, a temperatura debaixo de uma árvore de nim é aproximadamente 10°C menor que a temperatura circunvizinha(FUNDAÇÃO NIM, 2000).

De acordo com HARBONE & BAXTER (1993) citado por PLETSCHE (1997), dentre os produtos naturais vegetais, destacam-se centenas de princípios ativos, sendo o número de compostos com atividade biológica bem caracterizada, totalizando 2793.

Vários são os mecanismos para a produção de compostos biologicamente ativos, destacando-se dentre eles a micropropagação, através de seleção de clones altamente produtores e sua propagação *in vitro*. A micropropagação

oferece muitas vantagens para a prática agrícola, como a maior rapidez na obtenção de um grande número de mudas ou material vegetal, e a erradicação das pragas e doenças da cultura, principais responsáveis pela baixa produtividade da planta (PLETSCH, 1997).

A clonagem *in vitro* é particularmente útil para a conservação de espécies ameaçadas, e a propagação de espécies recalcitrantes ou de ciclo de vida longo. Também pode ser aplicada às espécies vegetais produtoras de princípios ativos úteis e ser explorada economicamente, da mesma forma que a micropropagação de espécies leguminosas, frutíferas, florestais e ornamentais (KERBAUY, 1997).

Dentre os métodos para detecção de substâncias em plantas, o CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), destaca-se dentre os mais utilizados e mais eficaz. Esta técnica permite a identificação de pequenas quantidades da substância a ser analisada e sua quantificação, com alto grau de confiabilidade e reprodutibilidade (THEJAVATHI *et al.*, 1995).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Uma gama enorme de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, tais como produtos do metabolismo primário e secundário, tem demonstrado interessantes atividades biológicas, como por exemplo ação analgésica, anti-inflamatória, anti-microbiana, fungicida, inseticida, etc. Estes compostos podem e estão sendo utilizados na indústria farmacêutica, de cosméticos, de alimentos, etc, PLETSCH (1997).

De acordo com a FUNDAÇÃO NIM (2000), e CUNHA (2002), a *A. indica* possui inúmeros usos, quer sejam eles de ordem agrícola, ambiental ou medicinal. Os inseticidas naturais utilizados na agricultura, obtidos a partir de extratos de folhas, sementes, ramos, se constituem no maior emprego de tal planta, que através de sua alta eficiência no controle de diversas pragas agrícolas e pragas de saúde pública, tais como pulgões, lagartas, barbeiro, mosquito transmissor da Dengue o *Aedes aegypti*, etc.

Devido ao seu nulo efeito residual, assim como o de não apresentar riscos de intoxicação a seus aplicadores, o nim tem se destacado como fertilizante orgânico, aumentando a fertilidade de solos degradados, recuperando-os, bem como o incremento de nutrientes juntamente a fertilizantes comerciais; como fonte de substâncias empregadas na indústria farmacêutica, uma vez que seus efeitos já são conhecidos e utilizados em medicina popular e alternativa em povos de sua região de origem, a Ásia.

Segundo MARTINEZ (1998), uma árvore de nim possui mais de 50 compostos terpenóides, tendo a maioria ação sobre insetos. Tais compostos se encontram distribuídos por todas as partes do vegetal, sendo nos frutos encontradas as maiores concentrações. Estes compostos são solúveis em água, podendo ser preparados de maneira simples e baixo custo pelos pequenos agricultores.

A clonagem *in vitro* de plantas, conhecida por micropropagação, utiliza-se de pequenas porções de tecidos, originados de diferentes partes do vegetal, quer

sejam a partir de tecidos maduros (folhas, caules, etc.), quanto de tecidos meristemáticos, constituídos por células em processo de divisão, localizadas, geralmente, nos ápices de caules e raízes em crescimento. Tal técnica supre a necessidade de colocação rápida no mercado de plantas de ciclo de vida longo, geralmente arbóreas, e arbustivas KERBAUY (1997).

ZYPMAN *et al.* (1997), realizaram experimentos empregando métodos de cultura de tecidos em nim, para a produção de bioinseticida. Constataram, através da utilização de explantes de hipocótilos, a formação de calos e caules, quando cultivados em meio MS, acrescido com AIA, e BA. Bioensaios realizados para avaliar a eficácia de extratos de folhas, calos e suspensão de células obtidas *in vitro*, demonstraram que todos os extratos foram eficazes no controle de *Schiotocerca gregaria*, indicando que o emprego de tal técnica para a produção de extratos de nim é possível.

SUREERAT (1991), cultivou embriões, segmentos nodais e brotos axilares de *A. indica*, em meio MS, acrescido de cinco diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 5,0; 10 e 50 μ M), durante 45 dias. A formação de numerosos brotos em tecido cotiledonar foi de 16,3% a 72,9%, quando os embriões foram cultivados em 10 e 50 μ M de BAP, respectivamente.

SCHAAF *et al.* (2000), realizaram uma análise rápida e sensível através da CLAE e espectrometria de massas. Concluíram que a azadirachtina pode ser isolada de todas as partes da árvore de nim, sendo que a maior concentração se encontra nas sementes maduras, sendo também muito encontrada em cultura de células, ou seja calos. Relatam também que o nim possui duas propriedades favoráveis, sua baixa toxicidade (baixa persistência na natureza) e ação sistêmica.

Cultivos de cotilédones, folhas e segmentos de caule em meio MS, complementado com vários hormônios de crescimento em diferentes concentrações, apontaram para os cotilédones frescos como a maior fonte de obtenção de calos de nim, nas combinações de 2,4-D e AIA, RAO *et al.* (1988).

Discos foliares de *A. indica*, cultivadas em meio MS, complementados com Kn e BAP, produziram de 10 a 12 brotos adventícios, num período de quatro

semanas. A adição de sulfato de adenina aumentou este número para 18 a 20 brotos. Estudos histológicos apontaram para as células epidérmicas como as que originaram tais brotações. Os brotos obtidos foram isolados e inoculados em meio acrescido com ácido giberélico (GA3), induzindo broto saudável. Estes, quando colocados em meio contendo 6µM de AIA, iniciaram a formação de raízes dentro de duas semanas de subcultivo.

Segundo RAMESH & PADHYA (1990), tal procedimento permitiu a obtenção de 12-15 plantas de nim em seis meses, oriundas de um único disco foliar de uma árvore madura de nim.

O início da formação de calos friáveis e brotos obtidos de explantes de hipocótilo de *A. indica*, ocorreu em meio MS complementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIA, e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, regenerando-se brotos dos nós e calos. Em cerca de 60% dos brotos houve desenvolvimento de raízes, quando transferidos em meio sem BAP. Foram testados diferentes meios para broto e subcultivo de calo, sendo que, após 03 (três) meses de incubação no mesmo meio, foi observado a ocorrência de embriogênese somática nas culturas de calos. Em bioensaios com *Schistocerca gregaria*, os extratos de explantes da cultura apresentaram propriedades de repelência (ZIPMAN *et al.*, 1997).

WEWETZER (1998), constatou que o conteúdo de azadirachtina em sementes de nim é afetado por fatores ambientais e genéticos. Estudando o cultivo *in vitro* de *A. indica*, foi observado que os calos obtidos se mostravam com diferentes quantidades de azadirachtina quando os nutrientes contidos nos meios de cultura eram variáveis, bem como as concentrações de carboidratos. Sendo assim as quantidades de azadirachtina de culturas de calos eram variáveis e dependentes da fonte de carboidratos e dos nutrientes que estavam presentes no meio utilizado. Os quantidades de azadirachtina dos calos foram analisados por CCDC (cromatografia em camada delgada comparativa) e CLAE.

A produção de metabólitos secundários é consequência de processos bioquímicos altamente regulados e inter-relacionados, ou seja, é resultado da integração dos processos de biossíntese, degradação, transporte e acumulação

do produto. Para isso é preciso que os tecidos que o produzem contenham os precursores metabólicos necessários, as enzimas adequadas para convertê-los no produto e as estruturas onde o mesmo ficará armazenado. A ausência de estruturas de acumulação nos calos, ou seja, os pêlos glandulares, seria outra razão para a não acumulação destes monoterpenóides, PLETSCHE (1997) e ZOUNOS (1999).

ALLAN *et al.* (1994), em ensaio para a produção de azadirachtina através de cultivo *in vitro* de discos foliares de *A. indica*, em meio MS complementado com 30g.L⁻¹ de sacarose, pH ajustado a 5,8, semi-solidificado com 1,75 g.L⁻¹ 'Phytigel' (Sigma, U.K.), e suplementado com 4,0 mg.L⁻¹ de AIB e 1,0mg.L⁻¹ de BAP, obtiveram calos, sendo após um ano de subcultivos levados a análise para quantificar a azadirachtina presente. Os procedimentos foram os de partição com solvente e coluna cromatográfica, identificados por CCDC e CLAE.

Testes de eficácia com insetos, verificaram-se 100% de mortalidade das larvas, com concentrações abaixo de 0,4 mg.L⁻¹, sendo o rendimento de azadirachtina de 0,0007%, baseado no peso seco de calos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, SP, e junto ao laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química – UNESP, campus de Araraquara.

3.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal utilizado foi obtido à partir de plantas existentes na própria Faculdade de Jaboticabal – UNESP, em área anexa ao ripado de fruticultura. As plantas apresentavam-se em boas condições ecofisiológicas.

Das matrizes selecionadas procedeu-se a coleta, com tesoura de poda, de folhas inteiras de aproximadamente 30 centímetros cada. Em laboratório, as folhas foram previamente limpas com água e detergente, para eliminação de poeira e resíduos de seiva. Logo após as folhas foram expostas à solução de hipoclorito de sódio a 20% por um período de duas horas sem agitação e em repouso a fim de uma desinfecção superficial.

3.2. Obtenção dos explantes

Após a pré-limpeza, as folhas foram desinfetadas com solução de álcool a 70% (v/v), e postas sobre bancada previamente higienizada, também com álcool a 70% (v/v). De cada folha foram retirados de dois a quatro quadrados de 1,0 cm de lado, totalizando 1,0 cm² de área. Utilizou-se também os peciólulos, uma vez que esta espécie possui folhas compostas. Este procedimento foi realizado sobre placas de vidro autoclavados e os cortes feitos com bisturi estéril, sendo colocados em água estéril até a desinfecção superficial. Em seguida, foram submetidos a esterilização superficial com solução de álcool a 70% (v/v), por 1 minuto, seguindo-se a enxágües com água destilada. Após, imersos em solução de Q-BOA, alvejante comercial, a 20% (v/v) juntamente com uma gota de TWEEN

20, durante 20 minutos em agitação intermitente, sendo em seguida lavados com água destilada e estéril, sob condição de câmara asséptica, e inoculados em tubos de cultivo, contendo os meios experimentais descritos posteriormente.

O ensaio foi conduzido em delineamento estatístico inteiramente casualizado, executado sob as mesmas condições de ambiente. O projeto de pesquisa constou de duas fases, primeiramente testaram-se dez tratamentos, sendo que os quais apresentaram melhores resultados em termos de produção de calo, foram repetidos para a segunda fase. O número de repetições de cada tratamento foi igual a 25, totalizando 250 tubos de cultura. Numa segunda fase, cada um dos melhores tratamentos, constituiu de 50 tubos de cultura, totalizando 150 tubos.

3.3. Preparo do Meio de cultura

O meio básico utilizado foi o MS, suplementado com 20g.L^{-1} de sacarose, semi-solidificado com 0,6% de ágar bacteriológico e com pH 5,8 antes da autoclavagem.

Os tratamentos para indução de calos consistiram do meio MS básico acrescido de ANA, ANA+AIA, e AIA+BAP. As concentrações seguem no quadro abaixo.

ANA (mg.L^{-1})	ANA+AIA (mg.L^{-1})	AIA+BAP (mg.L^{-1})	TESTEMUNHA
1,0 T₁	1,0+0,5 T₄	0,5+1,0 T₇	M&S T₁₀
2,0 T₂	2,0+0,5 T₅	1,0+2,0 T₈	
4,0 T₃	4,0+0,5 T₆	2,0+1,0 T₉	

Dos tratamentos, um foi representado pela testemunha, sem o uso de fitorreguladores, constituindo-se somente do meio básico MS. Nesta fase foi analisado o número e volume dos calos formados, ao final de três meses de cultivo.

A partir do primeiro mês após a inoculação dos discos foliares e peciólulos, foram feitas avaliações visuais, para a verificação de formação de calos. Ocorrida a formação, estes foram avaliados tomando-se nota de sua coloração apresentada, tamanho atingido, emissão ou não de primórdios radiculares, e foliares.

3.4. Quantificação de Azadirachtina

A quantificação de azadirachtina foi dividida em quatro etapas: a primeira aos três meses de cultivo, a segunda aos seis meses, a terceira aos nove meses, e por último aos doze meses de cultivo, cujos resultados dos valores acumulados do composto foram comparados entre si.

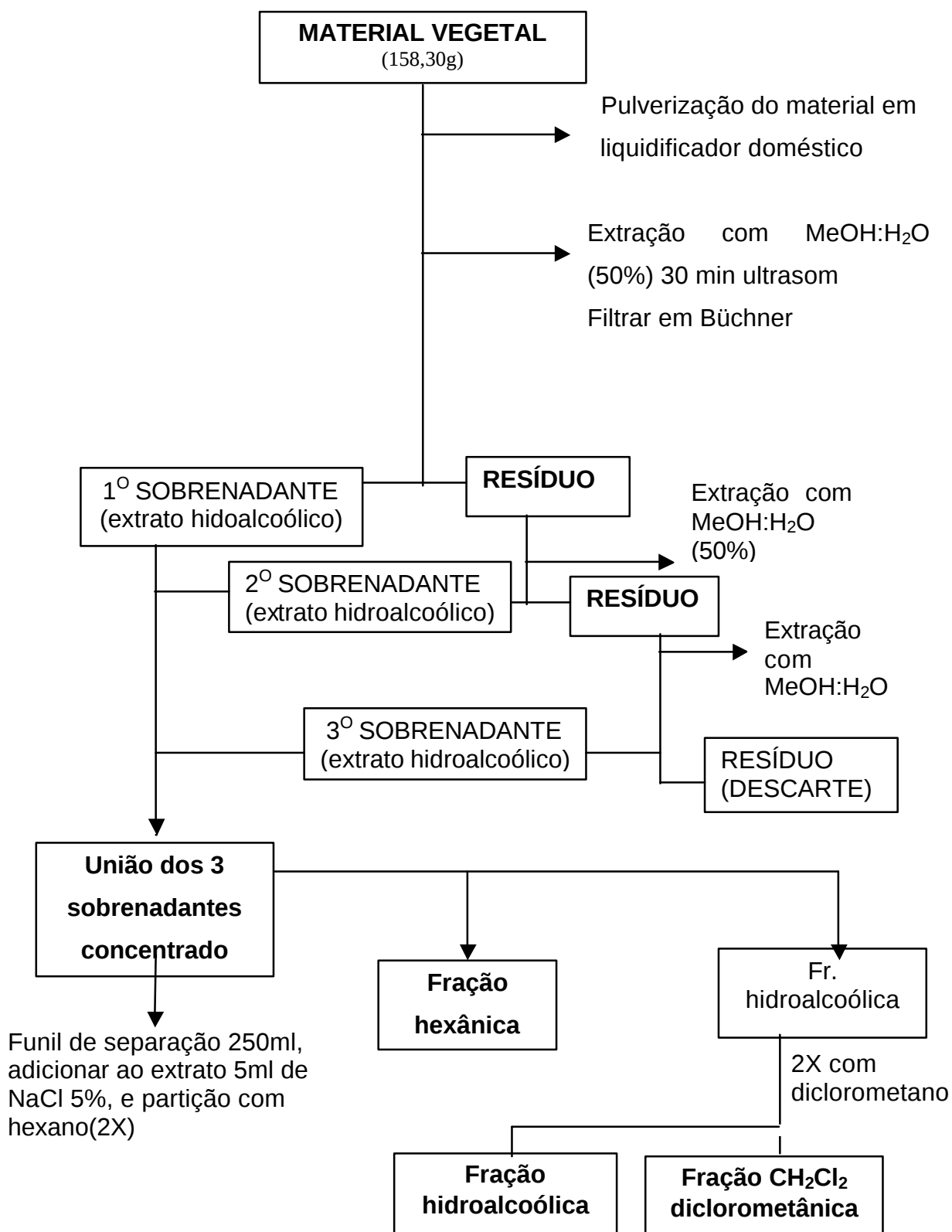
Para a quantificação de azadirachtina, foram feitas análises via CLAE de padrão comercial (Azadirachtina 95%, Sigma, lote 12k1230, A-7430) puro e de mais cinco diluições, servindo tais resultados para a construção de uma curva analítica. As extrações foram realizadas de lotes compreendidos de vinte calos de cada tratamento, com número de repetições igual a três.

A análise via CLAE foi efetuada em coluna cromatográfica SUPELCOSIL C-18, 15cm x 4,6cm, 5mm de diâmetro, bomba SHIMADZU LC 10AD, detector com arranjo de diodos SPD-M10A, módulo de comunicação SHIMADZU CBM-10A. Os solventes utilizados foram grau HPLC, MALICKRODT.

3.5. Preparo dos extratos

3.5.1. Extrato de folhas e peciólulo

As folhas secas a temperatura ambiente (158,30g) foram pulverizadas com ajuda de um aparelho liqüidificador de uso doméstico. O pó resultante foi submetido à maceração em ultrasom com metanol:água (1:1) num volume total de 600mL. Após decorrido este tempo filtrou-se em funil de Büchner sob vácuo, tendo sido o filtrado reservado. Realizou-se três vezes esse procedimento, e ao término os três resíduos foram unidos e acrescido de 5mL de NaCl (cloreto de sódio a 5%), mais 250 mL de hexano. Essa mistura foi agitada em funil de separação e separada por densidade, fornecendo uma fração hexânica e uma metanol:água (hidroalcoólica). A esta última novamente foi acrescentado 250mL de hexano, novamente agitado e separado. As duas alíquotas da fração hexânica foram unidas e reservadas. À fração hidroalcoólica adicionou-se diclorometano (200mL) e esta mistura foi submetida à agitação e separação com 03 repetições. Ao final do procedimento foram obtidos os extratos, a hidroalcoólico, o hexânico e o diclorometânico, todos concentrados em evaporador rotatório Büchi. Os extratos foram então acondicionados em vidros de menor volume e secos em capela de sucção, até a total evaporação dos solventes utilizados.

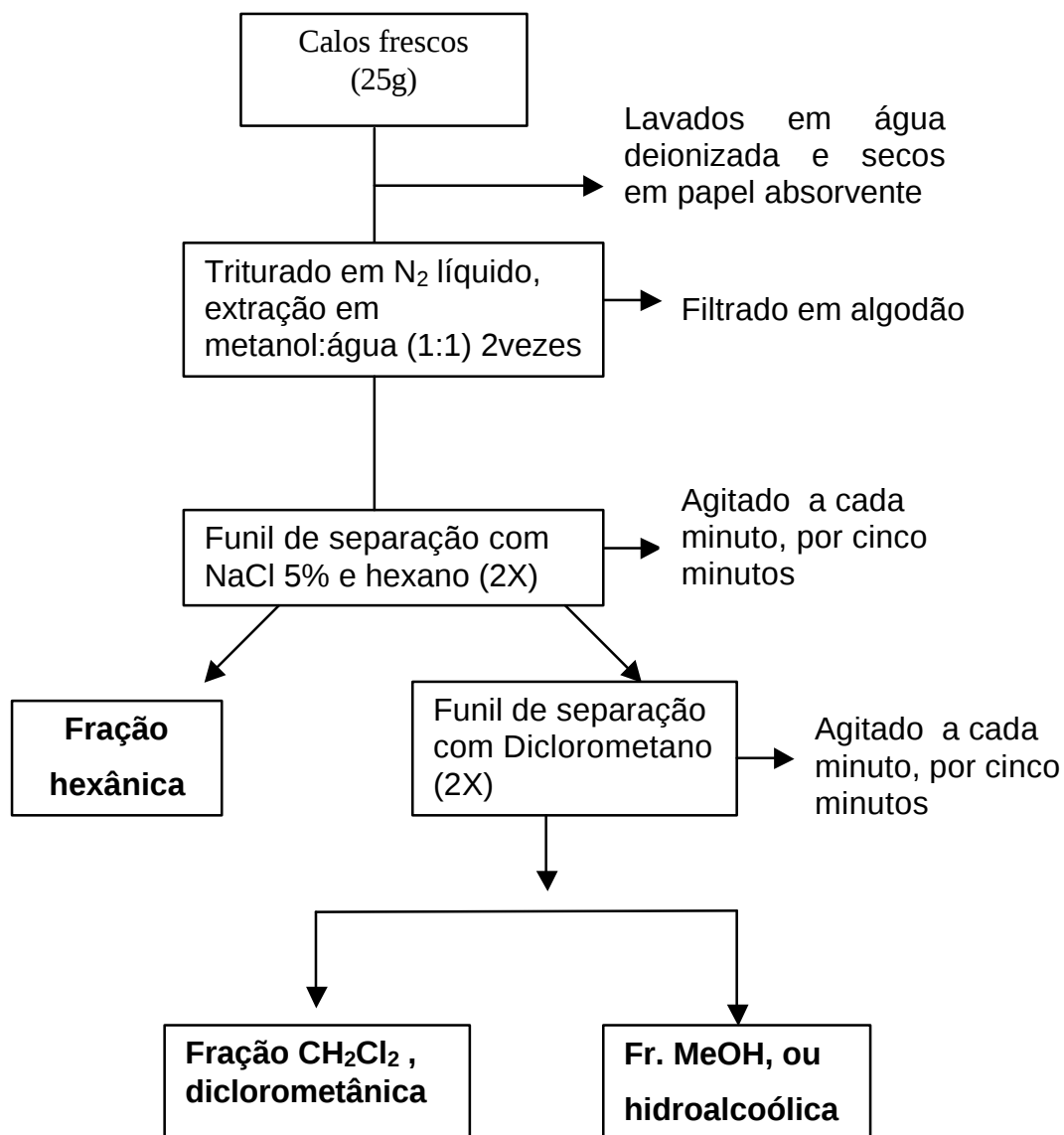
Esquema 1. **PREPARAÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS**

3.5.2. Extrato dos calos

Os calos foram retirados dos tubos de cultivo, secos em papel absorvente, lavados em água deionizada sob ultrasom por 10 minutos, filtrados sob vácuo até total eliminação de água, sendo a massa fresca utilizada de 25g. Após, os mesmos foram colocados em almofariz e triturados com auxílio de nitrogênio líquido, objetivando uma maior pulverização da amostra. O material obtido foi então solubilizado em 150 mL de metanol:água (1:1), dividido em três porções, transferidos para erlen meyer e então submetidos à ultrasom por 10 minutos. Após, foram filtrados em algodão para a remoção de partículas sólidas, tal procedimento foi repetido mais uma vez para uma maior remoção das substâncias contidas nos calos obtidos.

Ao extrato obtido foi acrescentado uma alíquota de 5 mL de NaCl 5%, 100mL de hexano, colocado em funil de separação, agitado a cada minuto, por cinco minutos. A fração hexânica foi retirada e novamente à fração hidroalcoólica foi acrescentado outra alíquota de 100mL de hexano, agitada a cada minuto e separada após cinco minutos, sendo coletada juntamente à primeira. À fração hidroalcoólica acrescentou-se uma alíquota de 100mL de diclorometano, agitou-se a cada minuto por cinco minutos e coletou-se a fração diclorometânica, novamente juntou-se outra alíquota de 100mL de diclorometano e após cinco minutos coletou-se a fração diclorometânica à outra.

Ao final destas etapas três frações foram obtidas, a hexânica (hexano), a hidroalcoólica (metanol:água), e a diclorometânica (diclorometano). Todas foram submetidas a concentração em evaporador rotatório Büchi, sendo finalizado o processo com evaporação expontânea em capela de sucção. As amostras foram colocadas em frascos limpos de penicilina e identificadas com etiquetas. Este procedimento foi repetido para todos os tratamentos testados, nos quatro períodos propostos inicialmente.

Esquema 2. **PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DOS CALOS**

3.6. Determinação e quantificação da azadirachtina nos calos

Os extratos foram analisados via CLAE para a verificação da presença da azadirachtina ou não nos calos formados, bem como a sua quantificação.

O sistema de solvente utilizado na eluição foi o acetonitrila:água, num fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, foram monitoradas a 203 e 215nm por 45 minutos. Os cromatogramas obtidos dos extratos foram comparados com o cromatograma obtido do padrão comercial Azadirachtina 95%, Sigma, lote 12k1230, A-7430.

O tempo de retenção determinado nestas condições cromatográficas para a azadirachtina foi de 7,4 minutos.

Tabela 2. Gradiente do sistema de solvente utilizado em CLAE

Tempo (min)	Acetonitrila (%v/v)
0	30
25	100
30	100
35	30
40	30
40.01	0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CULTURA DE TECIDOS

Desta primeira etapa do trabalho, que consistiu na obtenção de uma condição para a produção de calos em laboratório de cultura de tecidos vegetais, verificamos que discos foliares utilizados como explantes possuem alta taxa de contaminantes, inviabilizando o seu emprego à obtenção de calos. Os discos foliares de 1,0 cm² apresentaram quase 100% de contaminação, e não se desenvolveram, conforme pode ser observado nas Figuras 1 e 2.

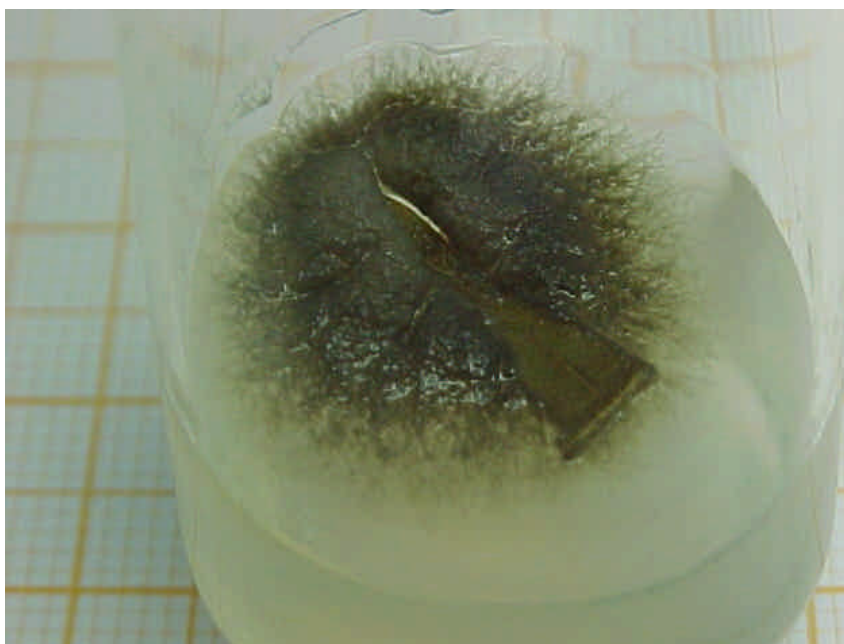


FIGURA 1. Fotografia representativa de um explante obtido de discos foliares, evidenciando sua contaminação.

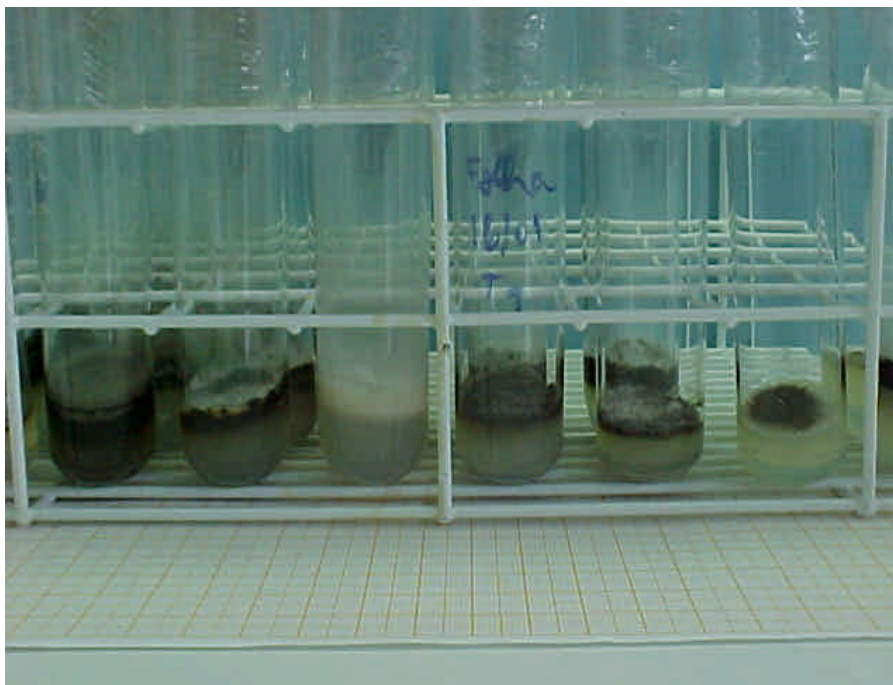


FIGURA 2. Tubos de cultura, nos quais observa-se a contaminação total dos explantes oriundos de discos foliares.

Na busca de outras alternativas para o cultivo *in vitro*, por várias vezes repetiu-se o experimento inicial, tomando-se enorme cautela em relação a assepsia, desde o corte do material a campo até a câmara de fluxo laminar. A utilização de outro tipo de explante, o peciólulo, foi a única alternativa para a obtenção dos calos.

Dentre os dez tratamentos experimentais inicialmente realizados, apenas dois levaram a formação de calos, AIA+BAP (1,0+2,0 mg.L⁻¹) e AIA+BAP (2,0+1,0 mg.L⁻¹), fato esse que contrariou nossa idéia original de selecionar os tratamentos melhores para a formação de calos. A partir da segunda semana de cultivo os explantes começaram a formar calos, inicialmente em pequena escala, e na região onde foi feita a cisão.

A massa calosa apresentou-se de coloração clara e esverdeada, de consistência friável inicialmente, tornando-se mais coesa em estágio mais avançado. Não houve formação de primórdios radiculares, nem tão pouco emissão de parte aérea, folhas e caule, evidenciado na figura 3.

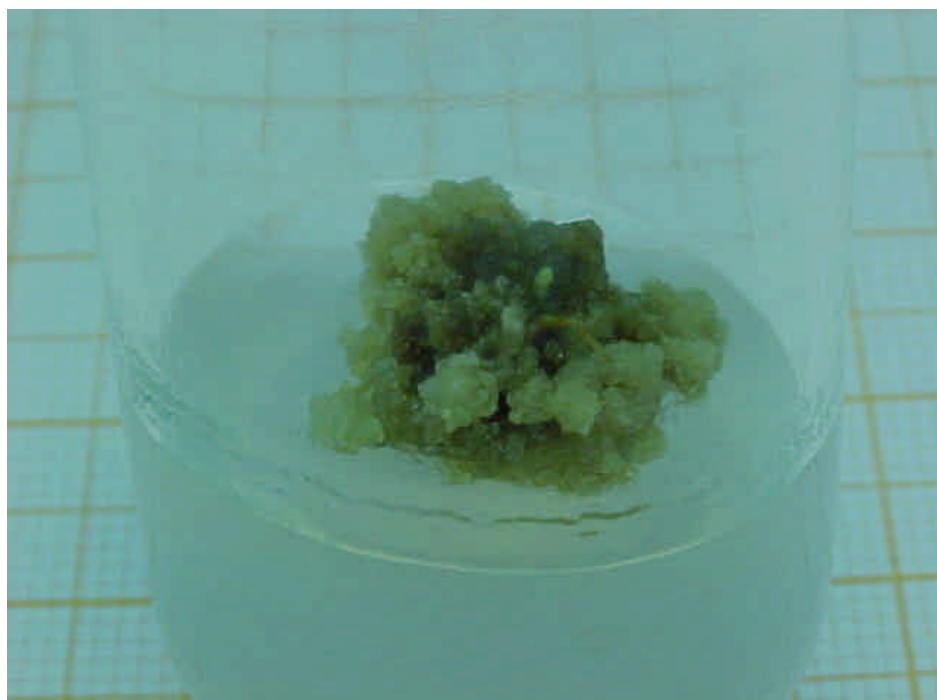


FIGURA 3. Calo, representativo do lote obtido, que evidencia a ausência de primórdios radiculares e brotações.

Devido a pouca quantidade obtida numa primeira etapa, os calos formados foram repicados a cada 30-45 dias, com o intuito de aumentar a quantidade de material, para a realização da segunda etapa do trabalho, que foi as análises via CLAE.

De acordo com a literatura consultada, a *Azadirachta indica* possui muitas substâncias com amplo emprego, quer seja ele no campo agrário, como em uso na medicina popular de seu país de origem.

Dentre as maneiras para obtenção da azadirachtina, a micropropagação se destaca dentre as mais eficazes, constituindo-se num método mais simples, de maior volume de produção, e com necessidade de espaço reduzido. Através da formação de calos, a partir de pequenas porções da planta, conforme foi utilizado no presente experimento, o peciólulo, que constitui-se numa porção vegetal de tamanho muito reduzido, e encontrado em grande quantidade nas plantas de nim, o qual apresenta resposta morfogênica bastante interessante.

De acordo com os resultados obtidos temos que, os melhores meios foram aqueles em que se empregou AIA e BAP, nas duas concentrações experimentais adotadas, que foram 2,0 + 1,0, e 1,0 + 2,0 mg.L⁻¹, respectivamente.

Conforme descrito na literatura por alguns autores, ALLAN *et al.* (1994) e SCHAAF *et al.* (2000), os quais utilizaram AIB juntamente a BAP, tais reguladores conferiram à explantes de folhas e plântulas, respectivamente, a formação de calos. Os subcultivos foram realizados a cada seis semanas. Comparativamente ao desenvolvido no presente trabalho, utilizou-se ácido indolacético, como auxina, ao invés de ácido indolbutírico, e benzilaminopurina como citocinina. A combinação de ambas conferiu uma condição ótima para a formação de calos, tendo como ponto de partida explantes oriundos do peciólulo, uma vez que os discos foliares primeiramente utilizados, resultaram em quase 100% de contaminação, não sendo possível a continuidade da pesquisa por este caminho.

4.2. CLAE (cromatografia de alta eficiência)

As extrações dos calos obtidos via cultura de tecidos com solventes orgânicos, foram realizadas no laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara, sob a orientação da Prof. Dra Maysa Furlan, de onde nos períodos pré-estabelecidos foram retiradas amostras e procedido sua preparação. Na literatura os autores são quase unânimes na metodologia, que consistiu na pulverização em N₂ líquido, seguido de extração em solvente orgânico, sendo após submetido a partições em diferentes solventes, no caso metanol, hexano e diclorometano.

ALLAN *et al.* (1994) realizaram uma quantificação em sistema isocrático, com fluxo de 1mL.min^{-1} , e fase móvel de acetonitrila:água (40-60), e a coluna utilizada foi a Spherisorb ODS 250mm x 4,6mm. Já SCHAAF *et al.* (2000), utilizaram uma coluna Supelcosil LC-18 RP-HPLC de 100mm x 4,6mm, com gradiente acetonitrila:água, com fluxo de $0,5\text{ mL.min}^{-1}$. Tais experimentos demonstram as várias metodologias descritas na literatura utilizadas para determinação de azadirachtina presente em extratos de cultura de tecidos da planta de nim. Entretanto, os tempos de retenção também variam de acordo com a metodologia. Encontramos em SCHAAF *et al.* (2000), o tempo compreendido entre 15 a 18 minutos, sendo que em ALLAN *et al.* (1994), o tempo de retenção é cerca de 15 minutos. Comparativamente ao trabalho por nós realizado, obtivemos um ganho de tempo significativo, sendo reduzido à metade, ou seja, 7,4 minutos (Figura 4).

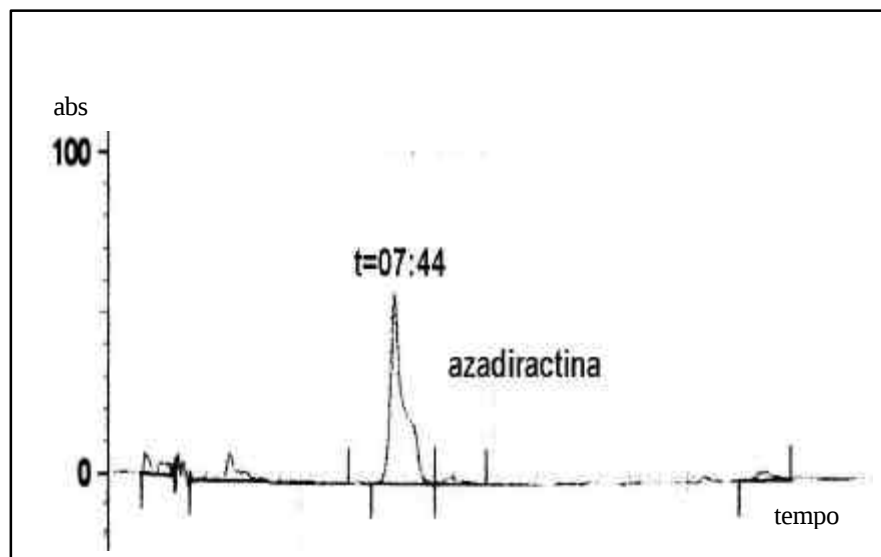


FIGURA 4. Cromatograma obtido via CLAE, de extrato do padrão comercial.

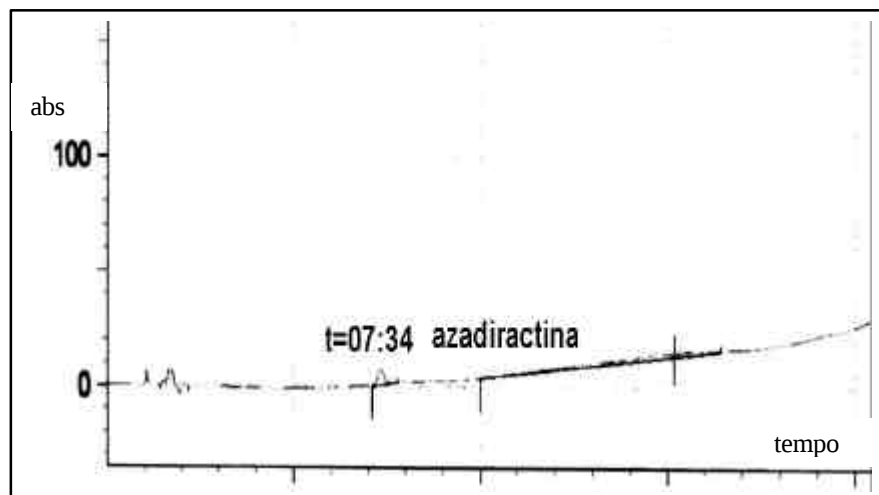


FIGURA 5. Cromatograma obtido via CLAE, de extrato de calos de nim, cultivados no meio de cultura T₀, aos 12 meses de cultivo.

Conforme observado na Figura 5, verifica-se que, aos 12 meses de cultivo, os calos produziram e acumularam pequena mas significativa quantidade de azadirachtina. Não foi possível detectar-se, com procedimentos idênticos, o acúmulo de azadirachtina em calos com menor tempo de cultivo do que o indicado. SCHAAF *et al.* (2000) também constataram a presença de azadirachtina em calos de nim, informando que extrato de calos continham 0,5 µg de azadirachtina por mililitro, correspondendo a 0,5 µg.g⁻¹ de material caloso desidratado (0,00005%). Este resultado foi obtido após aproximadamente dez anos de cultivo de calos de nim, com repicagens realizadas a intervalos de 16-21 dias.

O resultado positivo para acúmulo de azadirachtina em calos, formados a partir de peciólulo, foi obtido apenas no tratamento 9 (nove), onde maior concentração de auxina (AIA) foi utilizada 2,0 mg.L⁻¹, juntamente a menor concentração de citocinina (BAP) 1,0 mg.L⁻¹. Também aqui, obtivemos os melhores resultados utilizando 50% menos reguladores de crescimento, que o descrito na literatura por Schaaf *et al.* (2000).

5. CONCLUSÕES

Através da análise de vários trabalhos, observamos que esta espécie se constitui em uma fonte muito grande de substâncias praguicidas, sendo de enorme relevância nos tempos atuais para a realização de uma produção de alimentos mais natural, fazendo com que o uso de produtos sintéticos, ora tão empregados e se constituindo em riscos à saúde humana e animal, comece a ser repensado e em certas culturas sendo substituído por produtos tidos como orgânicos. Tais produtos se constituem em menor grau de toxicidade ao homem, trazendo menor risco à saúde humana.

Neste trabalho conseguimos uma alternativa para a produção de azadirachtina, utilizando pouco tempo e espaço, através da cultura de células. Os calos formados a partir de peciólulos de folíolos de nim, após um tempo mínimo de 12 meses de cultivo *in vitro*, produzem e acumulam azadirachtina.

6. REFERÊNCIAS

- ALLAN, E.J.; EESWARA, J.P.; JOHNSON, S.; MORDUE, A.J.; MORGAN, E.D.; STUCHBURY, T. The Production of Azadirachtin by in-vitro Tissue Cultures of Neem, *Azadirachta indica*. **Pesticide Science**, 42, p.147-52, 1994.
- CUNHA, R.A.S. Nim Indiano a árvore milagrosa. **Vetores & pragas**. Ano IV, nº10, p.1-5, março 2002.
- KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas 'in vitro'. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ano I, nº1, p.30-33, maio 1997.
- MARTINEZ, S.S.; LIMA, J. de; BOIÇA Jr., A.L. Avaliação agronômica e fitoquímica de neem, *Azadirachta indica*, de diferentes procedências em vários locais das regiões Sul e Sudeste do Brasil. **XVII Congresso Brasileiro de Entomologia. Sociedade Entomológica do Brasil**, Resumos. p.831, agosto 1998.
- MORDUE, W. Characterization of Azadirachtin Binding to Sf9 nuclei *in vitro*. **Archives of insect Biochemistry and Physiology**, 46, p.78-86, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.
- NISBET, A.J.; MORDUE, A.J.; GROSSMAN, R.B.; JENNENS, L.; LEY, S.V.; PLETSCHE, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano I, nº1, p.12-15, maio 1997.
- RAMESH, K.; PADHYA, M.A. *In vitro* propagation of neem, *Azadirachta indica* (A. Juss), from leaf discs. **Indian Journal of Experimental Biology** 28: 10, p.932-935; 15 ref., 1990.
- RAO, M.V.S.; RAO, Y.V.; RAO, Y.S.; MANGA, V. Induction and growth of callus in *Azadirachta indica* Juss. **Crop-Improvement**, 15: 2, p.203-205; 4 ref., 1988.
- SCHAAF, O.; JARVIS, A.P.; ESCH, A.V.D.; GIAGNACOV, G.; OLDHAM, N.J. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 886, p. 89-97, 2000.

STONE, R. A biopesticidal tree begins to blossom. **Science**, vol.255, p. 1070-1071, fevereiro 1992.

SUNDARAM, K.M.S.; CURRY, J. High performance liquid chromatographic determination of azadirachtin in conifer and deciduous foliage, forest soils, leaf litter and stream water. **Journal of Liquid Chromatography**, nº16:15, p. 3275-90, 21 ref., 1993.

SUREERAT, K. Tissue culture of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Seedlings. Bangkok** 62 leaves, 1991.

THEJAVATHI, R.; YAKKUNDI, S.R.; RAVINDRANATH, B. Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. **Journal of Chromatography A**. 705, p.374-379, 1995.

ZOUNOS, A.K.; ALLAN, E.J.; MORDUE, A.J. Bioactive compounds from neem tissue cultures and screening against insects. **Pesticide Science**, 55: p.497-500, 1999.

ZYPMAN, S.; ZIV, M.; APPLEBAUM, S.; ALTMAN, U. Tissue Culture Methods and Cloning of the Neem tree (*Azadirachta indica*) for Bioinsecticide Production. **Acta-Horticulturae**. p. 235-236, 2pl, 3 ref., 1997.

WEWETZER, A. Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin. **Phytoparasitica** 26: 1, 47-52; 27 ref., 1998.

<http://www.neenfoundation.org>