

Universidade Estadual Paulista-UNESP
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Departamento de Química Orgânica

Aplicação da biotecnologia na obtenção de triterpenos quinonametídeos bioativos utilizando *Salacia campestris* (Cambess.) Walp. (Celastraceae) como modelo.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Araraquara, SP
2011

TIAGO ANTUNES PAZ

Aplicação da biotecnologia na obtenção de triterpenos quinonametídeos bioativos utilizando *Salacia campestris* (Cambess.) Walp. (Celastraceae) como modelo.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maysa Furlan
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria
Soares Pereira

Araraquara, SP
2011

TIAGO ANTUNES PAZ

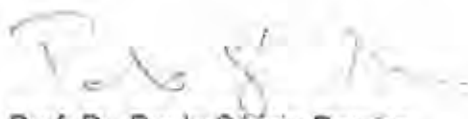
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 02 de dezembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Maysa Furlan (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Unidade de biotecnologia – UNAERP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Renato Paiva
Universidade Federal de Lavras – UFL, Lavras - MG

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Tiago Antunes Paz

Data de nascimento: 16/05/1982

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Tubarão, SC

Estado civil: solteiro

E-mail: tiagoapaz@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Pós-Graduação

Mestrado em Química em andamento – Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP (2009-2011).

Título: “Aplicação da biotecnologia na obtenção de triterpenos quinonametídeos bioativos utilizando *Salacia campestris* (Celastraceae) como modelo.”.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Graduação

Licenciatura em Química – Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC (2003-2007).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cursos

- Quality, antioxidants and technology in plants (Carga horária: 8h). Spring School "Brasil-Itália"- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Butucatu, SP (2011).
- The Importance of Microorganisms for Biotechnology (Carga horária: 8h). 7th Biota Symposium/7th Biota Program Assesment Meeting e 4th Bioprospecta Program Assesment Meeting-University of São Paulo, São carlos, SP (2011).

- RMN na metabolômica. (Carga horária: 6h). 34ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Florianópolis, SC (2011).
- RMN na metabolômica. (Carga horária: 6h). 34ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Florianópolis, SC (2011).
- Introdução à Genética da Conservação. (Carga horária: 8h). FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP (2010).
- I Curso de Biossegurança: Condutas e Riscos. (Carga horária: 16h). Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, Ribeirão Preto, SP (2010).
- Química de produtos naturais: quimiodiversidade (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, SP (2008).
- Química Atmosférica: Princípios e Fatos. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, SP (2008).
- Síntese Total de Produtos Naturais. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, SP (2008).
- Biocatálise em química orgânica. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, SP (2008).
- Tecnologia de Tintas. (Carga horária: 4h). Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC (2005).

ESTÁGIOS

- Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP. (março à julho de 2008).
- Escola Técnica de Comércio de Tubarão, Tubarão, SC. (fevereiro à julho de 2007).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

- LEAO, A. L.; DALBEN, L. C.; PAZ, T. A.; PUPO, H. F. F. Resíduos e Subprodutos da Indústria Sucroalcooleira, e sua Utilização no Processo de Compostagem em Substituição na Adubação Química. In: XV SIMPEP Simpósio de Engenharia de Produção, 2008, Bauru. Anais, 2008.
- LEAO, A. L.; OLIVEIRA, A. F.; GONCALVES, J. E. ; SOUZA, S. F.; PAZ, T. A. Caracterização de Briquetes Produzidos a partir de Carvão Vegetal e

Resíduos da Agroindústria da Mandioca. In: XV SIMPEP - Simpósio de Engenharia de Produção, 2008, Bauru. Anais, 2008.

Resumos publicados em anais de congressos

- PAZ, T. A.; INACIO, M. C.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C.; FURLAN, M. Produção de triterpenos quinonametídeos em raízes obtidas *in vitro* de *Salacia campestris* Walp. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Anais, 2011.
- INACIO, M. C.; PAZ, T. A.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; PEREIRA, A. M. S. Caracterização histoquímica e análise dos constituintes voláteis de folhas de *Cochlospermum regium* Mart. Ex. Scharank.. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Anais, 2011.
- INÁCIO, M. C.; PAZ, T. A.; ARCANJO, F.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S.; C.; PEREIRA, A. M. S. P. Innovative method for evaluating plant drug antimicrobial activity: ATVD – Antimicrobial Test for Vegetal Drug. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (BCNP), 2011, Ouro Preto. Anais, 2011.
- PINA, E. S.; PAZ, T. A.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Qualitative analysis of quinone-methide triterpenes from root bark of *Peritassa laevigata*. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (BCNP), 2011, Ouro Preto. Anais, 2011.

Participação em eventos

- 7th Biota Symposium/7th Biota Program Assesment Meeting e 4th Bioprospecta Program Assesment Meeting, 2011, USP-São carlos, SP (Simpósio).
- 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011, Florianópolis, SC. (Congresso).
- Algumas relações científicas da Química Orgânica. 2011, 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, SC. (workshop).
- IV Workshop NuBBE. 2009, UNESP-Araraquara,SP. (workshop).
- V Semana da Química da UNESP. 2008, UNESP-Bauru, SP. (Encontro).
- Semana de Tecnologia da Unisul e Fórum de Ensino de Tecnologia. 2005, UNISUL-Tubarão, SC. (Encontro).
- Semana Acadêmica de Ciências Exatas e Tecnológicas. 2003, UNISUL-Tubarão, SC. (Seminário).

Aos meus avós Iardo Mendez Paz e Maria Barreto Paz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência.

A minha noiva Mary por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, compartilhando os mesmos sonhos.

As minhas queridas orientadoras Dr.^a Maysa Furlan e Dr.^a Ana Maria Soares Pereira pela orientação, amizade e confiança que me foi dado.

A todos meus familiares, minhas irmãs Flavia e Ingrid, minha tia Rose minha avó Romilda e todos os outros que me ajudaram direta ou indiretamente. Em especial agradeço muito aos meus pais Aurelio e Terezinha por terem me criado e educado com muito amor e carinho. Amo todos vocês.

A todos os professores que me ajudaram a chegar até aqui, em especial do Departamento de Química Orgânica deste Instituto e do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da UNAERP.

A professora Dr.^a Bianca Waléria Bertoni por todo suporte nas pesquisa e principalmente pela amizade.

A minha grande amiga Vânia por seus ensinamentos e companheirismo.

Aos meus amigos e colegas de laboratório adquiridos durante o tempo mestrado.

As professoras que compuseram a minha banca de qualificação Dr.^a Angela Regina Araújo e Dr.^a Isabele Rodrigues Nascimento por suas contribuições.

A Dr.^a Luciana Polese por te me ajudado muito com as análises de HPLC.

A UNAERP, representada na pessoa da Dr.^a Suzelei de Castro França, pela oportunidade e todo suporte que me foi dado para a realização das pesquisas.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estabelecer metodologia de cultivo e produção de células e/ou órgãos *in vitro* da espécie *Salacia campestris* com vista à obtenção de triterpenos quinonametídeos. Para isso, aplicando-se técnicas biotecnológicas, diversas tentativas de inserir a espécie *in vitro* foram realizadas utilizando explantes de folhas (limbo foliar e pecíolo), endosperma e sementes. Raízes obtidas *in vitro* foram cultivadas por 105 dias, sendo a presença e o teor de triterpenos quinonametídeos avaliados no decorrer deste período. Sistemas radiculares de plantas jovens (1 ano) cultivadas em casa de vegetação e sistemas radiculares de plantas adultas foram também analisadas quanto à presença e teor de triterpenos quinonametídeos. Foram utilizadas técnicas cromatográficas e de espectrometria de massas (EM) para a detecção e identificação de 22 β -hidroximaitenina, maitenina e netzahualcoiemo. Os ensaios citotóxicos *in vitro* foram realizados, como os dois últimos quinonametídeos, frente à linhagem de células normais 3T3 (fibroblasto) e de células tumorais HeLa (cólon de útero) e B16-F10 (melanoma murino). A partir de explantes de endosperma inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com 20 g/L de sacarose, acrescido com 4,0 mg/L de AIB (ácido indolbutírico) e 100 mg/L de PVP (polivinilpirrolidona), foram obtidas raízes *in vitro*. A partir dos estudos fitoquímicos foram detectados e identificados, nas raízes *in vitro* e em sistemas radiculares de plantas cultivadas em casa de vegetação, os triterpenos quinonametídeos maitenina e 22 β -hidroximaitenina, enquanto que nos sistemas radiculares coletados em campo foram identificados os triterpenos maitenina e netzahualcoiemo. O isolamento dos três triterpenos citados também foi realizado. Para as raízes cultivadas *in vitro*, os resultados indicaram que o maior acúmulo de biomassa ocorreu no 60º dia de cultivo e os maiores teores de maitenina (972,11 μ g/g) e 22 β -hidroximaitenina (488,44 μ g/g) foram encontrados com 7 e 15 dias de cultivo, respectivamente. Em comparação com sistemas radiculares de plantas jovens, as raízes *in vitro* produziram 5,55 e 10,95 vezes mais maitenina e 22 β -hidroximaitenina, respectivamente. Os ensaios citotóxicos dos triterpenos maitenina e netzahualcoiemo mostraram resultados semelhantes aos das drogas antitumorais paclitaxel e doxorrubicina.

Palavras chave: produtos naturais; câncer; cultura de tecidos; HPLC; quantificação, triterpenos quinonametídeos, *Salacia campestris*; Celastraceae.

ABSTRACT

This work aimed to establish a methodology of cultivation and production of *in vitro* cells and /or organs of *Salacia campestris*, trying to obtain the quinone-methide triterpenes. Based on this and applying biotechnological techniques, several attempts to insert this species in an *in vitro* system were performed using leaf explants (leaf and petiole), endosperm and seeds. The *in vitro* roots obtained were cultured for 105 days, and the presence and content of quinone-methide triterpenes were evaluated during this period. The roots of young plants (1 year) grown in a greenhouse as well roots of adult plants were also analyzed for the presence and content of the quinone-methides. The analysis of the quinone-methides were performed using chromatographic techniques and mass spectrometry (MS) led to the identification of 22 β -hydroxymaytenin, maytenin and netzahualcoyene. The *in vitro* cytotoxic assays were performed using the quinone-methides maytenin and netzahualcoyene, comparing with the normal cell line 3T3 (fibroblast) as well the HeLa tumor cells (uterus carcinoma) and B16-F10 (murine melanoma). The *in vitro* roots were obtained from endosperm explants, inoculated in WPM medium supplemented with 20 g/L sucrose, 4.0 mg/L IBA (indole-butyric acid) and 100 mg/L PVP (polyvinylpyrrolidone). The phytochemical studies of the *in vitro* roots and roots of plants grown in a greenhouse resulted in the identification of the quinone-methide triterpenes maytenin and 22 β -hydroxymaytenin, while from the natural roots were identified the quinone-methides maytenin and netzahualcoyene. All of the triterpenes were also isolated. The results obtained for *in vitro* roots indicated that the greatest accumulation of biomass occurred on the 60th day of culture and the highest levels of maytenin (972.11 mg/g) and 22 β -hydroxymaytenin (488.44 mg/g) were found at 7 and 15 days of cultivation, respectively. The comparison of the maytenin and 22 β -hydroxymaytenin accumulated in the *in vitro* roots with the roots obtained from young plants showed to be more than 5.55 and 10.95 times, respectively. The cytotoxic bioassays of the maytenin and netzahualcoyene showed similar results those of antitumor drugs paclitaxel and doxorubicin.

Keywords: natural products; cancer; tissue culture; HPLC; quantification, quinone-methide triterpenes, *Salacia campestris*; Celastraceae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** — Planta da espécie *Salacia campestris* em seu habitat natural (A), com detalhes das flores (B) e frutos (C). 22
- Figura 2** — Planta e sistema radicular da espécie *S. campestris* coletada em seu habitat natural (A), com detalhes do cerne e entrecasca (B) (C). 23
- Figura 3** — Metabólitos secundários isolados de folhas (A), caule (B) e sistemas radiculares de *S. campestris*. 24
- Figura 4** — Esqueleto 24-*nor*-D: A-friedo-oleonano dos triterpenos quinonametídeos. 25
- Figura 5** — Exemplos de triterpenos quinonametídeos com seus diferentes sistemas de conjugação. 26
- Figura 6** — Sementes de *S. campestris* inoculadas em cubeta (A) e frasco (B) contendo meio de cultura. 45
- Figura 7** — Explante de endosperma de *S. campestris* inoculado *in vitro*. 46
- Figura 8** — Planta de *S. campestris* obtida a partir de semente germinada *in vitro*. 47
- Figura 9** — Raízes de *S. campestris* obtidas *in vitro*. 48
- Figura 10** — Partes do sistema radicular de *S. campestris*. 51
- Figura 11** — Planta jovem (1 ano de idade) de *S. Campestris*. 52
- Figura 12** — Raízes oxidadas (A) e não oxidadas (B) obtidas *in vitro* a partir de endosperma de *S. campestris*. 62
- Figura 13** — Raiz de *S. campestris* obtida *in vitro* a partir de endosperma apresentando oxidação fenólica (A) e apresetando oxidação fenólica controlada (B). 63
- Figura 14** — Acúmulo de massa fresca e seca em função do tempo de cultivo *in vitro* de raízes de *S. campestris*. 64
- Figura 15** — Células de *S. campestris* em suspensão. 65
- Figura 16** — Cromatogramas obtidos via CLAE dos padrões maitenina (A), pristimerina (B) e do extrato CA1-DCM (C). 67
- Figura 17** — Cromatogramas obtidos via CLAE dos extratos de raízes *in vitro* obtidos com 30 (A), 45 (B), 60 (C), e 75 (D) dias de cultura. 68

Figura 18 — Espectro de massas de primeira ordem do extrato CA1-DCM, utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.	69
Figura 19 — Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 421 do extrato CA1-DCM utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.	70
Figura 20 — Estrutura química da maitenina (TQ 1).	70
Figura 21 — Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 463 do extrato CA1-DCM utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.	71
Figura 22 — Estrutura química do netzauualcoieno (TQ 2).	72
Figura 23 — Espectro de massas de primeira ordem do extrato RV-DCM, utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.	72
Figura 24 — Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 421 do extrato RV-DCM utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.	73
Figura 25 — Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 437 do extrato RV-DCM utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.	73
Figura 26 — Estrutura química do 22 β -hidroximaitenina (TQ 3).	74
Figura 27 — Cromatograma da maitenina (TQ 1) (TR=14,6 min) obtido via CLAE (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)) e seu espectro de UV com o máximo de absorção.	75
Figura 28 — Cromatograma do netzauualcoieno (TQ 2) (TR=17,9 min) obtido via CLAE (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)) e seu espectro de UV com o máximo de absorção.	76
Figura 29 — Cromatograma obtido via CLAE da mistura dos padrões maitenina (TR=14,6) e netzauualcoieno (TR=17,9) em concentração de 50 μ g/mL (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)) utilizados no estabelecimento das curvas de calibração.	76
Figura 30 — Curva analítica com padronização externa na faixa de 1,5 a 35,0 μ g/mL para a maitenina.	77
Figura 31 — Curva analítica com padronização externa na faixa de 1,5 a 35,0 μ g/mL para o netzauualcoieno.	78
Figura 32 — Cromatogramas dos extratos das raízes obtidas <i>in vitro</i> (RV) com 0 (A), 7 (B), 15 (C), 30 (D), 45 (E), 60 (F), 75 (G), 90 (H) e 105 (I) dias de cultura (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)).	80

- Figura 33** — Gráfico de comparação do teor de maitenina e 22 β -hidroximaitenina nas raízes de *S. campestris* cultivadas *in vitro* com 0, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias. 82
- Figura 34** — Acúmulo de biomassa seca e concentração de maitenina e 22 β -hidroximaitenina nas raízes de *S. campestris* cultivadas *in vitro* por 105 dias. 85
- Figura 35** — Cromatograma do extrato dos sistemas radiculares de plantas jovens (RPJ) (condições: Seção 3.3.5.2 **(B) (M4)**). 85
- Figura 36** — Cromatograma do extrato do sistema radicular da planta coletada no campo (RN) (condições: Seção 3.3.5.2 **(B) (M4)**). 86
- Figura 37** — Gráfico de comparação do teor de maitenina, 22 β -hidroximaitenina e netzauualcoieno nas raízes *in vitro* (RV), com 7 e 15 dias de crescimento e nos sistemas radiculares de plantas jovens (RPJ) e de plantas *in natura* (RN) de *S. campestris*. 87

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** — Conversão do 2,3-epoxiesqualeno à 3 β -friedelanol e friedelina e seu envolvimento como precursor biossintético dos triterpenos quinonametídeos em *Maytenus aquifolium* e *S. campestris*. 27
- Esquema 2** — Isolamento dos triterpenos quinonametídeos **1** e **2** a partir do extrato Ca1-DCM de *S. campestris*. 56
- Esquema 3** — Isolamento do triterpeno quinonametídeo **3** a partir do extrato DS-DCM de *S. campestris*. 57
- Esquema 4** — Principais fragmentações observadas no espectro de massas da maitenina. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Exemplos de triterpenos quinonametídeos encontrados em membros da família Celastraceae e sua respectiva atividade antitumoral <i>in vitro</i> .	29
Tabela 2 — Exemplos de culturas de tecidos <i>in vitro</i> utilizados na produção de triterpenos.	40
Tabela 3 — Triterpenos quinonametídeos isolados de <i>S. campestris</i> .	74
Tabela 4 — Dados de calibração, limites de detecção e quantificação de maitenina e netzualcoieno.	78
Tabela 5 — Rendimento da biomassa seca em relação à fresca e do extrato DCM em relação a biomassa seca das raízes <i>in vitro</i> e do sistema radicular de <i>S. campestris</i> .	79
Tabela 6 — Teor dos triterpenos quinonametídeos maitenina, 22 β -hidroximaitenina e netzualcoieno dos extratos e da biomassa seca das raízes cultivadas <i>in vitro</i> e dos sistemas radiculares de <i>S. campestris</i> .	81
Tabela 7 — Valores de IC ₅₀ expressos em $\mu\text{g/mL}$ para os triterpenos quinonametídeos maitenina e netzualcoieno e os controles positivos paclitaxel e doxorrubicina.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ACN – acetonitrila

AcOEt – acetato de etila

AIA – ácido indolacético

AIB – ácido indolbutírico

ANA – ácido naftalenoacético

BAP - 6-benzilaminopurina

CC – cromatografia em coluna

CCDC – cromatografia em camada delgada comparativa

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – detector de arranjo de fotodiodos “diode array detector”

DCM – diclorometano

EM – espectrometria de massas

EtOH – etanol

FM – fase móvel

h - horas

HAc – ácido acético

Hex – hexano

HF – ácido fórmico

HOAc – ácido acético

IC₅₀ – concentração inibitória que representa a quantidade de substância citotóxica necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular

IES – ionização por electrospray

IPCI – ionização química à pressão atmosférica

IT – ion-trap

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MeOH – metanol

min – minutos

MS – Meio de cultura Murashige & Skoog

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

P.A. – pureza analítica

PVP – polivinilpirrolidona

r – coeficiente de correlação

rend.- rendimento

RMN – ressonância magnética nuclear

RMN de ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN de ^1H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio um

rpm – rotações por minuto

SPE – extração em fase sólida (solid phase extraction)

TQ – triterpeno quinonametideo

TQs – triterpenos quinonametideos

TR – tempo de retenção

UV – ultravioleta

Vis – visível

VM – volume morto

WPM – Meio de cultura “Woody Plant Medium”

λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Aspectos quimiotaxonômicos das famílias Hippocrateaceae e Celastraceae	20
1.2	A família Celastraceae	21
1.3	A espécie <i>Salacia campestris</i> (Cambess.) Walp.	21
1.4	Os triterpenos quinonametídeos	24
1.5	Cultura de tecidos vegetais como fonte de moléculas bioativas	36
1.6	Cultura de células e raízes na produção de triterpenos	38
2	OBJETIVOS	42
2.1	Geral	42
2.2	Específicos	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	Obtenção do material vegetal	43
3.2	Experimentos para obtenção de material vegetal <i>in vitro</i>	43
3.2.1	Condições gerais dos experimentos	43
3.2.2	Reagentes utilizados	44
3.2.3	Inoculação de sementes	45
3.2.4	Descontaminação de sementes inoculadas <i>in vitro</i>	46
3.2.5	Obtenção de rizogênese <i>in vitro</i>	46
3.2.6	Determinação da curva de crescimento de raízes produzidas <i>in vitro</i>	47
3.2.7	Obtenção de células em suspensão	48
3.2.8	Assepsia de folhas e ramos	49
3.2.9	Introdução de explantes para propagação <i>in vitro</i>	49
3.3	Estudos fitoquímicos	50
3.3.1	Condições gerais dos experimentos	50
3.3.2	Solventes e reagentes utilizados	50
3.3.3	Beneficiamento do material vegetal e preparação dos extratos vegetais	50
3.3.4	Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	53
3.3.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	53
3.3.5.1	Preparação das amostras (<i>Clean-up</i>)	53
3.3.5.2	Equipamentos, colunas e parâmetros utilizados	53

3.3.6	Análises por espectrometria de massas (EM)	55
3.3.6.1	Preparo das amostras para análise via EM	55
3.3.6.2	Espectrômetro e condições das análises	55
3.3.7	Isolamento dos triterpenos quinonametídeos	55
3.3.8	Determinação quantitativa dos triterpenos quinonametídeos por CLAE-DAD	57
3.4	Ensaio citotóxicos <i>in vitro</i>	58
3.4.1	Condições gerais dos experimentos	58
3.4.2	Meios de cultura, reagentes, equipamentos e antibióticos utilizados	59
3.4.3	Preparação das amostras para os ensaios	59
3.4.4	Cultivo das linhagens celulares	59
3.4.5	Ensaio da viabilidade celular pelo método MTT	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Estabelecimento do sistema <i>in vitro</i>	61
4.1.1	Assepsia e germinação das sementes	61
4.1.2	Obtenção de calos e rizogênese	62
4.1.3	Determinação da curva de crescimento de raízes produzidas <i>in vitro</i>	63
4.1.4	Obtenção de células em suspensão	64
4.1.5	Assepsia de folhas, pecíolos e gemas	65
4.2	Estudos fitoquímicos	66
4.2.1	Extração e confirmação da presença dos triterpenos quinonametídeos nos extratos de <i>S. campestris</i>	66
4.2.2	Deteção e identificação dos triterpenos quinonametídeos por EM	68
4.2.3	Isolamento dos triterpenos quinonametídeos	74
4.2.4	Determinação quantitativa dos triterpenos quinonametídeos por CLAE-DAD	75
4.3	Ensaio citotóxicos <i>in vitro</i>	88
5	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

A busca por biomoléculas com atividade farmacológica é uma prática que teve início no século XIX e perdura até os tempos atuais. Durante esse período uma infinidade de moléculas valiosas foram descobertas e, algumas delas, trouxeram benefícios que mudaram radicalmente a sociedade do ponto de vista farmacológico, como a morfina, a penicilina e o paclitaxel (HAMILTON e BASKETT, 2000; HENDERSON, 1997; ROWINSKY e DONEHOWER, 1995).

No entanto, nos últimos anos houve uma redução significativa no número de medicamentos aprovados para uso comercial, advindos direta ou indiretamente de produtos naturais. Este fato se contrapõe a expressiva biodiversidade ainda inexplorada, principalmente no Brasil, que se configura como uma enorme fonte potencial de novas moléculas de interesse farmacológico (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

O motivo para o declínio de novos medicamentos provenientes de fontes naturais está relacionado, sem dúvidas, aos avanços da química medicinal computacional (técnicas de docagem), da síntese orgânica e principalmente ao desinteresse das indústrias farmacêuticas por drogas advindas de produtos naturais. Este último fator é justificado pela dificuldade que as empresas enfrentam para obterem matéria-prima padronizada e em quantidade suficiente para a realização de estudos pré-clínicos e clínicos, bem como para a produção de medicamentos em escala industrial (LI e VEDERAS, 2009).

Neste contexto, ferramentas biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais, surgem como uma alternativa para suprir a demanda exigida pelas indústrias. Células ou órgãos de algumas espécies vegetais, cultivados *in vitro*, ou seja, sob condições controladas (temperatura, umidade, luminosidade, pH, etc.), são capazes de biossintetizar quantidades apreciáveis de metabólitos secundários bioativos em poucas semanas. Diferentemente de plantas cultivadas em campo, cuja produção de metabólitos em escala, na maioria dos casos, pode somente ser atingida após anos de cultivo e, além disso, a produção desses metabólitos pode ser afetada por interferentes bióticos e abióticos.

Teoricamente, a partir de qualquer espécie vegetal, técnicas biotecnológicas podem ser empregadas como modelo de estudo para produção de metabólitos secundários de interesse, desde que ela seja uma fonte importante destes

compostos. Um exemplo disso é *Salacia campestris*, uma planta endêmica do Cerrado, pertencente a família Celastraceae, conhecida por acumular em seus radiculares os triterpenos quinonametídeos, compostos que possuem uma enorme gama de atividades biológicas comprovadas, especialmente antitumoral.

Assim, o presente estudo teve como principal objetivo aplicar as técnicas de cultura de tecidos vegetais visando a produção dos triterpenos quinonametídeos e avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dessas moléculas frente às linhagens normais 3T3 (fibroblasto) e tumorais HeLa (carcinoma de colo de útero) e B16-F10 (melanoma murino).

1.1 Aspectos quimiotaxonômicos das famílias Hippocrateaceae e Celastraceae

A espécie *Salacia campestris* pertenceu até 1993 a família Hippocrateaceae que agrupava cerca de 25 gêneros (LOMBARDI e TEMPONI, 2000), os quais estão distribuídos nos trópicos e subtrópicos dos dois hemisférios (SIMMONS, 2004). No Brasil, esta família é representada por 12 gêneros, com cerca de 65 espécies, as quais ocorrem principalmente na Mata Atlântica e na Região Amazônica, mas também em Campos, Cerrados e Restingas (LOMBARDI e TEMPONI, 2000).

A posição taxonômica desta família foi bastante discutida entre os taxonomistas. Alguns consideravam Hippocrateaceae como uma família distinta, enquanto outros argumentavam que a mesma estava inserida na família Celastraceae (ALVARENGA e FERRO, 2006).

Recentemente ela foi incorporada à família Celastraceae a qual passou a ser composta de duas subfamílias: Hippocrateoideae, com 19 gêneros e 100 espécies, e Salacioideae, com seis gêneros e 260 espécies (LOMBARDI, 2010; SIMMONS, 2004). Essa fusão das duas famílias é justificada principalmente pela presença de marcadores quimiotaxonômicos comuns às mesmas como os alcaloides piridínicos sesquiterpênicos (ANISZEWSKI, 2007; LIÃO, 2003) e os triterpenos quinonametídeos (BRUNING e WAGNER, 1978; GAMLATH et al., 1990). Além das características químicas comuns, os membros destas famílias também apresentam semelhanças morfológicas e genéticas, o que respalda ainda mais essa inclusão (SIMMONS, 2004; SIMMONS et al., 2000).

1.2 A família Celastraceae

A família Celastraceae se constitui em um grupo bastante numeroso de táxons, com cerca de 55 gêneros e 855 espécies, sendo os gêneros *Maytenus* e *Euonymus* os maiores com aproximadamente 200 espécies cada (SCHWEINGRUBER et al, 2011). Essa família é constituída por plantas arbóreas, arbustivas e lianas (ALVARENGA e FERRO, 2006; SIMMONS, 2004) as quais apresentam distribuição subcosmopolita (exceto em regiões árticas), sendo a maioria das espécies encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios (SIMMONS, 2004).

Nos últimos anos, uma vasta variedade de metabólitos secundários bioativos foi isolada de membros desta família, principalmente terpenos. Entre eles, diterpenos dos tipos ent-rosano (NÚÑEZ et al., 2011), abietano (ANKLI et al., 2000; MARTIN, 1973; NÚÑEZ et al., 2011), ent-labdano (KOYAMA et al., 2010), Kaurano (TANAKA et al, 2004), norisopimaradieno (GONZÁLEZ et al., 1989), totarano (MARTIN, 1973) e podocarpano (CHEN et al., 1999), sesquiterpenos de esqueleto agarofurano (CHANG et al, 2003; PERESTELO et al., 2010; TORRES-ROMERO et al., 2008; WENG e YEN, 2010; XIA et al 2002) e triterpenos dos tipos friedelano (CORSINO et al., 2000; TORRES-ROMERO et al., 2010), lupano (DU et al., 2009; SILVA et al., 2005), oleanano (CÁCERES-CASTILLO et al., 2008; NIAMPOKA et al., 2005), ursano (CÁCERES-CASTILLO et al., 2008; NAKANO et al., 1997), glutinano (NAKANO et al., 1997), fenólico (LI et al., 1997; TAKAISHI et al., 1997) dimérico (GONZÁLEZ et al., 1996; 2001; SHIROTA et al., 2004), trimérico (GONZÁLEZ et al., 1999), eno-quinonametideo (CARVALHO et al.; 2005; JELLER et al.; 2004) e quinonametideo (CARVALHO et al., 2005; CORSINO et al., 1998b; 2000; JELLER et al., 2004).

1.3 A espécie *Salacia campestris* (Cambess.) Walp.

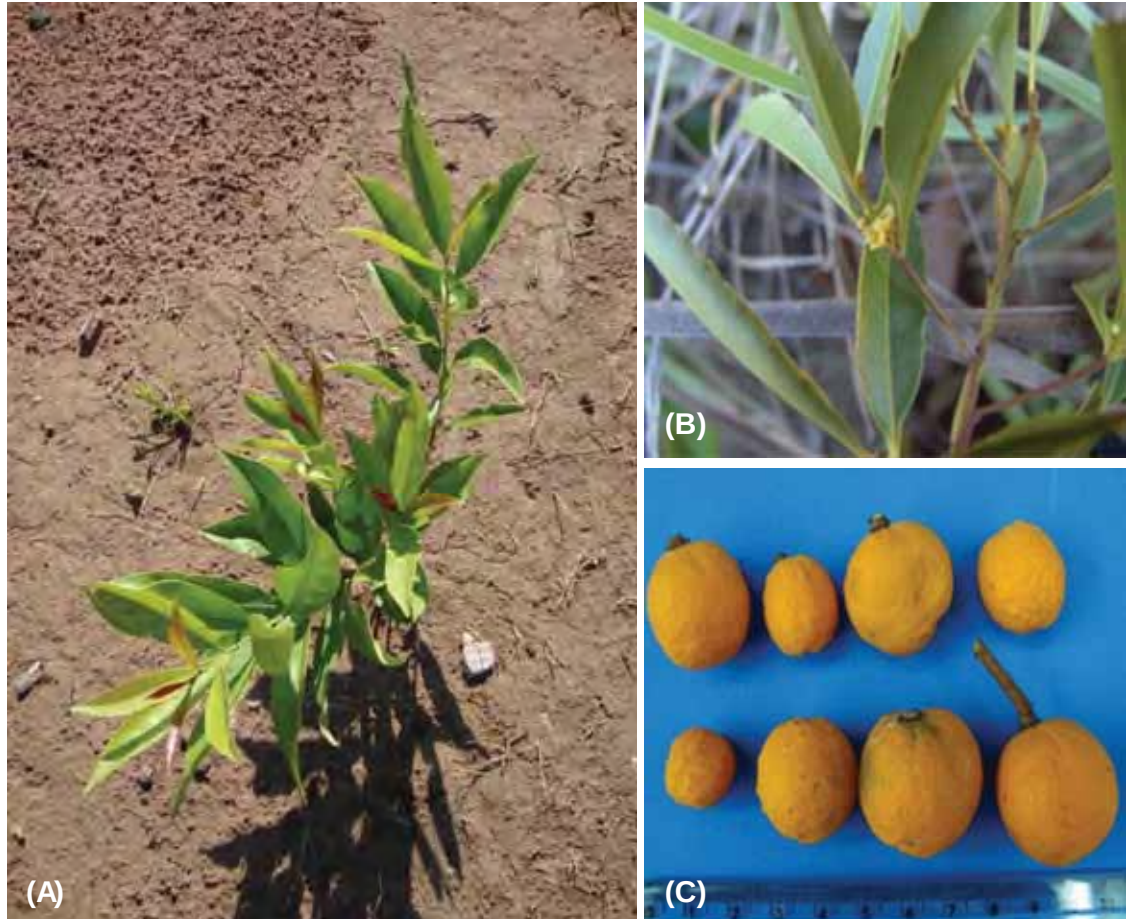
A espécie *Salacia campestris* possui vários sinônimos botânicos: *Calypso campestris* Cambess., *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C. Sm., *Peritassa adamantina* Miers, *Calypso maximiliani* Mart. ex Peyr., entre outros (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2011).

Segundo o Missouri Botanical Garden (2011) *S. campestris* está classificada sistematicamente dentro da ordem hierárquica descrita como:

- Classe: Equisetopsida C. Agardh
- Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superordem: Rosanae Takht.
- Ordem: Celastrales Link
- Família: Celastraceae R. Br.
- Gênero: *Salacia*
- Espécie: *Salacia campestris*

As plantas desta espécie habitam os Cerrados e Campos do Brasil e as Savanas do Paraguai (TEMPON I e LOMBARDI, 2000). No Brasil, ela é conhecida popularmente por bacupari-do-campo, bacupari-do-cerrado, capicuru, japicuru,

Figura 1 — Planta da espécie *Salacia campestris* em seu habitat natural (A), com detalhes das flores (B) e frutos (C).



Fonte: Arquivo pessoal

laranjinha-do-campo, tapicuru e uvacupari. É um arbusto ereto de ramos flexíveis, de 0,4 a 2 m de altura (Figura 1) que possui folhas simples, subcoriáceas e glabras de 6 a 8 cm de comprimento. Suas flores são pequenas e amareladas, formadas de agosto a outubro e seus frutos são do tipo baga, com poupa carnosa e de sabor doce que amadurecem entre outubro e novembro (Figura 2). Esses frutos são consumidos *in natura* pela população, entretanto, não são muito apreciados devido a dificuldade de extração de sua polpa (LORENZI, 2006).

Do ponto de vista fitoquímico desta espécie, vários estudos foram realizados, em diferentes órgãos e tecidos, possibilitando assim traçar seu perfil químico. Dentre as classes de metabólitos secundários identificadas, nas folhas de *S. campestris* foi evidenciada a presença de flavonóides (LIÃO, 1997) e triterpenos derivados dos friedelanos (BUFFA FILHO, 2005; CARVALHO, 2002; CORSINO et al., 2000). No

Figura 2 — Planta e sistema radicular da espécie *S. campestris* coletada em seu habitat natural (A), com detalhes do cerne e entrecasca (B) (C).

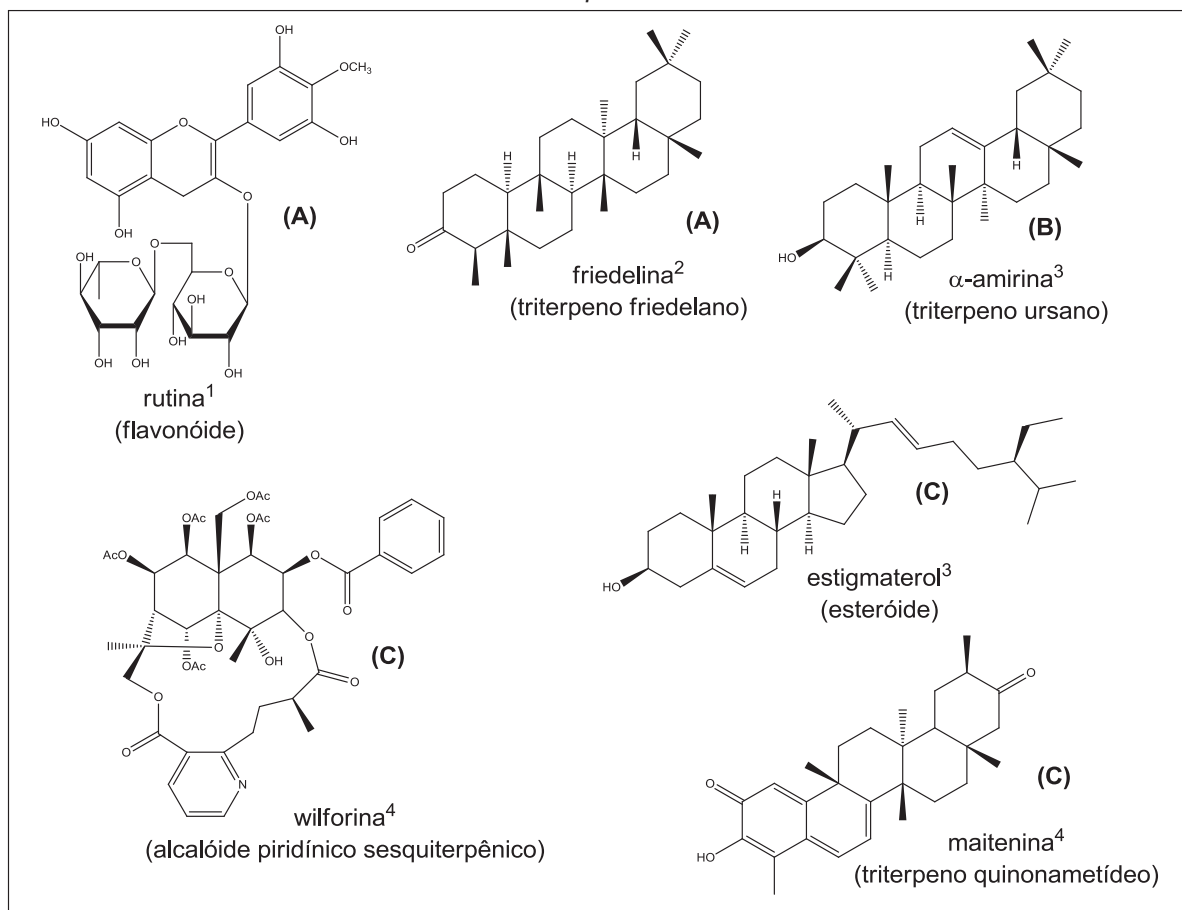


Fonte: Arquivo pessoal

caule, foram encontrados triterpenos do tipo ursano (LIÃO, 1994) e nos sistemas

radiculares (Figura 2), alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (CORSINO et al., 1998a; LIÃO, 1997; RODRIGUES FILHO et al., 2001; SANTOS, 2010), esteroides, triterpenos dos tipos ursano, friedelano (LIÃO, 1994), eno-quinonametídeo (BUFFA FILHO et al., 2002; CARVALHO et al., 2005; CORSINO et al., 2000; LIÃO, 1994) e quinonametídeo (BUFFA FILHO et al., 2002; CARVALHO et al., 2005; CORSINO et al., 2000; LIÃO, 1994; MONACHE et al., 1972; RODRIGUES FILHO et al., 2002; SANTOS, 2010). A figura 3 mostra exemplos de metabólitos secundários isolados da espécie *Salacia campestris*.

Figura 3 — Metabólitos secundários isolados de folhas (A), caule (B) e sistemas radiculares de *S. campestris*.



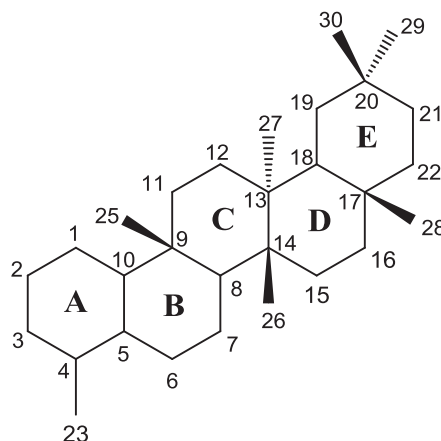
Fonte: (¹LIÃO, 1997; ²CORSINO et al., 2000; ³LIÃO, 1994; ⁴SANTOS, 2010).

1.4 Os triterpenos quinonametídeos

Os triterpenos quinonametídeos, também denominados de celastróides, são compostos que apresentam um núcleo 24-*nor*-D:A-friedo-oleonano (Figura 4) (GUNATILAKA et al., 1996), caracterizados por um padrão de oxigenações e

variações de insaturações. Tipicamente são moléculas pentacíclicas que apresentam uma cetona no C-2, um grupo hidroxila no C-3 e um sistema conjugado de insaturações envolvendo os anéis A e B. (ALVARENGA e FERRO, 2006).

Figura 4 — Esqueleto 24-*nor*-D: A-friedo-oleonano dos triterpenos quinonametídeos.



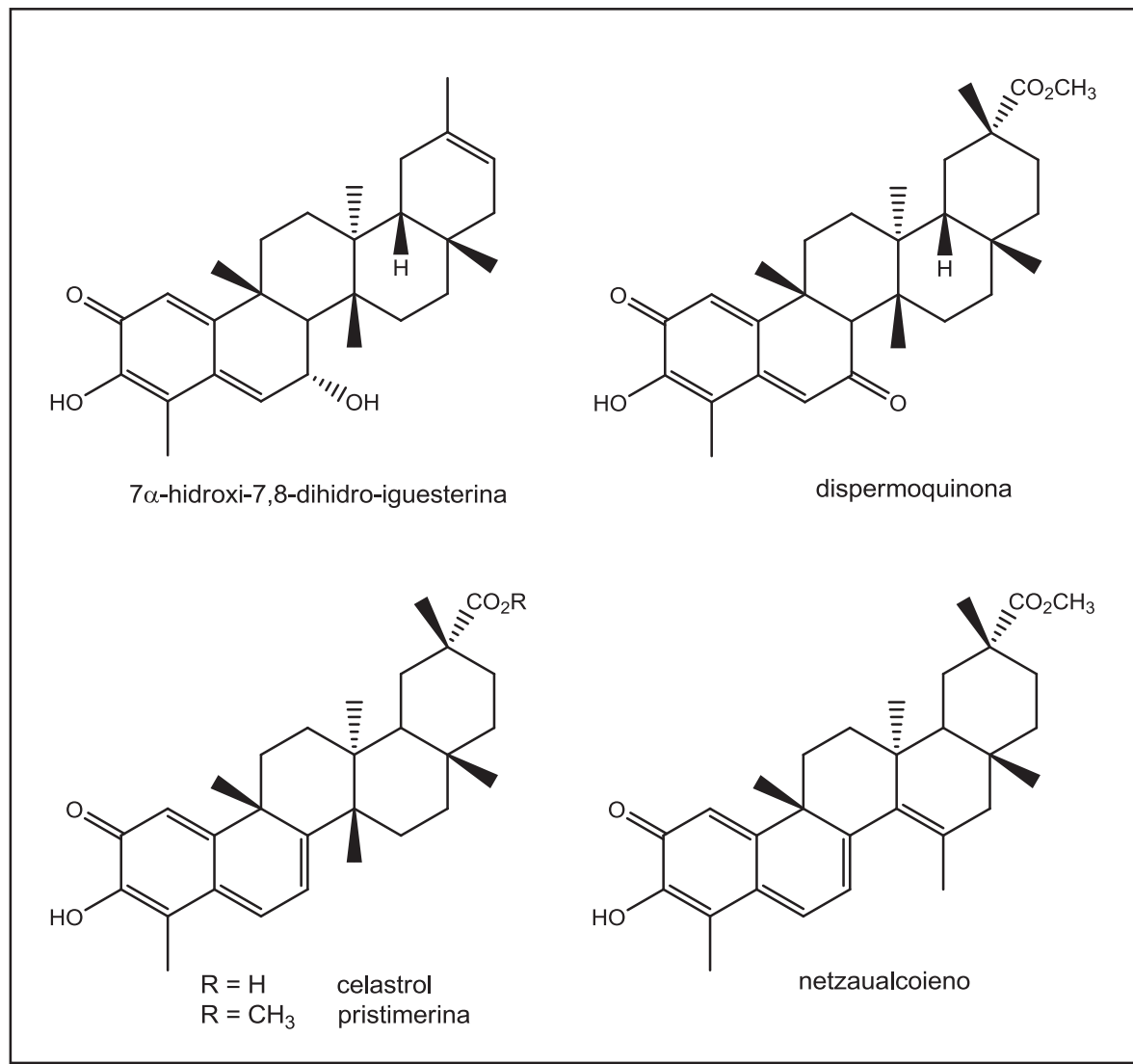
Segundo González et al. (2000) de acordo com seu sistema de conjugação os triterpenos quinonametídeos podem ser classificados estruturalmente em quatro tipos (Figura 5): com conjugação não estendida, como o 7 α -hidroxi-7,8-dihidro-iguesterina; com conjugação estendida do anel quinonametídeo A com um grupo carbonila do anel B, como no caso da dispermoquinona; com uma dupla ligação adicional no anel B, como no caso da pristimerina e do celastrol e com um sistema dieno adicional, como no caso do netzaualcoieno.

Esses terpenóides são encontrados exclusivamente em membros da família Celastraceae e sendo assim, são considerados marcadores químicos desta família (BROWNING e WAGNER, 1978; GAMLATH et al., 1990).

O primeiro estudo científico relacionando a celastróides foi publicado por Gisvold em 1939, no qual foi relatado o isolamento de um pigmento vermelho de *Celastrus scandens*, chamado celastrol (apud GONZÁLEZ et al., 2000). Doze anos depois, um estudo químico realizado com uma espécie de Celastraceae oriunda da Índia, *Pristimeria indica*, culminou no isolamento de cristais em forma de agulhas alaranjadas denominado pristimerina (BHATNAGAR e DIVEKAR, 1951 apud GONZÁLEZ et al., 2000). Posteriormente, pesquisadores observaram uma provável relação entre esses isoprenóides e estabeleceram que a pristimerina é o derivado

metilado do celastrol (Figura 5) (NAKANISHI et al., 1965 apud ALVARENGA e FERRO, 2006).

Figura 5 — Exemplos de triterpenos quinonametídeos com seus diferentes sistemas de conjugação.

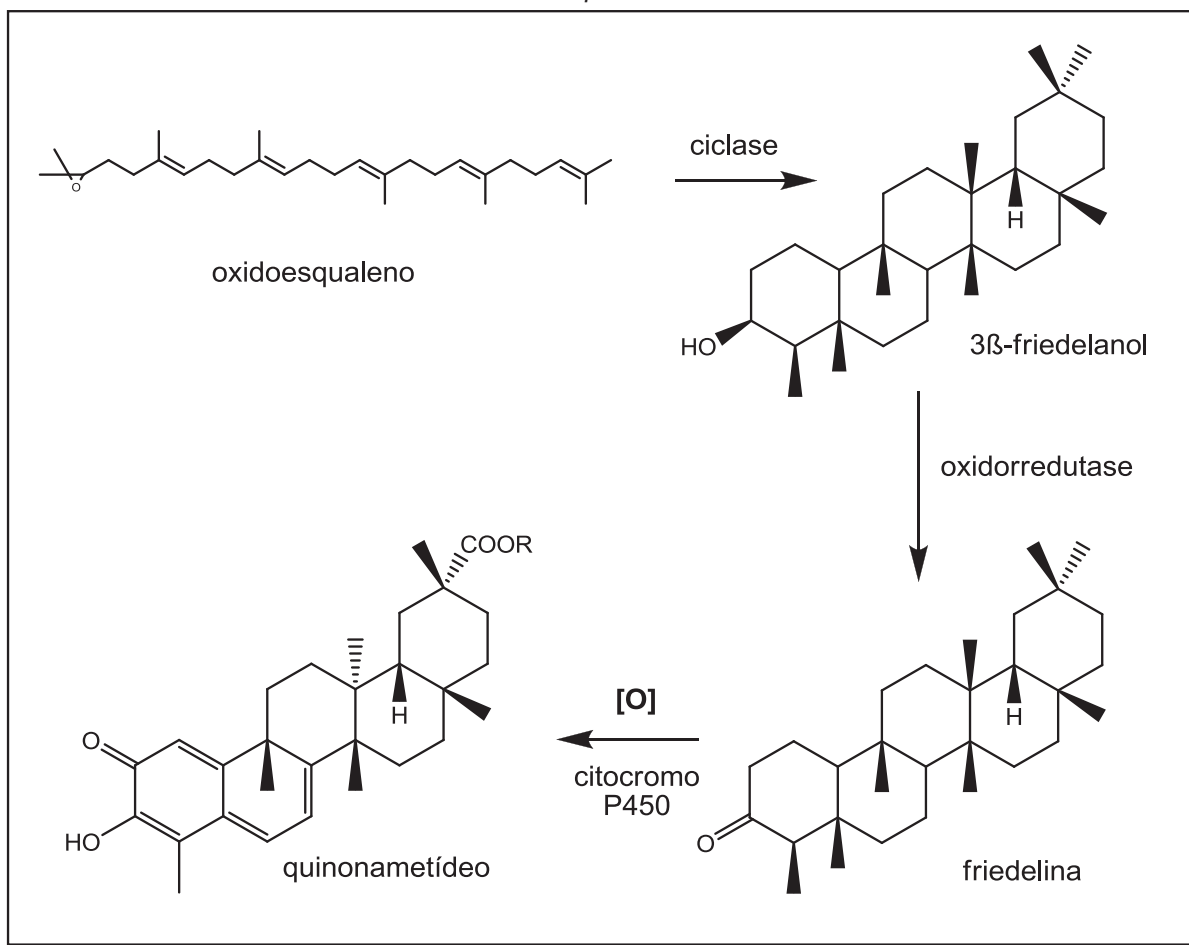


Desde a descoberta do celastrol e da pristimerina até os dias atuais, uma grande variedade de outros triterpenos quinonametídeos foi isolada de membros da família Celastraceae. A tabela 1 lista vários exemplos de celastróides e as respectivas espécies das quais foram isolados.

Estudos de incorporação de precursores isotópicamente marcados e atividade da enzima ciclase, demonstraram que os quinonametídeos são substâncias que apresentam como precursores os triterpenos friedelânicos, os quais são biossintetizados nas folhas e posteriormente translocados para os sistemas radiculares, sendo convertidos aos triterpenos quinonametídeos e então

compartimentalizados (CORSINO et al.; 2000). O esquema 1 ilustra a biossíntese dos triterpenos quinonametídeos, tendo como precursores o 3 β -friedelanol e a friedelina, triterpenos friedelânicos, que são comumente encontrados nas folhas de espécies de Celastraceae.

Esquema 1 — Conversão do 2,3-epoxiesqualeno à 3 β -friedelanol e friedelina e seu envolvimento como precursor biossintético dos triterpenos quinonametídeos em *Maytenus aquifolium* e *S. campestris*.



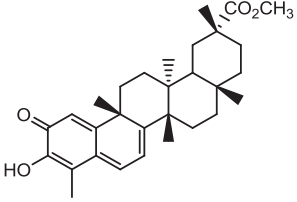
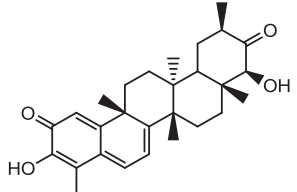
Fonte: (CORSINO et al., 2000).

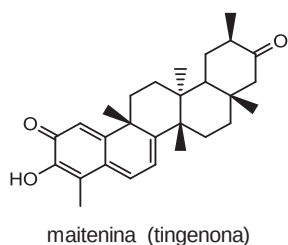
Em trabalho realizado com *Salacia campestris* foi determinado que enzima oxidorrreductase do tipo citocromo P450 está envolvida nas etapas de oxidação dos triterpenos quinonametídeos (CARVALHO, 2002).

Em se tratando de atividades biológicas, os celastróides apresentam uma grande gama, sendo as principais: inseticida, anti-alimentar (CORSINO et al., 1998b), antioxidante (CARVALHO et al., 2005; JELLER et al., 2004; TROTT et al., 2008), análogos anti-HIV (SUN et al., 2003), contraceptiva (MONTANARI et al., 2002), antileishmaniose (El TAHIR et al., 1998), antiobesidade (AKASE et al., 2009;

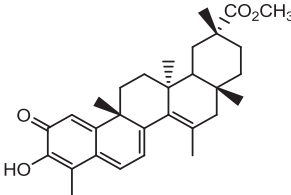
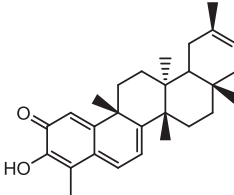
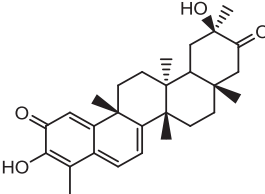
IM et al., 2008). No entanto, a principal ação atribuída a esta classe de metabólitos é a atividade antitumoral. A tabela 1 mostra alguns exemplos de triterpenos quinonametídeos encontrados em membros da família Celastraceae com suas respectivas atividades antitumorais *in vitro*.

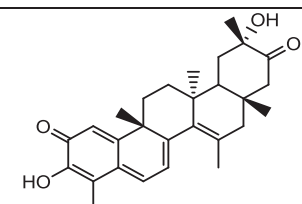
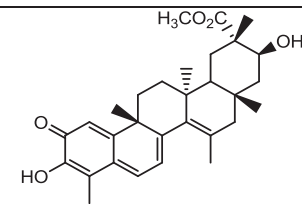
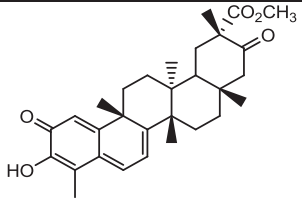
Tabela 1 — Exemplos de triterpenos quinonametídeos encontrados em membros da família Celastraceae e sua respectiva atividade antitumoral *in vitro*.

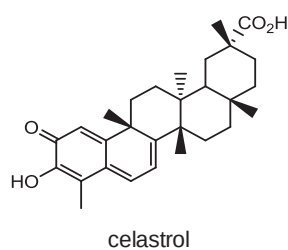
Estrutura dos triterpenos quinonametídeos	Espécie de Celastraceae do qual foram isolados	Linhagem tumoral	Referência
 pristimerina	<i>Tripterygium regelii</i> ¹	NCI-H460 (pulmão) ¹	¹ SEO et al., 2011
	<i>Reissantia buchananii</i> ^{3,4}	A549 (pulmão) ³	³ CHANG et al., 2003
	<i>Maytenus vitis-idaea</i> ⁸	MCF-7 (mama) ^{3,19}	⁴ WU et al., 2005
	<i>Salacia campestris</i> ^{9,10,11,13,14}	HCT-8 (cólon) ³	⁸ ALMEIDA et al., 2010
	<i>Maytenus ilicifolia</i> ¹⁴	KB (boca) ³	⁹ LIÃO et al., 1994
	<i>Maytenus chuchuhuasca</i> ¹⁷	KB-VIN (boca resistente à vincristina) ³	¹⁰ BUFFA FILHO et al., 2002
	<i>Maytenus retusa</i> ¹⁹	PC-3 (próstata) ³	¹¹ CORSINO et al., 2000
		1A9 (ovário) ³	¹³ CARVALHO et al., 2005
		MDA-MB-231 (mama) ⁴	¹⁴ SANTOS, 2010
		RPMI8226 (mieloma) ¹⁷	¹⁷ MORITA et al., 2008
		HL60 (eucemia) ¹⁹	¹⁹ ORAMAS-ROYO et al., 2010
 22β-hidroximaitenina	<i>Tripterygium regelii</i> ¹	NCI-H460 (pulmão) ¹	¹ SEO et al., 2011
	<i>Salacia campestris</i> ^{9,10,11}	RPMI8226 (mieloma) ¹⁷	⁹ LIÃO et al., 1994
	<i>Maytenus chuchuhuasca</i> ¹⁷	A549 (pulmão) ¹⁸	¹⁰ BUFFA FILHO et al., 2002
	<i>Tripterygium regelii</i> ¹⁸	SK-OV3 (ovário) ¹⁸	¹¹ CORSINO et al., 2000
	<i>Maytenus retusa</i> ¹⁹	HL60 (eucemia) ¹⁹	¹⁷ MORITA et al., 2008
		MCF-7 (mama) ¹⁹	¹⁸ LEE et al., 2004
			¹⁹ ORAMAS-ROYO et al., 2010



<i>Tripterygium regelii</i> ¹	NCI-H460 (pulmão) ¹	¹ SEO et al., 2011
<i>Salacia petenensis</i> ²	MDA-MB-231 (mama) ²	² SETZER et al., 2001
<i>Elaeodendron croceum</i> ⁷	HeLa (colo do útero) ⁷	⁷ YELANI et al., 2010
<i>Maytenus vitis-idaea</i> ⁸	SNO (esôfago) ⁷	⁸ ALMEIDA et al., 2010
<i>Salacia campestris</i> ^{9,10,11,12,13,14,15}	BC-1 (mama) ¹⁶	⁹ LIÃO et al., 1994
<i>Maytenus ilicifolia</i> ¹⁴	HT-1080 (fibrosarcoma) ¹⁶	¹⁰ BUFFA FILHO et al., 2002
<i>Kokoona ochracea</i> ¹⁶	LU-1 (pulmão) ¹⁶	¹¹ CORSINO et al., 2000
<i>Maytenus chuchuhuasca</i> ¹⁷	MEL-2 (pele) ¹⁶	¹² MONACHE et al., 1972
<i>Maytenus retusa</i> ¹⁹	COL-2 (côlon) ¹⁶	¹³ CARVALHO et al., 2005
	KB (boca) ¹⁶	¹⁴ SANTOS, 2010
	KB-v1 (+vLB) (boca resistente a vimblastina) ¹⁶	¹⁵ RODRIGUES-FILHO et al., 2010
	P-388 (leucemia murina) ¹⁶	¹⁶ NGASSAPA et al., 1994
	A431 (carcinoma epidermóide) ¹⁶	¹⁷ MORITA et al., 2008
	LNcaP (próstata) ¹⁶	¹⁹ ORAMAS-ROYO et al., 2010
	ZR-7 5-1 (mama) ¹⁶	
	U373 (glioblastoma) ¹⁶	
	RPM8226 (mieloma) ¹⁷	
	HL60 (eucemia) ¹⁹	
	MCF-7 (mama) ¹⁹	

 netzaualeicoeno	<i>Maytenus vitis-idaea</i> ⁸	A2780 (ovário) ⁸ HBL-100 (mama) ⁸ HeLa (colo do útero) ⁸ SW1573 (pulmão) ⁸ T-47D (mama) ⁸ WiDr (colón) ⁸	⁸ ALMEIDA et al., 2010
 igueterina	<i>Tripterygium regelii</i> ¹ <i>Catha cassinoides</i> ²⁰ <i>Maytenus canariensis</i> ²¹	NCI-H460 (pulmão) ¹	¹ SEO et al., 2011 ²⁰ GONZÁLEZ et al., 1975 ²¹ GONZÁLEZ et al., 1995
 20β-hidroxiimaitenina	<i>Maytenus retusa</i> ¹⁹	HL60 (eucemia) ¹⁹ MCF-7 (mama) ¹⁹	¹⁹ ORAMAS-ROYO et al., 2010

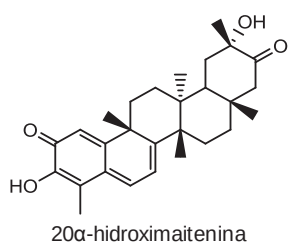
 20α-hydroxiescutiona	<i>Maytenus vitis-idaea</i>⁸	A2780 (ovário)⁸ HBL-100 (mama)⁸ HeLa (colo do útero)⁸ SW1573 (pulmão)⁸ T-47D (mama)⁸ WiDr (colón)⁸	⁸ALMEIDA et al., 2010
 netzauualcoionol	<i>Salacia petenensis</i>² <i>Cheiloclinium cognatum</i>²¹ <i>Schaefferia cuneifolia</i>²² <i>Maytenus horrida</i>²²	MDA-MB-231 (mama)²	²SETZER et al., 2001 ²¹JELLER et al., 2004 ²²MOUJIR et al., 1990
 21-oxo-pristimerina	<i>Maytenus retusa</i>¹⁹	HL60 (eucemia)¹⁹ MCF-7 (mama)¹⁹	¹⁹ORAMAS-ROYO et al., 2010



*Tripterygium regelii*¹
*Reissantia buechananii*³
*Tripterygium wilfordii*⁶
*Maytenus vitis-idaea*⁸
Salacia campestris^{9,10,11}

NCI-H460 (pulmão)¹
A549 (pulmão)³
MCF-7 (mama)³
HCT-8 (cólon)³
KB (boca)^{3,17}
KB-VIN (boca resistente
à vincristina)³
PC-3 (próstata)³
1A9 (ovário)³
W256 (mama)⁵
MDA-MB-231(mama)⁶
T47D (cólon)⁶
MEL-2 (pele)¹⁶
KB-v1 (+vLB) (boca
resistente a vimblastina)¹⁶
P-388 (leucemia murina)¹⁶
A431 (carcinoma
epidermóide)¹⁶
LNcaP (próstata)¹⁶
ZR-7 5-1 (mama)¹⁶

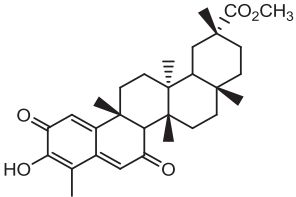
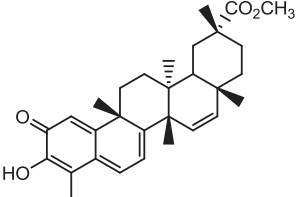
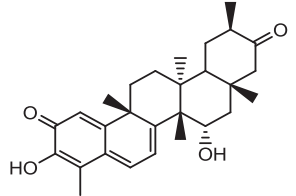
¹SEO et al., 2011
³CHANG et al., 2003
⁵IDRIS et al., 2009
⁶SUNG et al., 2010
⁸ALMEIDA et al., 2010
⁹LIÃO et al., 1994
¹⁰BUFFA FILHO et al., 2002
¹¹CORSINO et al., 2000
¹⁶NGASSAPA et al., 1994



*Elaeodendron croceum*⁷
Salacia campestris^{9,10,11,13}
*Kokoona ochracea*¹⁶
*Maytenus retusa*¹⁹

HeLa (colo do útero)⁷
 SNO (esôfago)⁷
 BC-1 (mama)¹⁷
 HT-1080 (fibrosarcoma)¹⁶
 LU-1 (pulmão)¹⁶
 MEL-2 (pele)¹⁶
 COL-2 (côlon)¹⁶
 KB (boca)¹⁶
 KB-v1 (+vLB) (boca
 resistente a vimblastina)¹⁶
 P-388 (leucemia murina)¹⁶
 A431 (carcinoma epidermóide)¹⁶
 LNcaP (próstata)¹⁶
 ZR-7 5-1 (mama)¹⁶
 U373 (glioblastoma)¹⁶
 HL60 (eucemia)¹⁹
 MCF-7 (mama)¹⁹

⁷YELANI et al., 2010
⁹LIÃO et al., 1994
¹⁰BUFFA FILHO et al., 2002
¹¹CORSINO et al., 2000
¹³CARVALHO et al., 2005
¹⁶NGASSAPA et al., 1994
¹⁹ORAMAS-ROYO et al., 2010

	<i>Maytenus retusa</i>¹⁹ <i>Maytenus dispermus</i>²³ <i>Maytenus apurimacensis</i>²⁴	HL60 (eucemia)¹⁹	¹⁹ORAMAS-ROYO et al., 2010 ²³MARTIN, 1975 ²⁴DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008
	<i>Maytenus vitis-idaea</i>⁸	A2780 (ovário)⁸ HBL-100 (mama)⁸ HeLa (colo do útero)⁸ SW1573 (pulmão)⁸ T-47D (mama)⁸ WiDr (colón)⁸	⁸ALMEIDA et al., 2010
	<i>Maytenus vitis-idaea</i>⁸	A2780 (ovário)⁸ HBL-100 (mama)⁸ HeLa (colo do útero)⁸ SW1573 (pulmão)⁸ T-47D (mama)⁸ WiDr (colón)⁸	⁸ALMEIDA et al., 2010

1.5 Cultura de tecidos vegetais como fonte de moléculas bioativas

Atualmente, estimativas apontam que mais de 60% das drogas utilizadas na terapêutica do câncer e 75% nos tratamentos de doenças infecciosas são provenientes de fontes naturais (GEORGIEV et al., 2007; 2009). Esses medicamentos, em boa parte dos casos, são constituídos de moléculas que apresentam uma alta complexidade estrutural e por isso, não podem ser produzidas por síntese química (ROBERTS e KOLEWE, 2010). Assim, as reservas vegetais nativas ainda são, em muitos casos, a única fonte de obtenção desses compostos.

No entanto, essas reservas não são inesgotáveis e o extrativismo descontrolado pode causar prejuízos irreversíveis à conservação de espécies de interesse (PLETSCHI, 1998). Não obstante, a conversão de plantas em fármacos, muitas vezes, esbarra na dificuldade de se obter matéria-prima em qualidade e quantidade necessárias para suprir a demanda requerida pelas pesquisas científicas, ou mesmo pela indústria.

Neste contexto, sabe-se que plantas das mais variadas espécies, em condições naturais, sofrem influências ambientais tais como: sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, localização geográfica, entre outros. Fatores estes que podem interferir tanto quali, como quantitativamente no conteúdo de metabólitos de interesse (AZIZ et al., 2007; GOBBO-NETO e LOPES, 2007; SARDAR e KOLE, 2005; SCHLAG e MCINTOSH, 2006).

Pelo exposto, fica evidente que a busca por métodos alternativos, que visem a produção de metabólitos secundários em quantidade e qualidade necessárias, deve ser prioridade nos estudos contemporâneos de química de produtos naturais. Uma ferramenta que tem contribuído para solucionar este problema é a cultura de tecidos vegetais (CARETTO et al., 2004; CHAVAN et al., 2011; RAO e RAVISHANKAR, 2002).

Cultura de tecidos é um termo genérico e refere-se à cultura *in vitro* de células, tecidos, órgãos, embriões e plantas completas, sob condições físicas e químicas rigorosamente controladas. É um processo biotecnológico, no qual fragmentos vegetais (explantes) são selecionados, desinfestados e cultivados em meio nutritivo sob condições assépticas, sendo multiplicados através de sucessivos subcultivos (repicagens) (AMARAL e SILVA, 2003). Em geral, o objetivo desta

técnica é a obtenção de tecidos das células originais, ou seja, genótipos idênticos ao ancestral comum (TORRES et al., 2000).

Teoricamente, uma cultura *in vitro* pode ser iniciada utilizando qualquer parte de um tecido vegetal (segmentos de folhas, de caule, de endosperma, de raiz, entre outros), considerando que as células vegetais podem se proliferar e organizar em qualquer tecido e, eventualmente, em plantas completas. Essa capacidade é denominada totipotência e confere as células a possibilidade de originar um organismo multicelular completo, ou um tecido específico, a partir de estímulo apropriado (provocados por reguladores vegetais presentes no meio de cultura, por exemplo), (CID, 2001; GATTPAGLIA e MACHADO, 1998; KERBAUY, 1997; MANTELL et al., 1994; MROGINSKI e ROCA, 1991).

A tecnologia de cultura de tecidos tem sido utilizada com sucesso na produção de metabólitos secundários (ABREU et al., 2005; CHAVAN et al., 2011; KOLLÁVORÁ, 2004; TOKER et al., 2003; XU et al., 2011). Isso porque culturas de tecidos vegetais com diferentes taxas de crescimento podem apresentar elevada capacidade de sintetizar compostos bioativos (CHAVAN et al., 2011; KIM et al., 2010; LUCZKIEWICZ et al., 2002).

Há uma série de vantagens na produção de produtos naturais a partir de cultura de tecidos e órgãos. Entre elas, destaca-se: 1) a produção de metabólitos de interesse pode ser contínua durante todo o ano, não havendo dificuldades sazonais; 2) o isolamento do composto de interesse é facilitado em comparação com a extração da planta inteira, pela ausência de compostos como clorofila, hidrocarbonetos, entre outros e 3) a produção dos metabólitos secundários de interesse pode ser intensificada pelo uso de fitorreguladores e elicitores (KARUPPUSAMY, 2009; RAO e RAVISHANKAR, 2002; WANG e ZHONG, 2002; LI e LIU, 2003).

Além disso, é importante ressaltar que estudos utilizando matéria-prima advinda de culturas de tecidos já estabelecidas, eliminam potenciais fronteiras políticas e geográficas, problemas que vem dificultando o acesso de pesquisadores a biodiversidade (KARUPPUSAMY, 2009).

Comercialmente, a primeira aplicação de culturas de tecidos vegetais para produção de metabólitos secundários teve início no Japão em 1984 pela Mitsui Petrochemical Industries. A partir de culturas de células de *Lithospermum erythrorhizon* essa empresa produz a chiconina, um corante utilizado em cosméticos

e alimentos (Georgiev et al., 2009). Atualmente, várias indústrias estão utilizando esta técnica, a exemplo da Phyton Biotech que produz o paclitaxel, um potente agente antitumoral, a partir de células indiferenciadas de espécies de *Taxus* spp. (MUFFLER et al., 2011). Outro exemplo que pode ser citado é o da empresa Sumitomo Chemical Industries (Japão) que atualmente produz a escopolamina a partir *Duboisia* spp. (KOLEWE et al., 2008).

Outros produtos naturais produzidos comercialmente por processos biotecnológicos incluem protoberberinas (antibióticos e anti-inflamatórios), ácido rosmarínico (anti-inflamatório), ginseng (suplemento alimentar) e geraniol (antitumoral) a partir de culturas de tecidos de *Coptis japonica*, *Panax ginseng* e *Geramineae* spp., respectivamente (KOLEWE et al., 2008).

Os numerosos compostos produzidos, em escala, através da técnica de cultura de tecidos torna essa ferramenta cada vez mais promissora no sentido de viabilizar terapêuticas a partir de produtos naturais.

1.6 Cultura de células e raízes na produção de triterpenos

Inúmeros estudos relatando produção de triterpenos a partir de técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* têm sido publicados (Tabela 2). Uma das primeiras investigações foi realizada na década de 1970, com cultura de células *in vitro* de *Isodon japonicus* as quais demonstraram produzir triterpenos dos tipos oleanano e ursano (SEO et al., 1975). Outro estudo pioneiro foi realizado com *Glycyrrhiza glabra*, cujas células cultivadas em suspensão biossintetizaram os triterpenos lupanos ácido betulínico, seu precursor lupeol, e a amirina (HAYASHI et al., 1988). Fujioka et al. (1989), identificaram por RMN de ^{13}C , vários saponinas (triterpenos damaranos) em calos de *Panax japonicus*. Culturas de calos de espécies de *Panax*, *P. sikkimensis*, *P. pseudoginseng* e *P. pseudoginseng* produziram triterpenos ginsenosídeos em concentrações de 0,95%, 1,10% e 1,2%, respectivamente em relação ao seu peso seco (MATHUR et al., 1999). Análises em CLAE realizadas em calos de quatro genótipos de *P. ginseng* demonstraram produzir, após um ano de cultivo, nove ginsenosídeos diferentes, porém, apenas cinco destes compostos foram encontrados nos calos cultivados por mais quatro anos. Além disso, os valores de concentração ginsenosídeos após quatro anos diminuíram em média cerca de 70% (RESHETNYAK et al., 2008). Este padrão de

redução tanto na quantidade quanto na variedade de metabólitos secundários é um problema que têm sido relatado em culturas de calos (BOFILL et al. 2002; SAITOK e MIZUKAMI, 2002) e isto se deve, em geral, a instabilidade genética própria de tecidos indiferenciados (MISHIBA et al., 2001; PALOMINO et al., 1999).

Trabalhos relatando produção de triterpenos a partir órgãos cultivados *in vitro*, mais especificamente raízes, também são encontrados na literatura. Strauss et al. (1995), por exemplo, detectaram em culturas de raízes de *Phytolacca acinosa* doze triterpenos (saponinas), entre eles, os esculentosídeos A, B, H, L, R, S, e os fitolacosídeos A, B e F. Análises em CLAE realizadas em raízes de seis espécies de *Gypsophila* cultivadas em meio sólido evidenciaram a presença de 30 saponinas diferentes, sendo que as raízes de *G. elegans* acumularam até 65 mg/g (massa seca) desses triterpenos. Segundo os autores, esses valores elevados de concentração superam os encontrados em raízes de *G. paniculata*, classicamente tidas como melhores produtoras desses compostos (GEVRENOVA et al., 2010).

Além de raízes normais, raízes transformadas geneticamente também são cultivadas *in vitro* para produção de triterpenos. A tabela 2 mostra uma variedade de exemplos de produção de triterpenos utilizando culturas de células indiferenciadas (Células em suspensão ou calos), raízes normais e raízes transformadas.

Com relação a produção de triterpenos quinonametídeos por culturas de tecidos, as pesquisas são escassas. Os primeiros experimentos que relataram produção de quinonametídeos por técnicas biotecnológicas foram realizados com culturas de células suspensas de *Tripterygium wilfordii*, as quais demonstraram acumular o celastrol (KUTNEY et al., 1980, UNITED..., 1982). A maitenina, outro terpeno da classe, foi detectada em culturas de calos de *Maytenus wallichiana* e de *M. molina* (DYMOWSKI e FURMANOWA, 1990; 1992). Células cultivadas em meio líquido de *Catha edulis*, *Maytenus canariensis* e *M. buchananii* produziram, além da maitenina, seu sucessor biossintético 22 β -hidroximaitenina (KUTNEY et al., 1981; OFICINA..., 2011; SATTAR et al., 1998).

Experimentos realizados com cultura de células de *Maytenus ilicifolia*, estabelecidas na presença das auxinas ácido naftaleno acético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), mostraram que maitenina e 22 β -hidroximaitenina foram acumuladas em proporções de 3 e 100 vezes maiores do que a planta cultivada e coletada em seu habitat natural (BULFFA FILHO et al., 2004).

Tabela 2 — Exemplos de culturas de tecidos *in vitro* utilizados na produção de triterpenos.

Espécie	Tipos de cultura	Tipos de triterpenos	Referência
<i>Perilla frutescens</i>	Células em suspensão	Saponinas	WANG et al., 2004
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Células em suspensão	Ursanos	YOON et al., 2000
<i>Calendula officinalis</i>	Células em suspensão	Oleananos	WIKTOROWSKA et al., 2010
<i>Panax notoginseng</i>	Células em suspensão	Saponinas	ZHONG et al., 2005
<i>Calendula officinalis</i>	Células em suspensão	Oleananos	SZAKIEL et al., 2003
<i>Hyssopus officinali</i>	Células em suspensão	Ursanos e oleananos	SKRZYPEK e WYSOKIŃSKA, 2003
<i>Saponaria officinalis</i>	Células em suspensão	Saponinas	FULCHERI et al., 1998
<i>Salvia officinalis</i>	Células em suspensão e Calos	Ursanos	BOLTA et al., 2000
<i>Camptotheca acuminata</i>	Células em suspensão e Calos	Ursanos e oleananos	PASQUA et al., 2006
<i>Centella asiatica</i>	Células em suspensão e Calos	Ursanos	JAMES et al., 2008
<i>Actinidiaceous plants</i>	Calos	Ursanos e oleananos	TAKAZAWA et al., 2002
<i>Actinidia arguta</i>	Calos	Ursanos e oleananos	TAKAZAWA et al., 2002
<i>Actinidia chinensis</i>	Calos	Ursanos e oleananos	TAKAZAWA et al., 2002
<i>Actinidia polygama</i>	Calos	Ursanos e oleananos	TAKAZAWA et al., 2002
<i>Taraxacum officinale</i>	Calos	Ursanos e oleananos	AKASHI et al., 1994
<i>Panax ginseng</i>	Calos	Saponinas	BONFILL et al., 2002
<i>Centella asiatica</i>	Calos	Ursanos	KIONG et al., 2005
<i>Gypsophila paniculata</i>	Raízes normais	Saponinas	FULCHERI et al., 1998

<i>Panax ginseng</i>	Raízes normais	Saponinas	HAN et al., 2006
<i>Primula veris</i>	Raízes normais	Saponinas	OKRŠLAR et al., 2007
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Raízes normais	Saponinas	SHABANI et al., 2009
<i>Panax ginseng</i>	Raízes transformadas	Saponinas	YU et al., 2005
<i>Panax ginseng</i>	Raízes transformadas	Saponinas	SHIM et al., 2010
<i>Acacia victoriae</i>	Raízes transformadas	Saponinas	JOSHI et al., 2002
<i>Panax ginseng</i>	Raízes transformadas	Saponinas	LEE, M. H. et al., 2004
<i>Centella asiatica</i>	Raízes transformadas	Ursanos	KIM et al., 2007
<i>Mitragyna speciosa</i>	Raízes transformadas	Ursanos e oleananos	PHONGPRUEKSAPATTANA et al., 2008
<i>Medicago truncatula</i>	Raízes transformadas	Saponinas	CONFALONIERI et al., 2009

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer metodologia de cultivo e produção de células e/ou órgãos *in vitro* de *Salacia campestris* com vistas à obtenção dos triterpenos quinonametídeos e avaliar a atividade citotóxica destes compostos.

2.2 Específicos

- Analisar, isolar e quantificar os triterpenos quinonametídeos nos sistemas radiculares de *Salacia campestris in natura*;
- Estabelecer protocolo eficiente de cultura de células e/ou órgãos de *S. campestris*;
- Identificar as estruturas moleculares dos triterpenos quinonametídeos por espectrometria de massas (EM);
- Analisar e quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os triterpenos quinonametídeos das culturas de células e/ou órgãos;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos triterpenos quinonametídeos isolados frente às linhagens de células normais 3T3 (fibroblasto) e tumorais HeLa (cólono de útero) e B16-F10 (melanoma murino).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As plantas e sementes de *Salacia campestris*, utilizadas nos experimentos, foram coletadas em fragmentos de Cerrado nos municípios de São Carlos-SP (15 indivíduos) (lat. 22°01'75" long. 47°89'08,3" alt. 857 m), Luziânia-GO (1 indivíduo) (lat. 16°21'02,2" long. 47°50'13,8" alt. 982 m) e Catalão-GO (lat. 20°10'33.9" long. 47°27'29.2" alt. 977 m).

De 15 plantas coletadas em São Carlos, nove foram plantadas em vasos contendo solo do seu habitat natural às quais foram mantidas no Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto-SP. As plantas restantes (6 de São Carlos e 1 de Luziânia) foram utilizadas nos estudos fitoquímicos. As sementes advindas de Catalão foram beneficiadas manualmente e imediatamente utilizadas nos experimentos *in vitro* (n=110) e em casa de vegetação (n=14), sendo este último realizado para obtenção de plantas jovens (1 ano).

Um ramo contendo folhas e órgão reprodutivo foi utilizado para confecção de uma exsicata a qual foi identificada pelo Professor Doutor Julio Antonio Lombardi, curador do Herbário Rioclarense (HRCB) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), campus de Rio Claro, SP. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HMP–UNAERP) sob o voucher 1415.

3.2 Experimentos para obtenção de material vegetal *in vitro*

3.2.1 Condições gerais dos experimentos

Os experimentos conseguintes foram realizados no Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), campus Ribeirão Preto, SP.

O material vegetal utilizado nos experimentos, após ser submetido aos tratamentos de assepsia, passou por uma tríplice lavagem com água destilada e

estéreo em câmara de fluxo laminar antes de ser inoculado em cubetas ou frascos de vidro contendo volumes de 10 e 30 mL, respectivamente de meios de cultura.

Os meios de cultura utilizados nos experimentos foram MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g/L de sacarose e WPM (Woody Plant Medium) (LLOYD e McCOWN, 1980) suplementado com 20 g/L de sacarose. O pH dos meios foram ajustados para 6,0 antes da adição de 2,5 g/L de agente gelificante Phytigel® (em meio semi-sólido) e da autoclavagem, realizada a 120° C em 1,0 atm por 15 min.

Todo material vegetal inoculado foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25° C $\pm$ 2, irradiância de fótons de 20 a 70 mmol/m².s, com fotoperíodo de 16 horas.

3.2.2 Reagentes utilizados

Agente gelificante Phytigel® (Sigma)
Hipoclorito de cálcio [Ca(ClO)₂] (Synth)
Sacarose (Synth)

Reguladores de crescimento

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) (Sigma)
Ácido indolbutírico (AIB) (Vetec)
Ácido naftaleno acético (ANA) (Sigma)
Benzil amino purina (BAP) (Sigma)

Meios de cultura

Murashige & Skoog (MS) (Sigma)
Woody Plant Medium (WPM) (Sigma)

Antioxidantes

Ácido L-ascórbico (Sigma)
Floroglucinol (Vetec)
Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma e Vetec)

Fungicidas

Captan (Orthocide® 500, Arysta LifeScience)

Tiofanato-metílico (Cercobin® 700WP, IHARA)

Bactericidas

Ampicilina (Sigma)

Canamicina (Sigma)

Cefotaxima (Sigma)

Cloranfenicol (Novafarma)

Estreptomicina (Gibcobl)

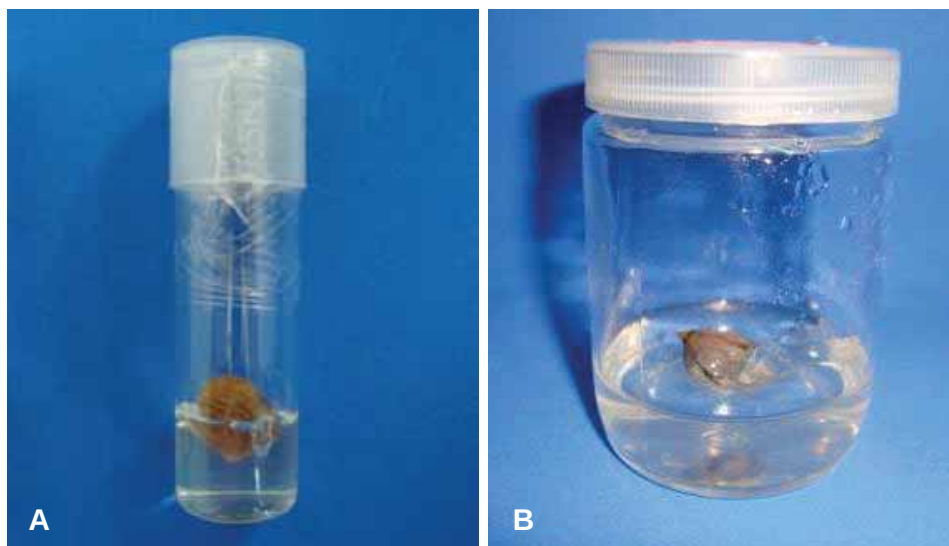
Gentamicina (Novafarma)

3.2.3 Inoculação de sementes

As sementes (n=110) de *S. campestris* foram submetidas ao seguinte processo de assepsia, sob agitação em mesa orbital à 90 rpm:

- Imersão em solução contendo o fungicida captan (0,5% p/v) e os bactericidas ampicilina e cloranfenicol, ambos a 0,05% (p/v) por 55h e posteriormente transferidas para frasco contendo solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (0,5%) por 15 min.

Figura 6 — Sementes de *S. campestris* inoculadas em cubeta (A) e frasco (B) contendo meio de cultura.



Fonte: Arquivo pessoal

- Imersão em solução contendo os fungicidas captan e Cercobin®, ambos a 1,0% (p/v) e os bactericidas canamicina, ampicilina, cefoxima e cloranfenicol,

todos a 0,1% (p/v) por 24h e posteriormente transferidas para frasco contendo solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (0,5%) por 10min.

Após os tratamentos de assepsia, as sementes menores (60) foram inoculadas em cubetas e as maiores (50) em frascos (Figura 6), ambos contendo meio de cultura MS sem adição de sacarose.

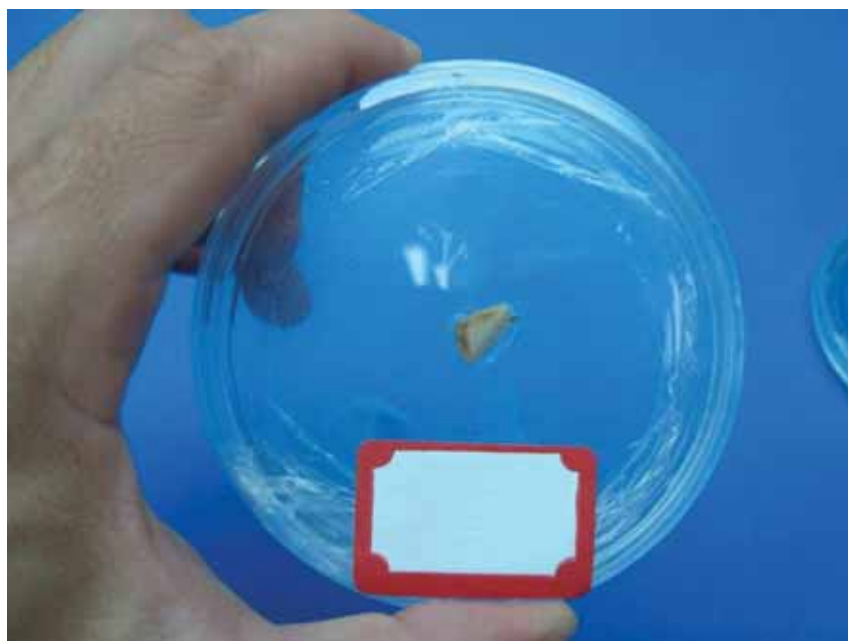
3.2.4 Descontaminação de sementes inoculadas *in vitro*

As sementes submetidas ao procedimento 2 (Seção 3.2.3) de assepsia, que mostraram-se contaminadas após período de 15 dias, foram conduzidas a nova assepsia com a imersão das mesmas em solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (0,5%), permanecendo por 30min. Posteriormente, foram novamente inoculadas em meio de cultura MS.

3.2.5 Obtenção de rizogênese *in vitro*

Endospermas de sementes axênicas, mantidas *in vitro* por 30 dias, foram seccionados em 12 explantes e inoculados em placa de Petri (Figura 7) contendo meio de cultura MS acrescido de 2,4-D (2 mg/L). Os endospermas foram mantidos no escuro por 30 dias e após este período cada explante foi seccionado em duas

Figura 7 — Explante de endosperma de *S. campestris* inoculado *in vitro*.



Fonte: Arquivo pessoal

partes e reinoculados (1/placa) em meios de cultura MS e WPM, ambos acrescidos de PVP (100 mg/L), com diferentes auxinas em concentrações variadas no qual permaneceram em condição de escuro por 30 dias. Após esse período, o material vegetal foi transferido para placas com meio WPM suplementado com AIB (4,0 mg/L) e novamente mantidos no escuro. Os explantes mantidos nesta última condição foram repicados a cada 30 dias, por quatro meses, até a obtenção de 118 explantes.

Folhas oriundas de semente germinada (Figura 8) foram seccionadas em quatro explantes, os quais foram inoculados em meio de cultura WPM acrescido de AIB (4 mg/L) e PVP (100 mg/L), os quais foram mantidos em condições de escuro.

Figura 8 — Planta de *S. campestris* obtida a partir de semente germinada *in vitro*.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.6 Determinação da curva de crescimento de raízes produzidas *in vitro*

Raízes produzidas *in vitro* pesando $\approx 1,0$ g (Figura 9) foram inoculadas em frascos de vidro contendo meio WPM (15 mL) acrescido de AIB (4,0 mg/L) e PVP (100 mg/L), no qual foram mantidas na ausência de luz. O delineamento experimental foi inteiramente casualidade com três repetições de quatro replicatas

por avaliação, as quais foram realizadas aos 0, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias de cultivo.

Os parâmetros avaliados nesse experimento foram: acúmulo de biomassa fresca e seca, e a concentração dos metabólitos de interesse (TQs).

Figura 9 — Raízes de *S. campestris* obtidas *in vitro*.



Fonte: Arquivo pessoal

3.2.7 Obtenção de células em suspensão

Raízes obtidas *in vitro* a partir do cultivo de endosperma medindo $\approx 2,0 \text{ cm}^3$, foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo meio WPM líquido (150 mL) suplementado com AIB (4,0 mg/L), acrescido de PVP (100 mg/L). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob agitação em mesa orbital a 100 rpm, protegidos da luz. Este material foi repicado cinco vezes a cada 30 dias e após este período as raízes foram transferidas para outros recipientes cujas células em suspensão foram decantadas em tubo de ensaio. Após este procedimento, o meio de cultura excedente foi retirado com auxílio de pipeta automática e em seguida, foi adicionado sobre as células meio de cultura WPM líquido acrescido de PVP (100 mg/L) e suplementado com ANA ou 2,4-D em concentrações de 2,0 e 4,0 mg/L para cada regulador. O volume de meio de cultura adicionado foi quatro vezes superior ao da massa celular.

3.2.8 Assepsia de folhas e ramos

Folhas com e sem a nervura central e pecíolos, com aproximadamente 1,0 cm² e 1,0 cm de comprimento respectivamente, foram retirados das plantas mantidas nos vasos em casa de vegetação, e submetidos ao seguinte processo de desinfestação sob agitação em mesa orbital à 90 rpm:

- Imersão em solução contendo captan e Cercobin®, ambos a 1,0% (p/v) e canamicina, cloranfenicol, ampicilina, cefotaxima a 0,1% (p/v) cada por 24 h e posteriormente transferidas para frasco contendo solução de Ca(ClO)₂ (0,5 %) por 30 min;
- Imersão em solução contendo captan a 2,0% (p/v) e canamicina, cloranfenicol, ampicilina, cefotaxima a 0,1% (p/v) cada por 24 h e posteriormente transferidas para frasco contendo solução de Ca(ClO)₂ (0,5%) por 30 min;
- Imersão em solução contendo Cercobin®, a 2,0% (p/v) e canamicina, cloranfenicol, ampicilina, cefotaxima a 0,1% (p/v) cada por 24h e posteriormente transferidas para frasco contendo solução de Ca(ClO)₂ (0,5%) por 30 min.

Em seguida, os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo meio semi-sólido MS suplementado com a auxina 2,4-D (2,0 mg/L), acrescido de PVP (100 mg/L). Cada grupo foi composto de três repetições com cinco replicatas (5/placa), divididos em três tratamentos, no qual cada tratamento foi uma fonte de explante. Uma placa de cada tratamento foi mantida no escuro.

3.2.9 Introdução de explantes para propagação *in vitro*

Experimento 1

Gemas axilares medindo aproximadamente 1,0 cm de comprimento (n=30), oriundas de plantas adultas mantidas em vasos, foram lavadas com água corrente e detergente e posteriormente foram imersas, por 24 h, em solução asséptica contendo os fungicidas captan e Cercobin®, ambos 1,0% (p/v), e os antibióticos canamicina, ampicilina e cloranfenicol a 0,1% (p/v) cada. Posteriormente, foram imersas em solução de Ca(ClO)₂ (0,5%), permanecendo por mais 15 min. Em seguida, os explantes foram inoculados em cubetas contendo meio de cultura MS.

Experimento 2

Plantas de *S. campestris* mantidas nos vasos foram pulverizadas durante 15 dias (em dias alternados) com solução asséptica contendo os fungicidas captan e Cercobin®, ambos 1,0% (p/v) e os antibióticos canamicina, ampicilina, cefotaxima e cloranfenicol a 0,1% (p/v) cada. Ao fim do período, brotos recém-formados foram retirados dos vasos e individualizados em microestacas (contendo 1 gema) com aproximadamente 1,0 cm de comprimento que em seguida foram imersos na mesma solução asséptica utilizada na pulverização, no qual permaneceram por 1 h. Após, foram imersos em solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (0,5%) (pH aferido para 5,0) por mais 10 min. Por fim, foram inoculados em cubetas contendo meio de cultivo MS.

3.3 Estudos fitoquímicos

3.3.1 Condições gerais dos experimentos

Os experimentos conseguintes foram realizados no Departamento de Química Orgânica deste Instituto (UNESP – IQAr), exceto a preparação dos extratos vegetais, os quais foram realizados no Departamento de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), campus Ribeirão Preto, SP.

3.3.2 Solventes e reagentes utilizados

Solventes

Diclorometano e etanol (Synth®, grau analítico)

Hexano, acetato de etila e metanol (obtidos no Instituto de Química)

Metanol (J. T. Baker® e Tedia®, grau CLAE)

Água ultrapura (preparada em sistema Mili-Q)

Reagentes

Ácido acético e ácido fórmico (Synth®)

3.3.3 Beneficiamento do material vegetal e preparação dos extratos vegetais

Plantas coletadas em São Carlos-SP

As seis plantas restantes da coleta foram separadas em parte aérea e sistema radicular. Os sistemas radiculares, por sua vez, foram lavados com água e detergente e separados em casca, entrecasca e cerne (Figura 10). Posteriormente, as partes foram secas em estufa de ar circulante a 40° C por 48 h e em seguida trituradas em moinho de facas.

Figura 10 — Partes do sistema radicular de *S. campestris*



Fonte: Arquivo pessoal.

Os extratos vegetais das três partes do sistema radicular de *S. campestris*, foram obtidos por maceração estática (5 dias), em temperatura ambiente, utilizando solventes orgânicos em volume duas vezes superior ao de matéria seca. A extração foi realizada com EtOH (2 vezes), resultando nos extratos de casca (CA-EtOH), entrecasca (EC-EtOH) e cerne (CE-EtOH) e em posteriormente, com DCM (da torta por duas vezes), resultando nos extratos de casca (CA-DCM), entrecasca (EC-DCM) e cerne (CE-DCM). Após, os sobrenadantes foram filtrados filtro em papel, concentradas em evaporador rotativo à 40° C e secos em capela de exaustão.

Plantas mantidas em vasos

De duas plantas de *S. campestris* mantidas em vasos na UNAERP foram retiradas as cascas dos sistemas radiculares as quais foram secas em estufa de ar circulante a 40° C por 48h e trituradas em moinho de facas. Posteriormente, esse material foi submetido à extração por sonicação (3 vezes de 20 min), em temperatura ambiente, utilizando como solvente extrator DCM, em volume duas vezes superior ao de material vegetal, resultando no extrato CA1-DCM.

Planta coletada em Luziânia -GO

O sistema radicular da planta de *S. campestris* oriunda da coleta realizada em Luziânia, foi lavada com água e detergente e posteriormente seca em estufa de ar circundante a 40° C por 24 h. Após, o material foi triturado em moinho de facas e pulverizado com uso de gral e pistilo, sob nitrogênio líquido.

O extrato do sistema radicular inteiro foi obtido por sonicação (3 vezes de 20 min) à temperatura ambiente, utilizando DCM como solvente extrator em proporção 2:1 (v:v, solvente:material vegetal). O extrato resultante foi RN-DCM.

Plantas jovens (1 ano) e raízes obtidas *in vitro*

Sistemas radiculares de plantas de *S. campestris* com 1 ano de idade (Figura 11), obtidas a partir de sementes germinadas em casa de vegetação, e raízes obtidas *in vitro*, foram secas em estufa de ar circundante a 40° C por 24h e pulverizadas com uso de gral e pistilo, sob nitrogênio líquido. A extração desse material foi realizada por sonicação (3 vezes de 20 min) à temperatura ambiente, utilizando DCM como solvente na proporção 2:1 (v:v, solvente:material vegetal). As extrações foram realizadas em triplicata e os extratos resultantes foram RV-DCM (raízes obtidas *in vitro*) e RPJ-DCM (plantas jovens).

Figura 11 — Planta jovem (1 ano de idade) de *S. Campestris*



Fonte: Arquivo pessoal.

3.3.4 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As análises qualitativas foram realizadas em cromatoplasacas de alumínio impregnadas com sílica gel (250µm de espessura) (Whatman AL SIL G/UV), em temperatura ambiente, utilizando-se cuba cromatográfica apropriada previamente saturada com o vapor da fase móvel utilizada. As amostras e padrões foram dissolvidos em acetato de etila e aplicadas em placa e eluídas utilizando como fase móvel Hex:AcOEt (7:3).

3.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.3.5.1 Preparação das amostras (*Clean-up*)

As amostras de interesse (extratos ou frações) (10 mg) foram solubilizadas em MeOH:H₂O (95:05) (1 mL) e aplicadas em cartucho de sílica gel de fase reversa (SampliQ C18 500 mg/ 3 mL, Agilent®), previamente ativado com 3 mL de MeOH e equilibrado com 3 mL de MeOH:H₂O (95:05). Em seguida, as amostras foram eluídas com 3 mL de MeOH:H₂O (95:05), secas em capela de exaustão e posteriormente ressuspensas em MeOH ou MeOH:H₂O (80:20). Os analitos então foram filtrados em filtro de membrana (0,22 µm) e injetados em CLAE.

3.3.5.2 Equipamentos, colunas e parâmetros utilizados

CLAE analítico

Cromatógrafo (A): Shimadzu, equipado com sistema binário de bombas LC-GAD, detector por arranjo de diodos SPD-M20A, injetor automático SIL-10A e sistema controlador CBM-20A. Os dados foram adquiridos via software LC Solution®.

Cromatógrafo (B): Shimadzu, equipado com sistema binário de bombas LC-20 AT, detector por arranjo de diodos SPD-M20A, degaser DGU- 20A3, injetor automático SIL-20A, forno de coluna CTO-20 e sistema controlador CBM-20A. Os dados foram adquiridos via software LC Solution®.

Coluna analítica: Phenomenex® C18 Luna (250 x 4,6 mm) com partículas de 5 µm.

Modo (M1): Isocrático, fase móvel MeOH:H₂O (80:20); concentração da amostra de 0,67 mg/mL; volume de injeção de 30 µL; fluxo de 1 mL/min; tempo de análise de 50 min; comprimentos de onda das análises na faixa de 200–800 nm, sendo os cromatogramas plotados em 254 e 420 nm.

Modo (M2): Isocrático, fase móvel MeOH:H₂O (85:15); concentração da amostra de 0,67 mg/mL; volume de injeção de 20 µL; fluxo de 1 mL/min; tempo de análise de 30 min; comprimentos de onda das análises na faixa de 200 – 800 nm, sendo os cromatogramas plotados em 254 e 420 nm.

Modo (M3): Isocrático, fase móvel MeOH:H₂O (70:30); concentração da amostra de 0,67 mg/mL; volume de injeção de 20 µL; fluxo de 0,8 mL/min; tempo de análise de 30 min; comprimentos de onda das análises na faixa de 200 – 800 nm, sendo os cromatogramas plotados em 254 e 420 nm.

Modo (M4): Isocrático, fase móvel MeOH:H₂O: (80:20) (0,1% ác. fórmico); concentração da amostra de 0,50 mg/mL; volume de injeção de 20 µL; fluxo de 1,0 mL/min; tempo de análise de 25 min; comprimentos de onda das análises na faixa de 200 – 800 nm, sendo os cromatogramas plotados em 420 nm.

CLAE preparativo

Cromatógrafo (C): Varian Star Dynamax, modelo 320, com sistema ternário de bombas equipado com detector UV-Vis. Os dados foram adquiridos a partir do software Varian Star Chromatography Workstation.

Coluna semi-preparativa: Phenomenex® C18 Luna (150 x 21,5 mm) com partículas de 5 µm.

Modo (M5): Isocrático, fase móvel MeOH:H₂O (85:15); concentração da amostra de 6,0 mg/mL; volume de injeção de 1,0 mL; fluxo de 10 mL/min; tempo de análise de 25 min; comprimento de onda das análises em 254nm.

Modo (M6): Isocrático, fase móvel MeOH:H₂O (90:10) (0,1% HAc); concentração da amostra de 4,0 mg/mL; volume de injeção de 1,0 mL; fluxo de 10 mL/min; tempo de análise de 20 min; comprimento de onda das análises em 254nm.

Modo (M7): Isocrático, fase móvel MeOH:H₂O (75:25) (0,1% HAc); concentração da amostra de 10,0 mg/mL; volume de injeção de 1,0 mL; fluxo de 10 mL/min; tempo de análise de 26 min; comprimento de onda das análises em 254nm.

3.3.6 Análises por espectrometria de massas (EM)

3.3.6.1 Preparo das amostras para análise via EM

As amostras analisadas no espectrômetro de massas foram preparadas como descrito no item 1.3.5.6, porém, foram diluídas em MeOH na concentração de 1 ppm (1 µg/mL).

3.3.6.2 Espectrômetro e condições das análises

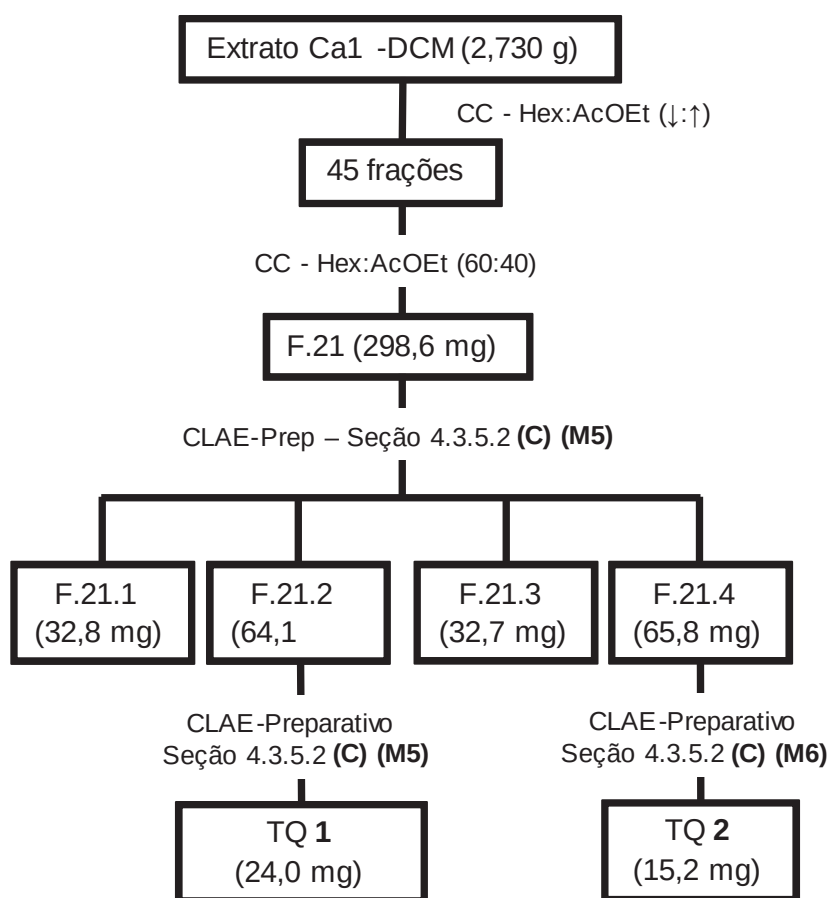
As análises de espectrometria massas foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo® equipado com um dispositivo de inserção direta de amostras, via análise por injeção em fluxo contínuo. As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por electrospray (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI). As fragmentações em múltiplos estágios (EM², EM³, EMⁿ) foram realizadas em uma interface do tipo “ion-trap” (IT). A geração dos espectros de massas em primeira-ordem (EM), bem como os de múltiplos estágios (EMⁿ), foi realizado em modo positivo com N₂ como gás nebulizador.

3.3.7 Isolamento dos triterpenos quinonametídeos

O extrato Ca1-DCM (2,730 g) foi submetido a um fracionamento por cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel (36 x 3,0 cm, 50g) com partículas de 60-200 µm (Acrös Organics) e como fase móvel, Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade. O procedimento cromatográfico produziu 45 frações as quais foram analisadas por CCDC e CLAE analítico (Seção 3.3.5.2 **(A)**

(M1)). A fração 21 (F.21), eluída no sistema solvente Hex:AcOEt (60:40), foi submetida a CLAE preparativo (Seção 3.3.5.2 **(C)** **(M5)**) no qual produziu quatro subfrações (F.21.1, F.21.2, F.21.3 e F.21.4). A subfração F.21.2 e a F.21.4 foram submetidas novamente a purificação por CLAE preparativo (Seção 3.3.5.2 **(C)** **(M5)**), resultando nos TQs **1** e **2**. O esquema 2 resume o processo.

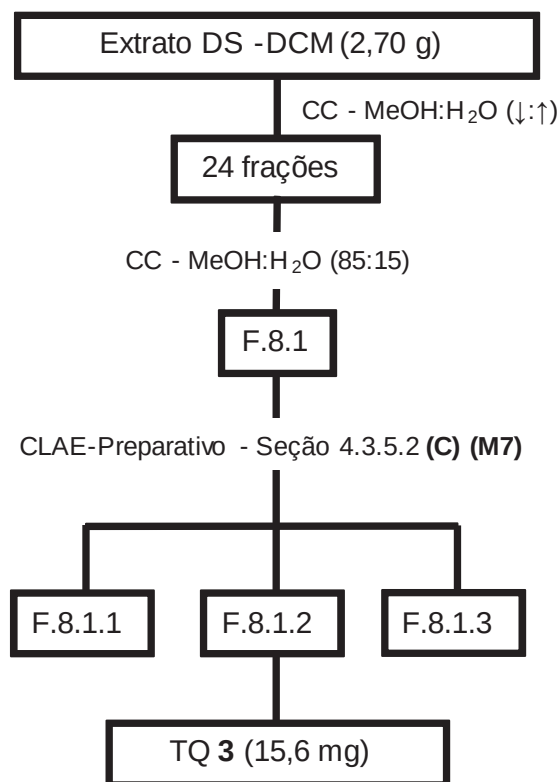
Esquema 2 — Isolamento dos triterpenos quinonametídeos **1** e **2** a partir do extrato Ca1-DCM de *S. campestris*.



Um extrato diclorometânico de cascas de sistema radicular de *Salacia campestris* (Extrato DS-DCM) (2,70 g), obtido em nosso grupo de pesquisa (SANTOS, 2010), foi submetido a um fracionamento por cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel de fase reversa (C-18) (31,5 x 3,5 cm, 170 g) e como fase móvel, MeOH:H₂O em gradiente crescente de polaridade. O procedimento cromatográfico produziu 24 frações as quais foram analisadas por CCDC e CLAE analítico (Seção 3.3.5.2 **(A)** **(M1)**). A fração 8 (F.8.1), eluída no sistema solvente MeOH:H₂O (85:15), foi submetida a CLAE preparativo (Seção

3.3.5.2 **(C) (M7)**) no qual produziu três subfrações (F.8.1.1, F.8.1.2 e F.8.1.3). A subfração F.8.1.2 resultou no TQ **3**. O esquema 3 resume o processo.

Esquema 3 — Isolamento do triterpeno quinonametídeo **3** a partir do extrato DS-DCM de *S. campestris*.



3.3.8 Determinação quantitativa dos triterpenos quinonametídeos por CLAE-DAD

Preparação dos padrões e da curva de calibração

Os padrões cromatográficos utilizados nas análises quantitativas foram o TQ **1** e **2**, sendo o TQ **1** utilizado para a quantificação do mesmo e do TQ **3** e o TQ **2**, para quantificação do mesmo, ambos provenientes do isolamento e purificação realizados (Seção 4.3.7).

O método utilizado na quantificação foi o de padronização externa, que consistiu na construção de curvas analíticas para cada padrão. Para a construção desta, preparou-se duas soluções estoque, diluindo-se 1 mg de padrão em 1mL de MeOH:H₂O (95:05) e a partir destas foi preparada uma solução de trabalho (5 mL), contendo a mistura dos padrões, na concentração de 50 µg/mL. A partir da solução

de trabalho, foram preparadas seis soluções (1,5, 2,0 5,0, 10, 15 e 35 µg/mL) as quais foram injetadas em CLAE (Seção 3.3.5.2 **(B) (M4)**) em triplicata.

A partir dos parâmetros analíticos obtidos das curvas foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) pelo método IUPAC: $LD = 3,3 \times \frac{DP}{a}$ e $LQ = 10 \times \frac{DP}{a}$, em que **DP** é o desvio padrão de resposta e **a**, a inclinação da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Tratamento e análise dos extratos

Os extratos RPJ-DCM (sistema radicular de plantas jovens, com 1 ano de idade), RN-DCM (sistema radicular de planta coletada em Luziânia-GO) e RV-DCM (raízes obtidas *in vitro*) com 0, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias de cultura, foram pré-tratados por extração em fase sólida como segue: 2,5 mg dos extrato foram dissolvidos em 1 mL de MeOH:H₂O (95:05), e aplicados em cartucho de sílica gel de fase reversa (Sampli C18 500 mg/ 3 mL, Agilent®), previamente ativado com 3 mL de MeOH e equilibrado com 3 mL de MeOH:H₂O (95:05). As amostras foram eluídas com 3 mL do mesmo solvente usado na diluição, sendo os volumes dos eluatos ajustados para 5 mL em balão volumétrico. Os analitos foram então filtrados em filtro de membrana (0,22 µm) e injetados em CLAE (Seção 3.3.5.2 **(B) (M4)**) em duplicata.

3.4 Ensaios citotóxicos *in vitro*

3.4.1 Condições gerais dos experimentos

Os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados no Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), campus Ribeirão Preto, SP.

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios foram as de célula normal 3T3 (fibroblasto), cedida pela Prof^a. Dr^a. Enilza Espreafito da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), e tumorais HeLa (carcinoma de colo de útero) e B16-F10 (melanoma murino), ambas cedidas pelo Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa-Neto da FMRP-USP.

Todos os ensaios em cada linhagem celular foram realizados três vezes (inter-dias) em triplicata, sendo os resultados expressos em IC₅₀, concentração

inibitória que representa a quantidade de substância citotóxica necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular

3.4.2 Meios de cultura, reagentes, equipamentos e antibióticos utilizados

Meio de cultura HAM F10 (LGC Biotecnologia)

Meio de cultura DMEM (Dulbelcos Eagle Medium) (Gibco)

Soro fetal bovino (Cultilab)

Solução de Hanks (Cultilab)

Tripsina (Sigma)

DMSO P.A. (Sigma).

Solução de MTT (Sigma)

Espectrofotômetro (Biotek ELx 800)

Paclitaxel (Parenta)

Doxorrubicina (Sigma).

3.4.3 Preparação das amostras para os ensaios

Duas soluções estoque na concentração de 1 mg/mL foram preparadas a partir dos triterpenos quinonametídeos maitenina e netzualcoieno, utilizando-se como solvente DMSO. A partir destas foram pipetadas alíquotas que foram utilizadas na preparação de soluções aquosas nas concentrações de 50, 20, 16, 8, 4 e 2 µg/mL, as quais foram bioensaiadas.

Os compostos citotóxicos utilizados como controle foram paclitaxel e doxorrubicina, ambos foram ensaiados nas concentrações de 4 e 2 µg/mL.

Para o controle positivo foi utilizado como veículo DMSO a 0,8% (v:v).

3.4.4 Cultivo das linhagens celulares

Para o cultivo das linhagens tumorais HeLa e B16-F10 os meios de cultura utilizados foram, respectivamente, DMEM e HAM F10, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino. Para a linhagem de célula normal 3T3 foi utilizado uma mistura composta pelos dois meios de cultura, HAM F10 (10,2 g/L) e DMEM (10,4 g/L), suplementada com 10% de soro fetal bovino. A manutenção das linhagens

celulares foi realizada em estufa de CO₂ circulante (5%) a 37° C, sendo as culturas repicadas a cada 3 ou 4 dias.

Após a formação de confluência celular (aproximadamente 90%), o meio de cultura das células foi retirado da garrafa de cultivo e nela foi adicionado imediatamente 10 mL de solução de Hanks, o qual permaneceu em contato com as células por 5 min. Após o período, a solução de Hanks foi retirada da garrafa e sobre a cultura foi adicionada uma solução de tripsina a 0,25%, a qual permaneceu em contato com as células por 1-2 min. Após, células aderidas a superfície da garrafa de cultivo foram desprendidas realizando-se movimentos bruscos com as garrafas.

Após o desprendimento completo das células da superfície da garrafa, foi adicionado a mesma meio de cultura apropriado. Este foi então centrifugado por 5 min a 2500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o *pelet* resultante foi ressuspenso em 3 mL de meio de cultura, formando-se uma solução celular.

As células desta solução foram contadas em Câmara de Neubauer e, após sucessivas diluições, preparou-se a solução celular de 10⁵ células/100 µL. Alíquotas de 100 µL da solução celular foram adicionadas (1/poço) nas placas de 96 poços. Em cada poço foi adicionado mais 100 µL de meio de cultura próprio para cada linhagem e em seguida, a placa foi inoculada em estufa de CO₂ circulante (5%) a 37° C, por 24 h. Decorrido o período, os meios de cultura dos poços foram substituídos por meios frescos (100 µL). Em seguida, foram adicionados nos poços as soluções de teste, de controle e de controle do veículo. As placas de ensaios e controle positivo (contendo apenas as culturas) foram novamente inoculadas em estufa de CO₂ circulante (5%) a 37° C por mais 72 h. Decorrido o período as células foram submetidas a avaliação de viabilidade celular pelo método MTT.

3.4.5 Ensaio da viabilidade celular pelo método MTT

Decorrido período de 72 h de incubação, foram adicionados aos poços 20 µL de solução MTT (5mg/mL em Hanks). Novamente as placas encubadas em estufa por mais 4 h. Após, as placas foram centrifugadas por 5 min à 2500 rpm e todo líquido contido nos poços foi retirado. Aos poços foram adicionados 200 µL de DMSO e imediatamente a viabilidade celular das células foi determinada utilizando-se espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda de 550 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento do sistema *in vitro*

4.1.1 Assepsia e germinação das sementes

Problemas de contaminação são frequentes ao se utilizar materiais provenientes do campo na propagação *in vitro*, mesmo quando se realiza uma assepsia prévia, principalmente em explantes advindos de raízes e tubérculos (BARRUETO CID e ZIMMERMANN, 2006). Desta forma, vários experimentos devem ser realizados para se determinar o melhor método de assepsia.

De maneira geral, todos os tratamentos de desinfestação realizados com as sementes não foram eficientes em eliminar a contaminação superficial e endógena das mesmas. A contaminação das sementes, ocasionada por fungos foi de 19,63% e a bacteriana de 41,12%. A presença de microrganismos endofíticos ou não nas sementes sofre influência de diversos fatores, dentre eles, o estágio de maturação (relacionado ao maior ou menor teor de água), a origem do material (se é de campo ou laboratório), habito de crescimento (lenhosas são mais propícias), dentre outros (TEIXEIRA, 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

A taxa de germinação *in vitro* das sementes de *S. campestris*, em 6 meses, foi de 12,15%, sendo que a maioria destas (76,93%) apresentou somente protrusão radicular sem abertura de cotilédones. O índice de germinação foi baixo quando comparado com os dados obtidos em experimento em casa de vegetação cuja porcentagem foi de 63,9 ($\pm 4,5$), com início da germinação aos 45 dias (dados não mostrados).

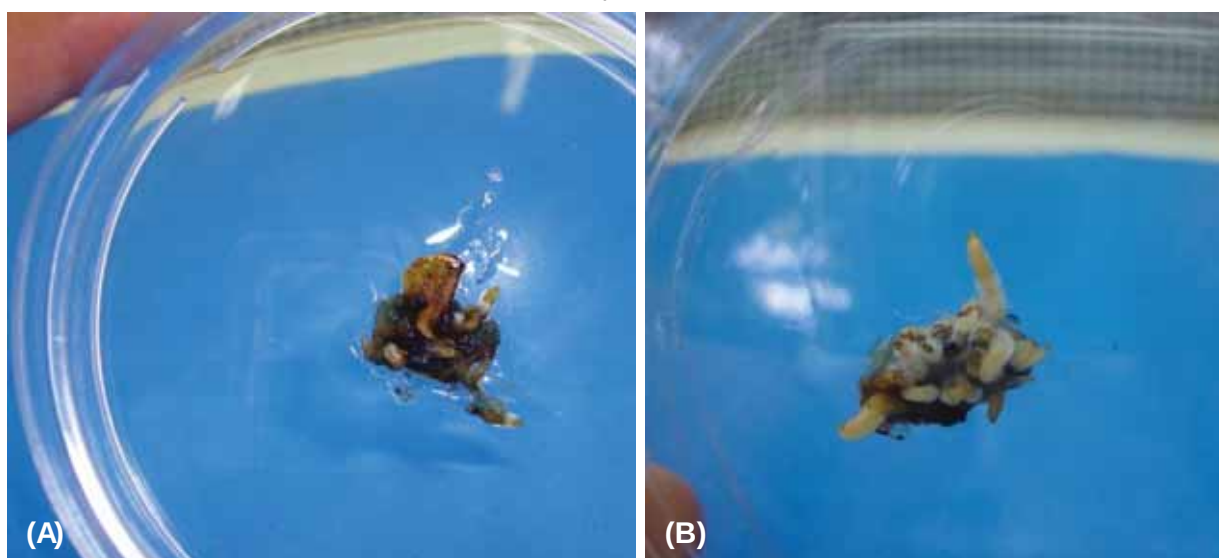
Quando a parte do tegumento foi retirada da semente houve um favorecimento da germinação, porém, o desenvolvimento da parte aérea foi lento e não houve emissão radicular. O tegumento da semente de algumas espécies pode dificultar a permeabilidade de H_2O e/ou difusão de O_2 , portanto a remoção deste pode facilitar a embebição de H_2O e/ou a entrada de O_2 o que acelera o processo germinativo, isto tem sido demonstrado para algumas sementes de espécies medicinais do Cerrado, tais como *Pterodon pubescens*, *Eugenia dysenterica* e *Brosimum gaudichaudii* (COELHO, et al., 2001; SALES et al., 2002; SILVA, 2003; MARTINOTTO, et al., 2007).

Pelos resultados apresentados, é possível inferir que as sementes de *S. campestris* são dormentes e também apresentam baixa ou mediana taxa de germinação, quando comparada com a maioria das espécies medicinais do Cerrado (SALOMÃO et al., 2003). De modo geral, as sementes que germinam no período de quatro semanas ou menos são consideradas não dormentes, enquanto aquelas que exigem mais do que quatro semanas são consideradas dormentes (BASKIN e BASKIN, 2005).

4.1.2 Obtenção de calos e rizogênese

Os endospermas mantidos 30 dias em meio MS com 2,4-D (2,0mg/L), apresentaram início de produção de calos. Entretanto, estes não se proliferam e apresentaram oxidação. Estes mesmos explantes ao serem transferidos para meio de cultura MS ou WPM suplementados com o antioxidante PVP e diferentes concentrações de auxinas promoveram a rizogênese sem oxidação dos tecidos. O meio WPM acrescido de 4,0 mg/L de AIB e 100 mg/L de PVP apresentou ser o mais promissor para a obtenção de raízes *in vitro* (Figura 12).

Figura 12 — Raízes oxidadas (A) e não oxidadas (B) obtidas *in vitro* a partir de endosperma de *S. campestris*

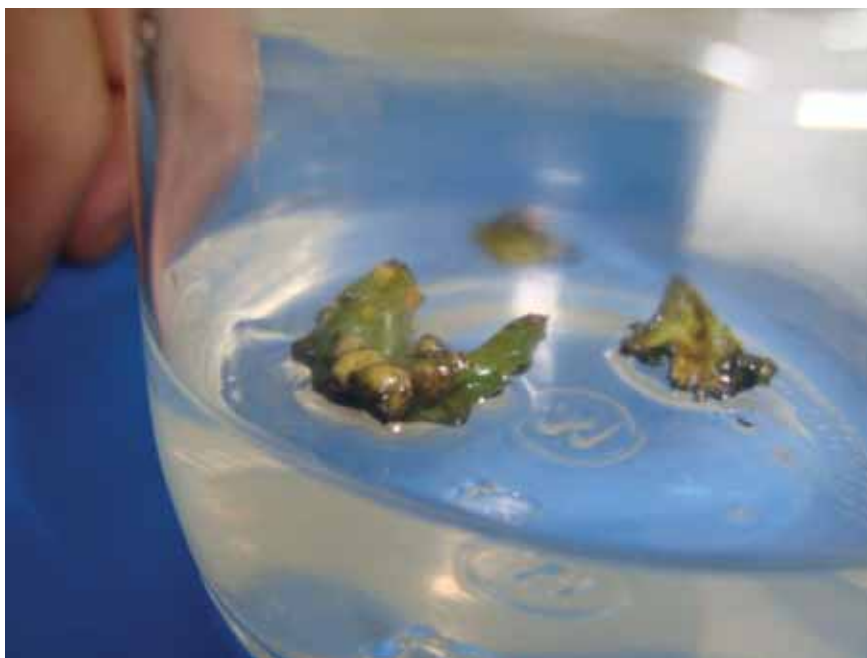


Fonte: Arquivo pessoal.

Explantes foliares inoculados em meio WPM acrescido de AIB (4,0 mg/L) e PVP (100 mg/L), mantidos por 20 dias, também apresentaram início de formação de

raízes (Figura 13). No entanto, após período de 15 dias, essas raízes apresentaram contaminação (provavelmente endógena) e necrosaram.

Figura 13 — Raiz de *S. campestris* obtida *in vitro* a partir de endosperma apresentando oxidação fenólica (A) e apresentando oxidação fenólica controlada (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

A calogênese assim como a rizogênese são eventos morfofisiológicos influenciados pela composição do meio, tipo de regulador e concentração, pela fonte de explantes, dentre outros (ROCHA e QUOIRIN, 2004; BRUNETTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

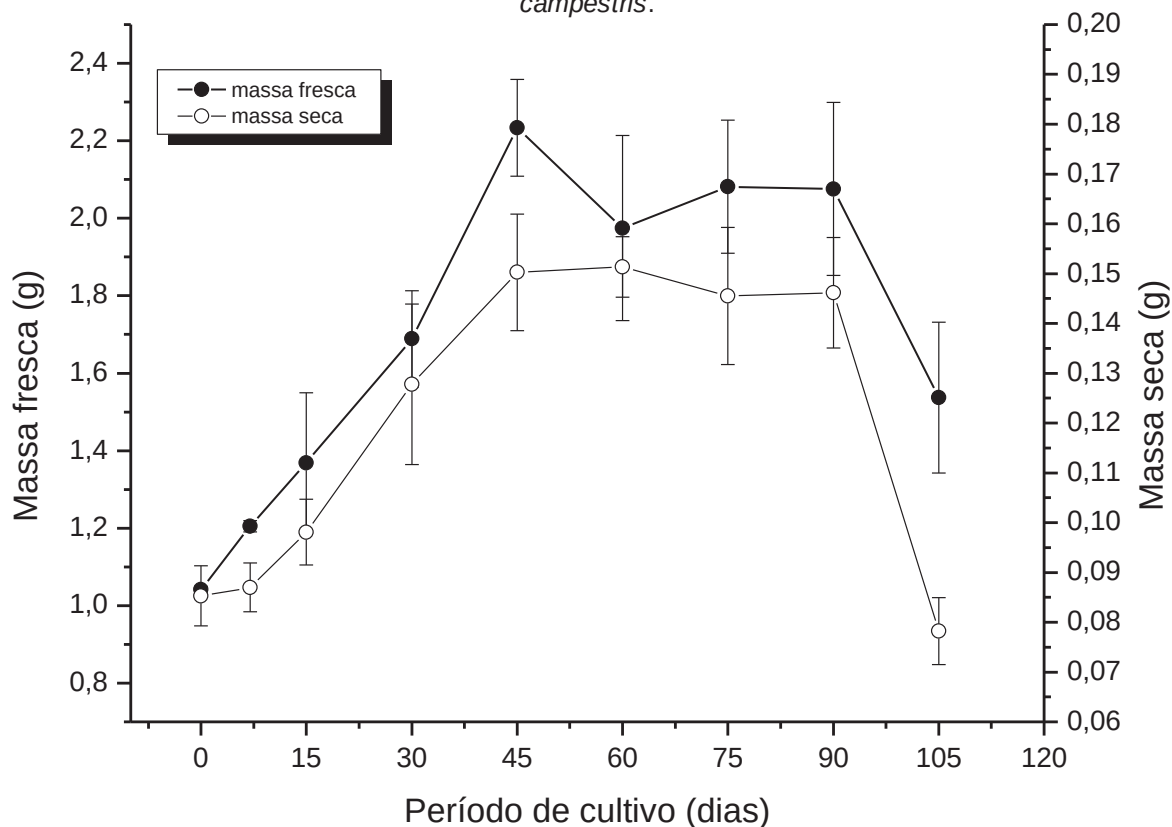
A realização das análises cromatográficas comprovou a presença de triterpenos nas raízes formadas *in vitro* a partir de tecidos do endosperma, alcançando assim o primeiro objetivo do projeto de pesquisa proposto. Os resultados obtidos *in vitro* mimetizaram o que ocorre sob condições naturais, ou seja, a produção de triterpenos quinonametídeos (MONACHE et al., 1972; CORSINO et al., 2000; CARVALHO et al., 2005).

4.1.3 Determinação da curva de crescimento de raízes produzidas *in vitro*

O acúmulo de biomassa das raízes de *S. campestris* obtidas a partir de endosperma cultivadas *in vitro* dobrou aos 45 dias de cultura e manteve-se estável

até o nonagésimo dia de cultivo e a partir deste período foi observada a fase de declínio e morte celular (Figura 14).

Figura 14 — Acúmulo de massa fresca e seca em função do tempo de cultivo *in vitro* de raízes de *S. campestris*.



4.1.4 Obtenção de células em suspensão

Células em suspensão foram observadas a partir das raízes mantidas em meio WPM líquido acrescidos de AIB (4,0 mg/L) (Figura 15). No entanto, a divisão celular aparentou-se estática no referido meio de cultura. A utilização de ANA e 2,4-D nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg/L, promoveram indistintamente a proliferação celular. Ainda não foi possível a obtenção de massa celular suficiente para a realização de curva de crescimento, bem como da interferência destes reguladores na composição e/ou quantidade dos triterpenos quinonametídeos. Contudo, experimentos futuros poderão ser realizados a fim de dar continuidade aos estudos de produção *in vitro* dos TQs produzidos a partir de *S. campestris*.

Figura 15 — Células de *S. campestris* em suspensão.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.1.5 Assepsia de folhas, pecíolos e gemas

A assepsia realizada nos explantes oriundos de folhas e pecíolos não foi eficiente, tendo em vista que houve contaminação exógena e também endógena. Além disso, estes tecidos apresentaram oxidação fenólica, o que foi controlado pelo uso do antioxidante PVP, no meio de cultura e pela manutenção dos mesmos em condição de escuro.

A oxidação fenólica ocorre devido à ação da enzima polifenol oxidase que tem sua atividade estimulada pela presença de luz e está diretamente relacionada a fatores como genótipo e tipo e idade do explante. Desta maneira, é recomendado para várias espécies a manutenção dos explantes no escuro, bem como manipular o material na ausência de luz (TEIXEIRA, 2001; BASSAN et al., 2006; FLORES et al., 2006; SOUZA, J. A. et al., 2006).

Os explantes extraídos de folhas e pecíolos, cujas matrizes foram pré-tratadas com substâncias antimicrobianas, não apresentaram qualquer sinal de contaminação, entretanto, também não produziram calos na presença de 2,0 mg/L de 2,4-D e necrosaram após terem sido mantidos 30 dias sob condição *in vitro*.

A assepsia utilizada em gemas axilares não foi eficiente quanto à eliminação da contaminação superficial. Além da contaminação, ocorreu também oxidação fenólica que promoveu a necrose dos explantes. De modo geral fontes de explantes advindos de plantas adultas apresentam alta incidência de contaminação exógena e endógena, o que dificulta a introdução de tecidos especializados sob condição *in vitro* (TEIXEIRA, 2001; NOLETO e SILVEIRA, 2004; CARVALHO et al., 2006; SOUZA, F. V. D. et al., 2006).

Explantes provenientes de plantas adultas mantidas em casa de vegetação, previamente fitosanitizadas com antimicrobianos, mostrou efetividade quanto a assepsia. Entretanto, apesar da eficiência do processo de assepsia os explantes não sobreviveram nas condições *in vitro*, devido à oxidação e/ou necrose dos mesmos. Embora haja inúmeros exemplos na literatura de sucesso de introdução de explantes retirados de plantas adultas pré-tratadas com antibióticos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; ERIG e SCHUCH, 2003; JUNGHANS e SANTOS-SEREJO, 2006) isso não foi obtido com a espécie *S. campestris*.

4.2 Estudos fitoquímicos

4.2.1 Extração e confirmação da presença dos triterpenos quinonametídeos nos extratos de *S. campestris*

Classicamente, a extração dos triterpenos quinonametídeos é realizada com DCM (CORSINO et al., 1998b; BUFFA FILHO et al., 2002; BUFFA FILHO et al., 2004; SANTOS, 2006; SILVA, 2009). Entretanto, é sabido que, por fatores ambientais, a utilização de solventes clorados, tanto em laboratórios de pesquisas quanto na indústria, deve ser evitada. O estudo realizado por Jeller et al. (2003) mostrou que o uso de EtOH também foi eficiente no processo de extração destes compostos.

As análises cromatográficas (CCDC) dos extratos etanólicos e diclorometânicos da entrecasca do sistema radicular (EC-EtOH/DCM) e do cerne do sistema radicular (CE-EtOH/DCM) de *S. campestris* não evidenciaram presença de TQs. Entretanto, a presença dos metabólitos de interesse foi confirmada nos extratos etanólicos (CA-EtOH) e diclorometânicos (CA-DCM) das cascas dos sistemas radiculares. Os estudos posteriores foram realizados apenas com os

extratos diclorometânicos porque na droga vegetal extraída com EtOH ainda foi encontrado teores de TQs, evidenciando que este solvente não eficiente.

As análises por CLAE dos extratos das cascas dos sistemas radiculares de plantas adultas (CA1-DCM) e dos extratos das raízes *in vitro* (RV-DCM), evidenciaram a presença da maitenina e de outros triterpenos quinonametídeos. Os cromatogramas dos padrões e dos extratos analisados estão apresentados nas figuras 16 e 17. A análise destes, em comparação com os tempos de retenção de padrões comprovam a presença destes metabólitos na matriz vegetal, corroboradas pelo máximo de absorção (UV-VIS) em 420 nm (bandas características dos triterpenos quinonametídeos).

Figura 16 — Cromatogramas obtidos via CLAE dos padrões maitenina (A), pristimerina (B) e do extrato CA1-DCM (C).

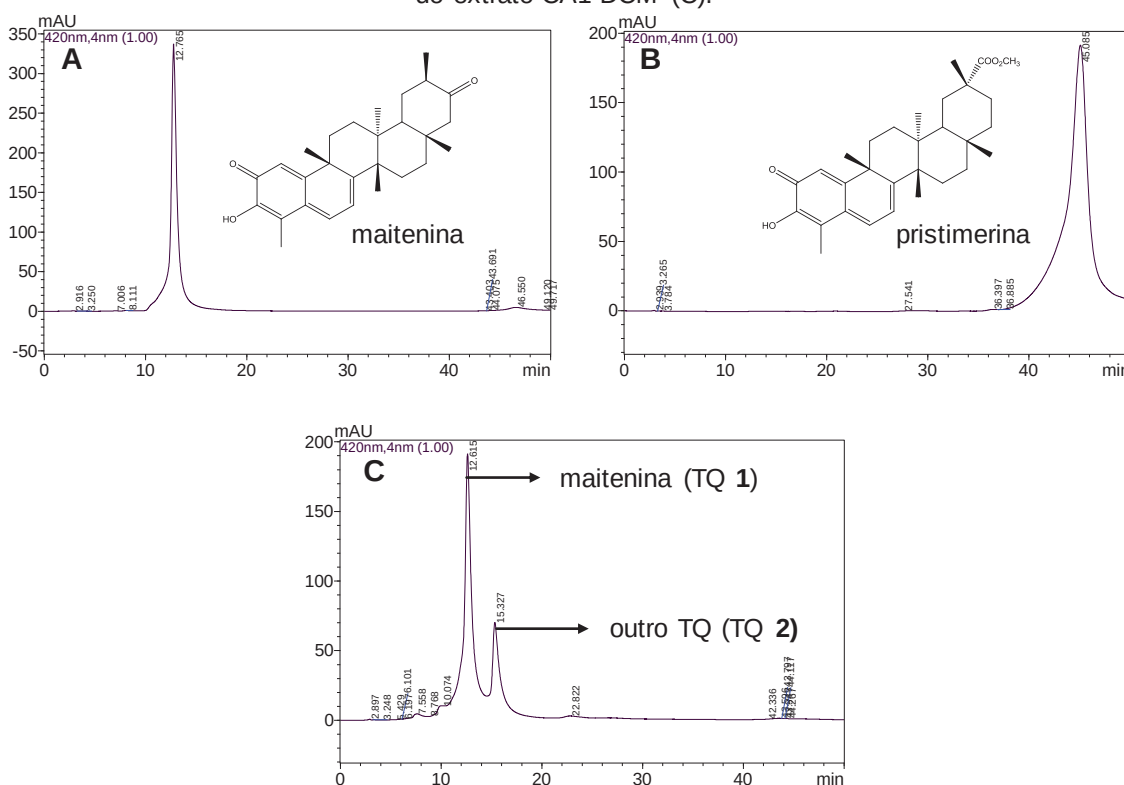
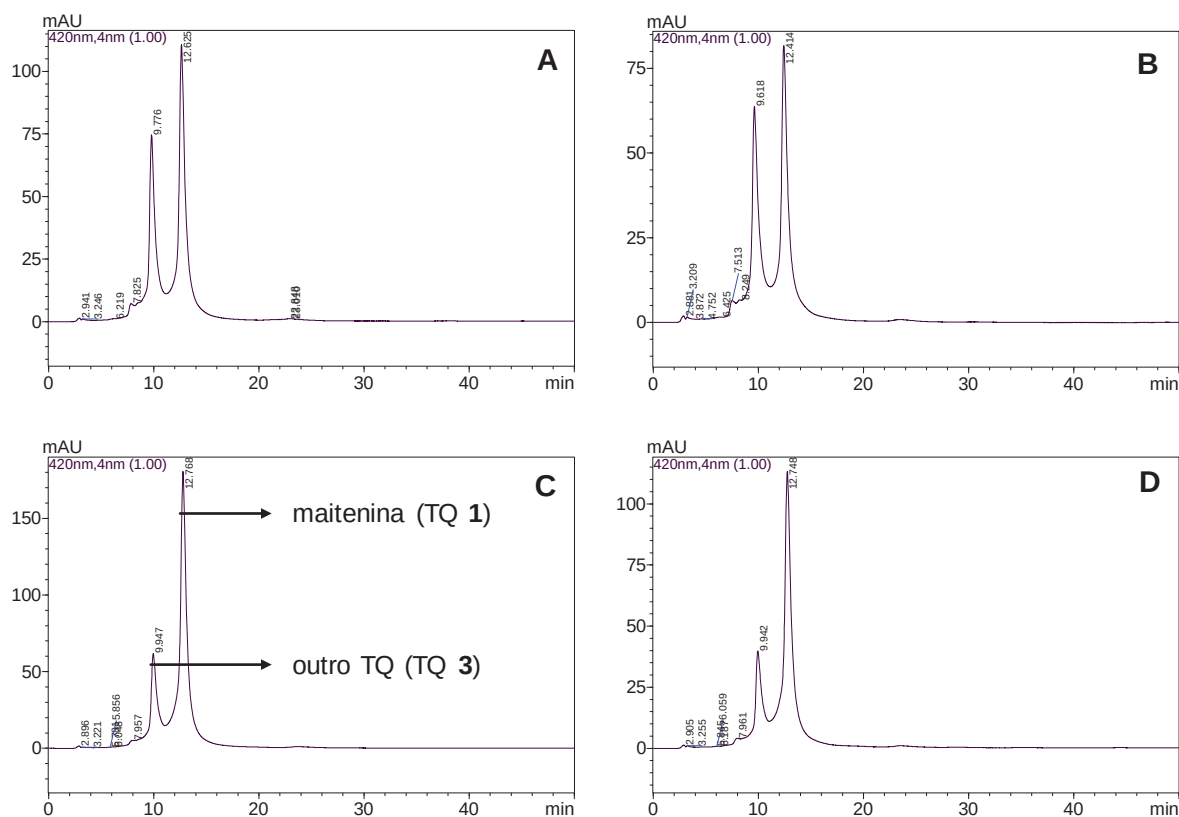


Figura 17 — Cromatogramas obtidos via CLAE dos extratos de raízes *in vitro* obtidos com 30 (A), 45 (B), 60 (C), e 75 (D) dias de cultura.

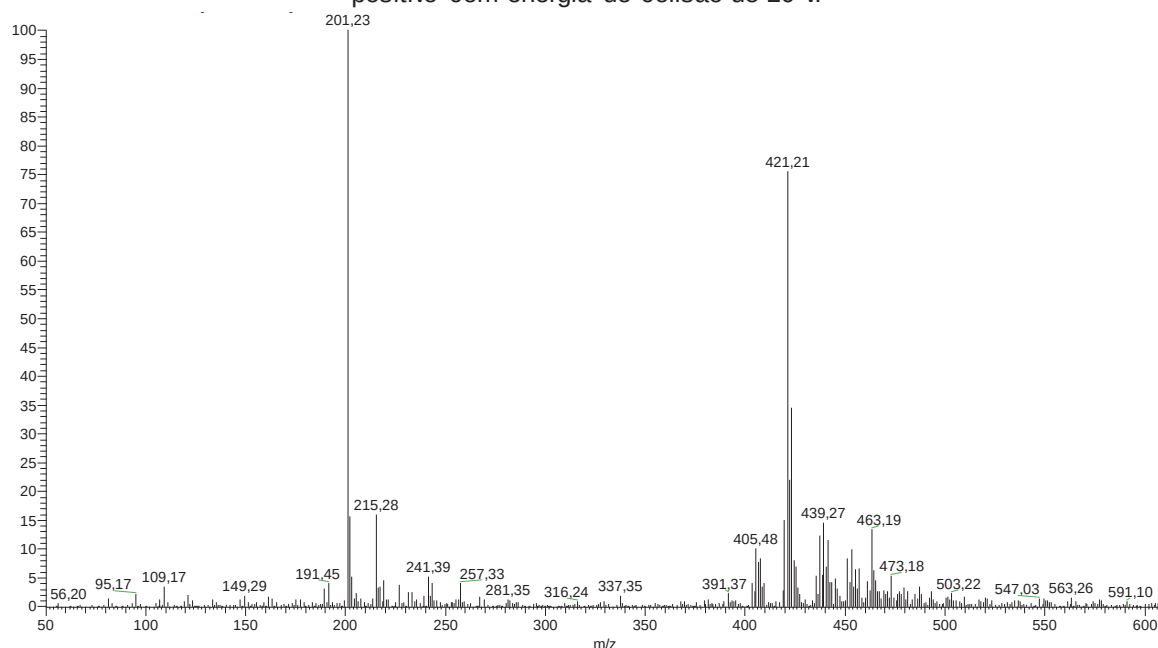


4.2.2 Detecção e identificação dos triterpenos quinonametídeos por EM

As identificações dos triterpenos quinonametídeos por espectrometria de massas foram realizadas tomando como base os padrões de fragmentações desta classe de metabólitos, os quais são amplamente conhecidos (BROWN et al 1973; KHALID et al., 2007; LIÃO, 1994; MONACHE et al., 1979; NIAMPOKA et al., 2005; SOTANAPHUN, 1998).

Para as análises de massas foram utilizadas como analitos os extratos CA1-DCM, para a identificação dos TQs **1** e **2** e RV-DCM, para os TQs **1** e **3**, sendo a geração dos espectros obtida pela fonte de ionização APCI (ionização química á pressão atmosférica) em modo positivo. O tipo de ionização utilizada foi escolhida baseado no trabalho descrito por Alécio (2005), o qual teve por objetivo otimizar as condições de análises por espectrometria de massas dos triterpenos quinonametídeos.

Figura 18 — Espectro de massas de primeira ordem do extrato CA1-DCM, utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.



O espectro de massas do extrato CA1-DCM (Figura 18) mostra uma grande quantidade de picos, sendo estes referentes aos inúmeros metabólitos contidos no extrato bruto. No entanto, as presenças dos picos m/z 267, 253, 241, 227 e principalmente do pico base m/z 201 referente a formação de um íon tropílio (Esquema 4), indicam a presença de triterpenos quinonametídeos no analito (BROWN et al 1973; KHALID et al., 2007). Assim, análises de EM^n foram realizadas nessa matriz visando identificar os íons moleculares referentes aos TQ **1** e **2**, detectados por análises em CLAE realizadas anteriormente (Seção 4.2.1).

O espectro de segunda ordem (EM^2) de m/z 421 (Figura 19) mostra novamente o padrão de fragmentações dos TQs (picos m/z 267, 253, 241, 227 e do pico base 201), indicando que este é referente ao íon quasi-molecular $[M+H]^+$ da maitenina (Figura 20), cuja massa molecular ($C_{28}H_{36}O_3$) é 420. Além disso, a presença do fragmento em m/z 405, proveniente da perda de um grupo metil a partir da molécula intacta, confirma esse achado. As principais fragmentações da molécula maitenina estão apresentadas no Esquema 4.

Figura 19 — Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 421 do extrato CA1-DCM utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.

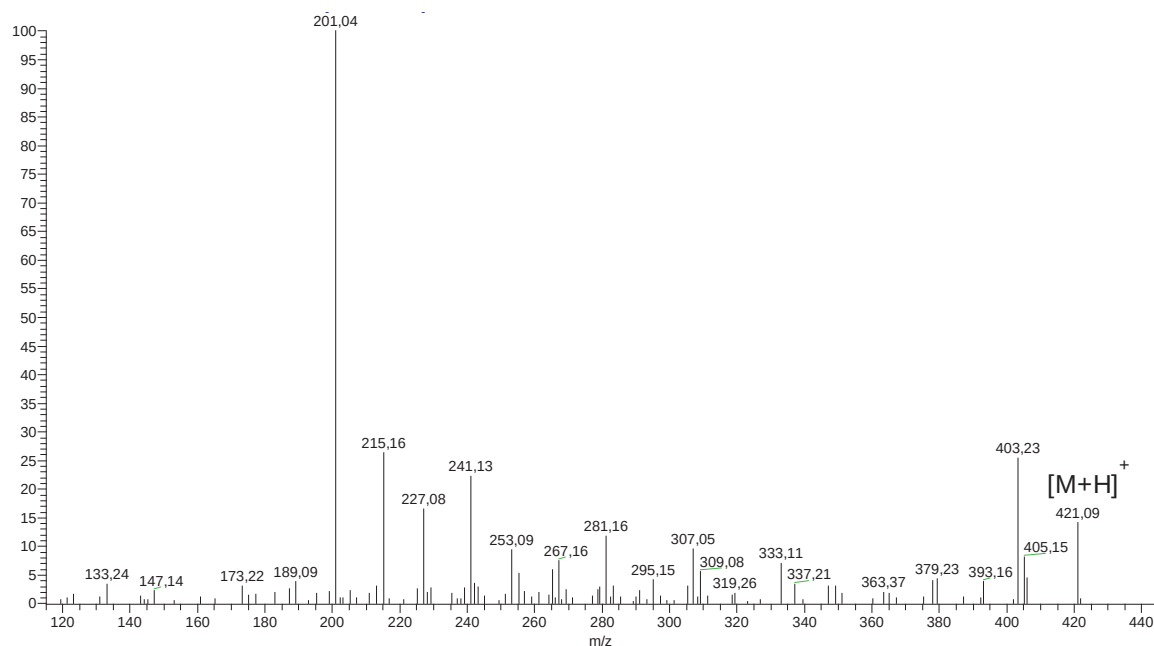
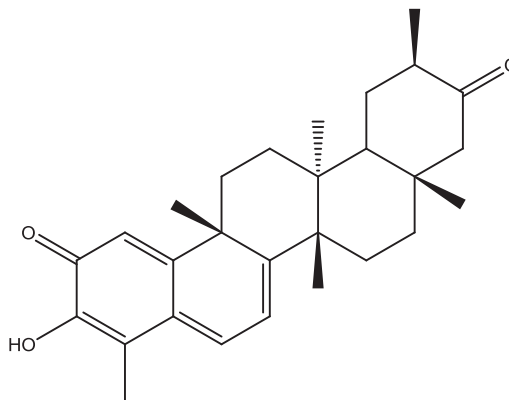
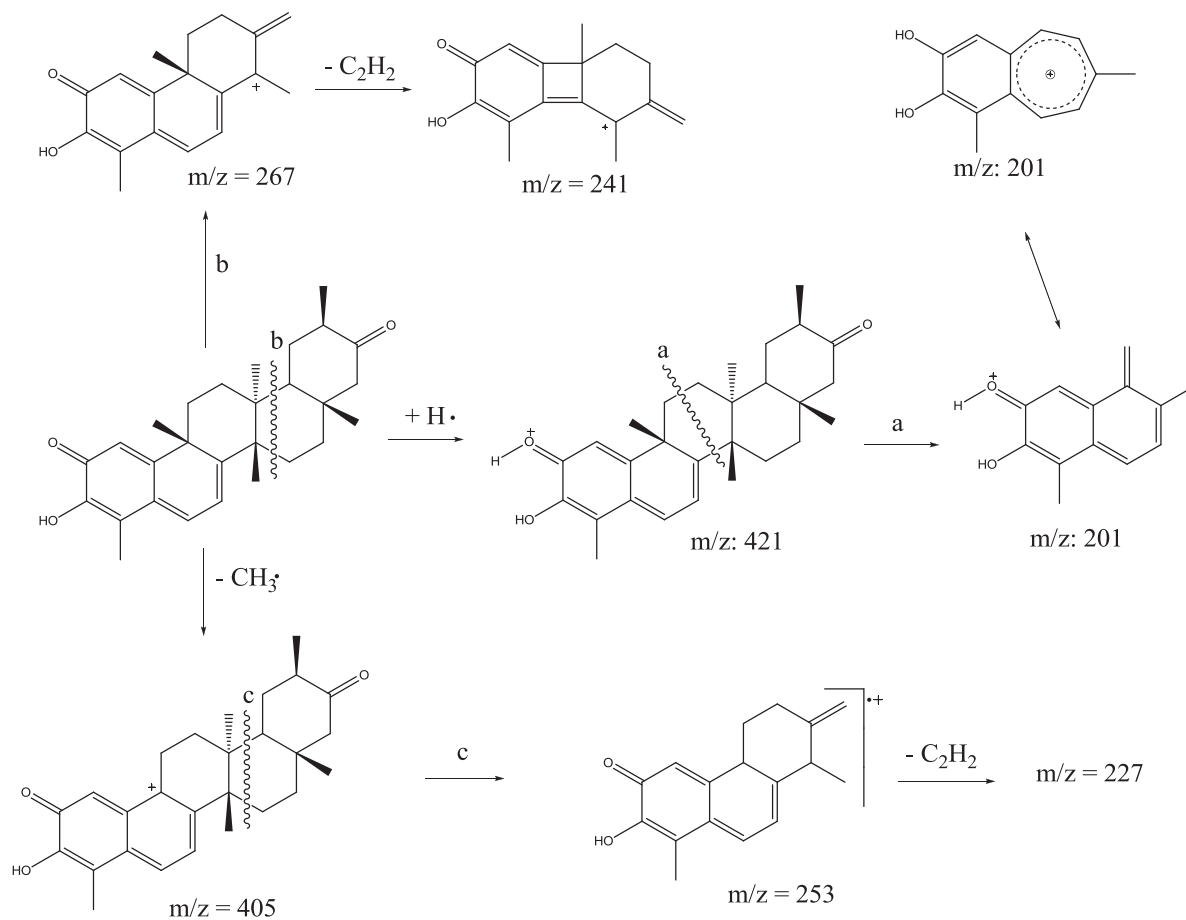


Figura 20 — Estrutura química da maitenina (TQ 1).



O espectro (EM^2) do íon m/z 463, representado na figura 21, apresentou os picos referentes às fragmentações características dos TQs (m/z 267, 253, 241, 227 e 201), o que evidencia se tratar do íon quasi-molecular $[M+H]^+$ do netzaualeioeno (Figura 22), único triterpeno quinonametídeo com massa molecular de 462 já detectado na espécie *S. campestris*.

Esquema 4 — Principais fragmentações observadas no espectro de massas da maitenina.



Fonte: Adaptado de Brown et al (1973).

Figura 21 — Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 463 do extrato CA1-DCM utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.

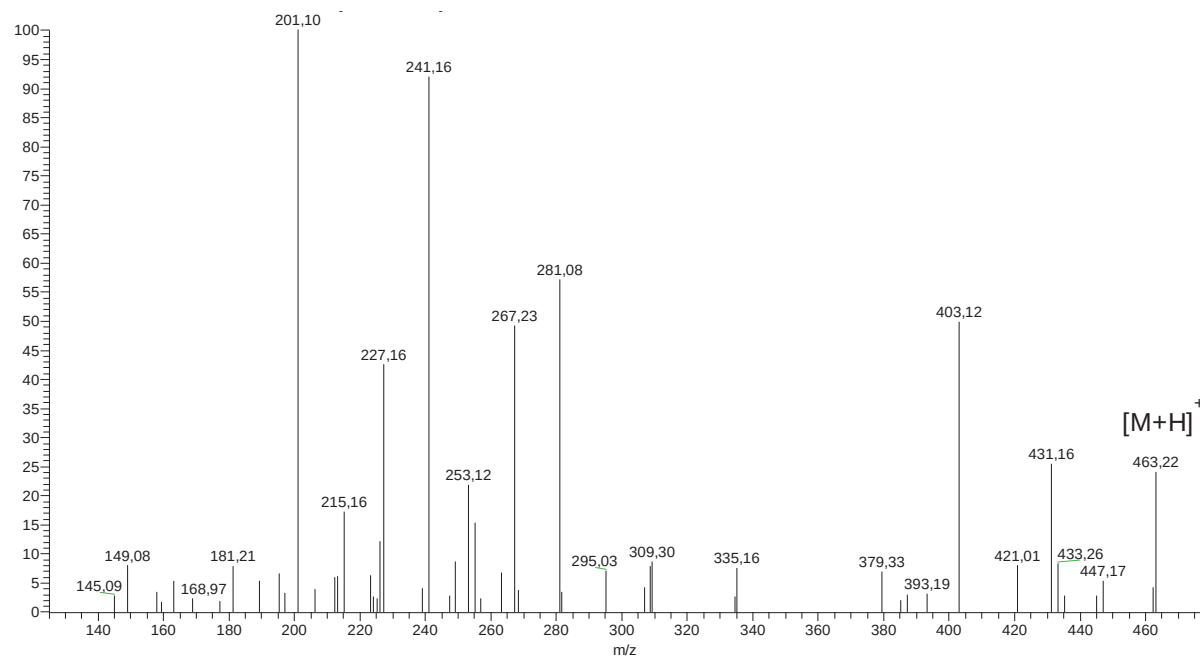
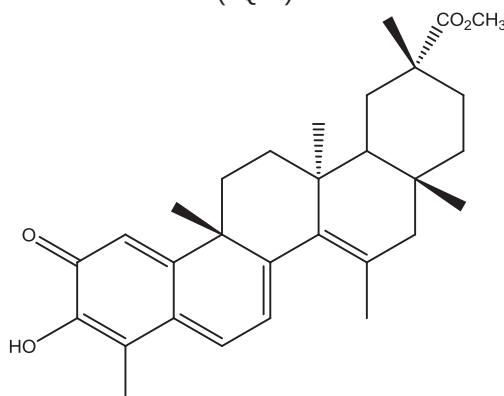


Figura 22 — Estrutura química do netzaualeioeno (TQ 2).



O espectro de massas de primeira ordem de RV-DCM (Figura 23) mostra uma infinidade de picos, resultado esperado por se tratar de um extrato bruto. No entanto, pela presença dos picos m/z 201 (pico base), 227, 241 e 267, já foi possível evidenciar a presença de TQs. Assim os experimentos de EM^n realizadas com essa matriz resultaram na detecção do íon quasi-molecular m/z 421 da matenina (Figura 20), a mesma molécula encontrada anteriormente no extrato CA1-DCM. O espectro de massas de segunda ordem deste íon está representado na figura 24.

Figura 23 — Espectro de massas de primeira ordem do extrato RV-DCM, utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.

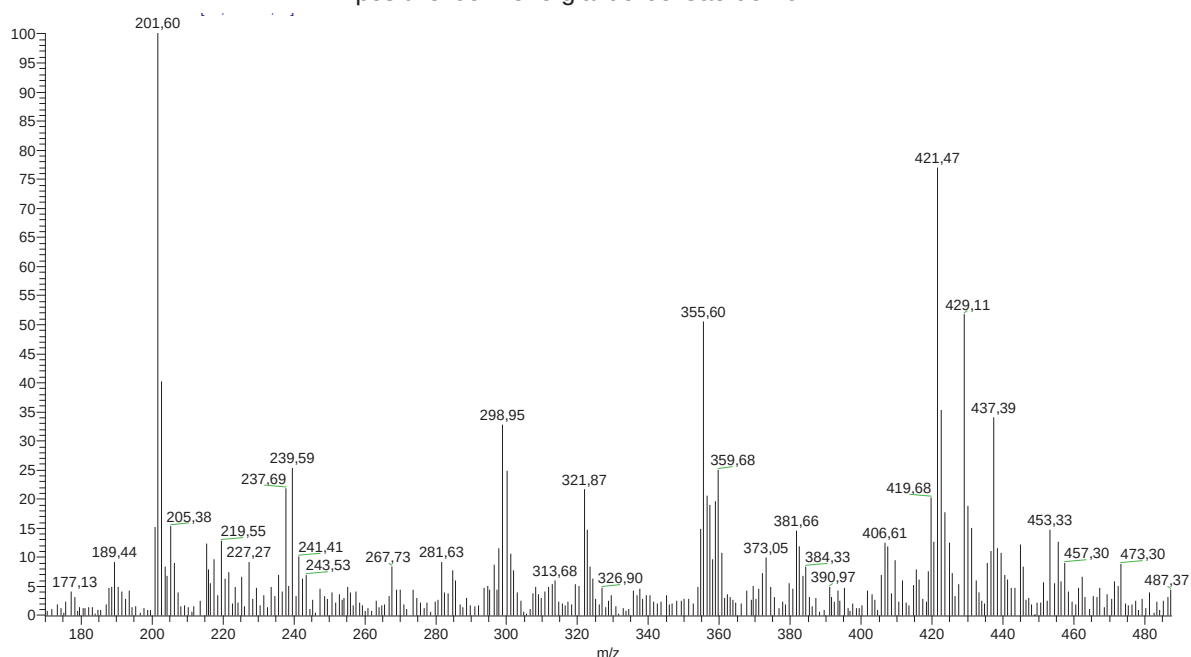
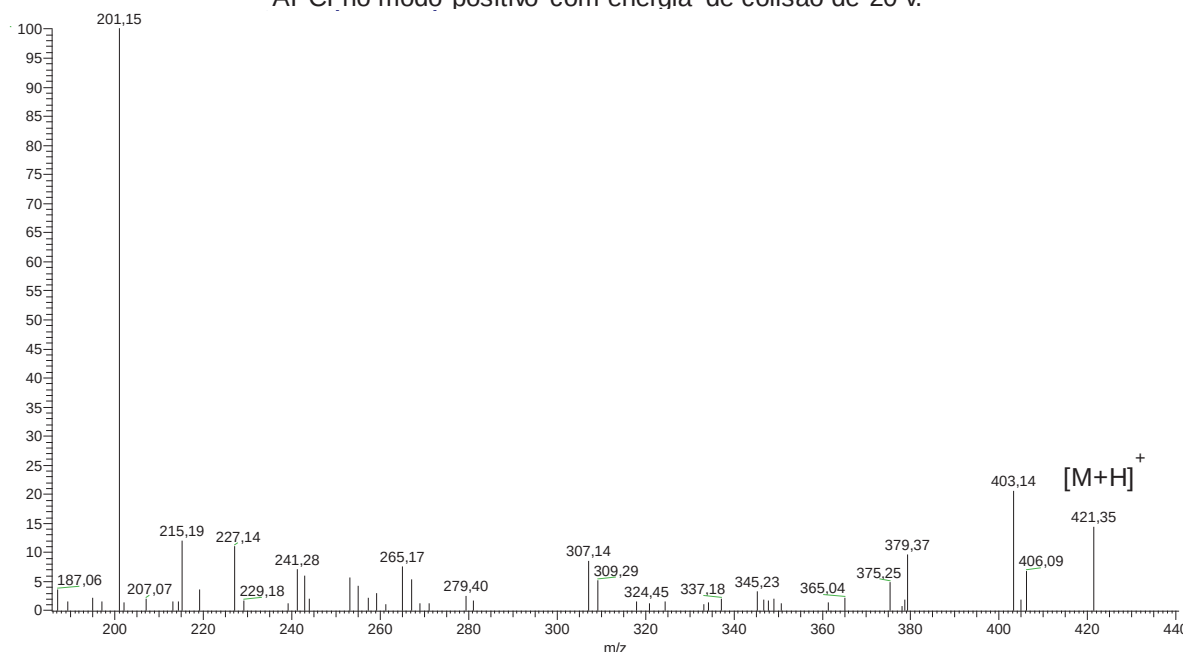
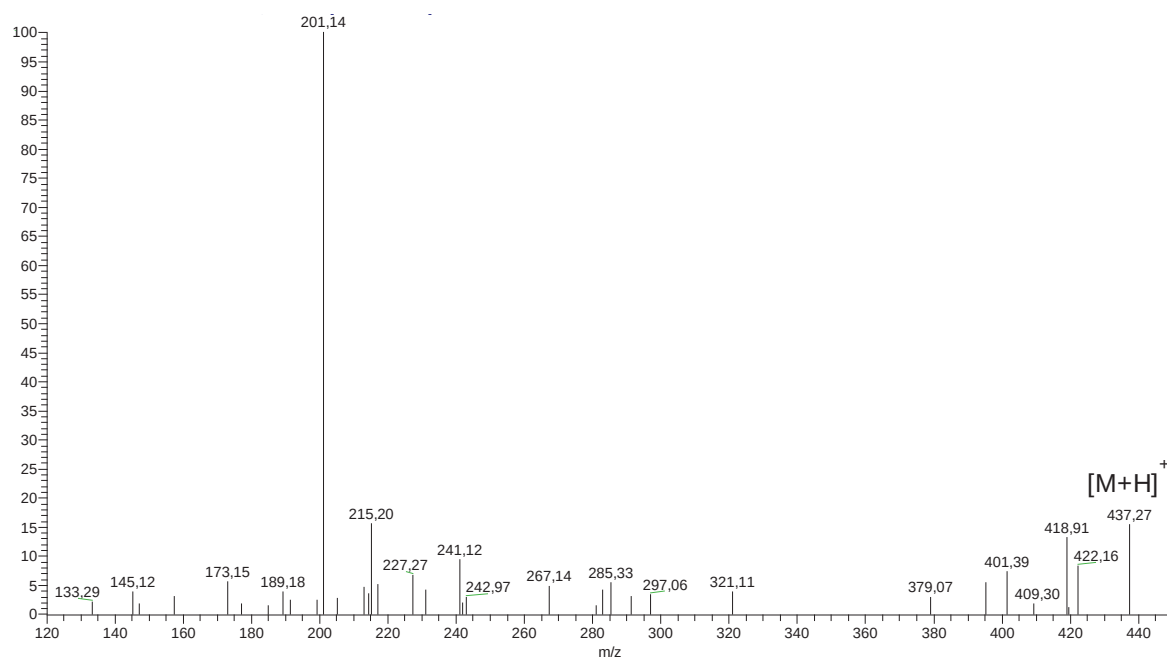


Figura 24 — Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 421 do extrato RV-DCM utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.



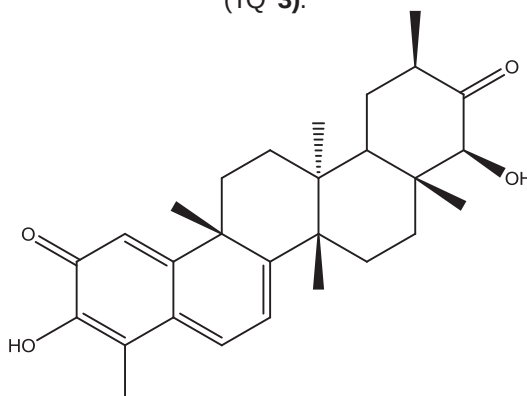
Com os contínuos experimentos de EM^n realizados com o extrato RV-DCM foi possível identificar o íon m/z 437, cujo espectro é mostrado na figura 25. Como pode ser observado neste espectro, este íon produziu fragmentos característicos dos TQs. Sendo assim, tomando como base as massas moleculares dos quinonametídeos já identificados em *S. campestris*, pode-se inferir que m/z 437 trata-se do íon quasi-

Figura 25 — Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 437 do extrato RV-DCM utilizando APCI no modo positivo com energia de colisão de 20 v.



molecular de 22 β -hidroximaitenina ou de seu isômero 20 α -hidroximaitenina, ambos com massa molecular 436. Entretanto, experimentos realizados via CLAE com o extrato RV-DCM, comparando os tempos de retenção do composto em questão com padrões cromatográficos (SANTOS, 2010), possibilitaram confirmar que o mesmo trata-se do 22 β -hidroximaitenina (Figura 26).

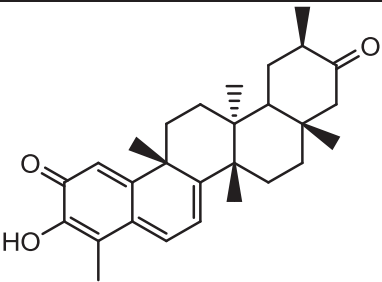
Figura 26 — Estrutura química do 22 β -hidroximaitenina (TQ 3).

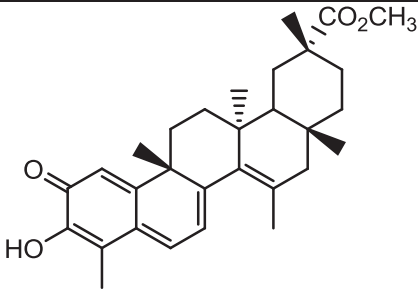
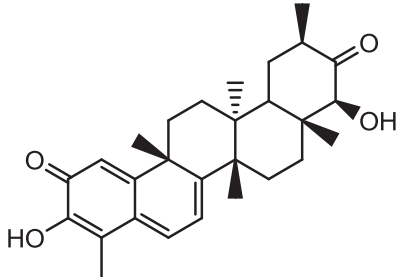


4.2.3 Isolamento dos triterpenos quinonametídeos

Os estudos fitoquímicos realizados com extratos de casca de sistemas radiculares de *S. campestris* cultivadas *ex vitro* culminaram no isolamento de três triterpenos quinonametídeos (Tabela 3), sendo eles maitenina (TQ 1), netzaualcoieno (TQ 2), e 22 β -hidroximaitenina (TQ 3), todos sólidos cristalinos de cor laranja.

Tabela 3 — Triterpenos quinonametídeos isolados de *S. campestris*.

Triterpeno quinonametídeo	Nome	Massa (mg)	Extrato
	maitenina (TQ 1)	24,0	CA1-DCM

	netzauualcoieno (TQ 2)	15,2	CA1-DCM
	22β-hidroximaitenina (TQ 3)	15,6	DS-DCM

4.2.4 Determinação quantitativa dos triterpenos quinonametídeos por CLAE-DAD

Construção da curva de calibração e obtenção dos limites de detecção e quantificação

Os cromatogramas dos padrões maitenina (TQ 1), netzauualcoieno (TQ 2) e da mistura de ambos, utilizada no estabelecimento das curvas de calibração, estão representados nas figuras 27-29.

Figura 27 — Cromatograma da maitenina (TQ 1) (TR=14,6 min) obtido via CLAE (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)) e seu espectro de UV com o máximo de absorção.

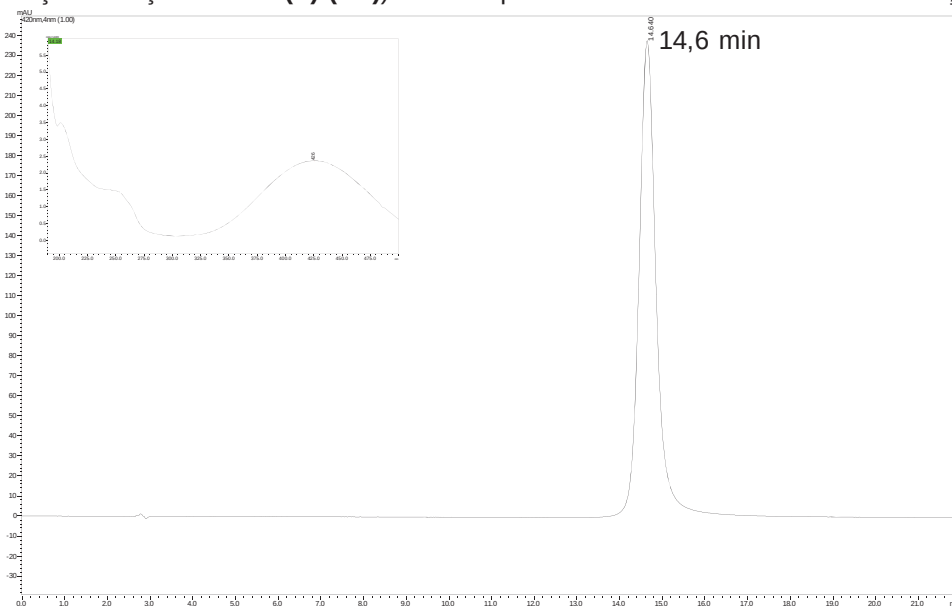


Figura 28 — Cromatograma do netzauualcoieno (TQ 2) (TR=17,9 min) obtido via CLAE (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)) e seu espectro de UV com o máximo de absorção.

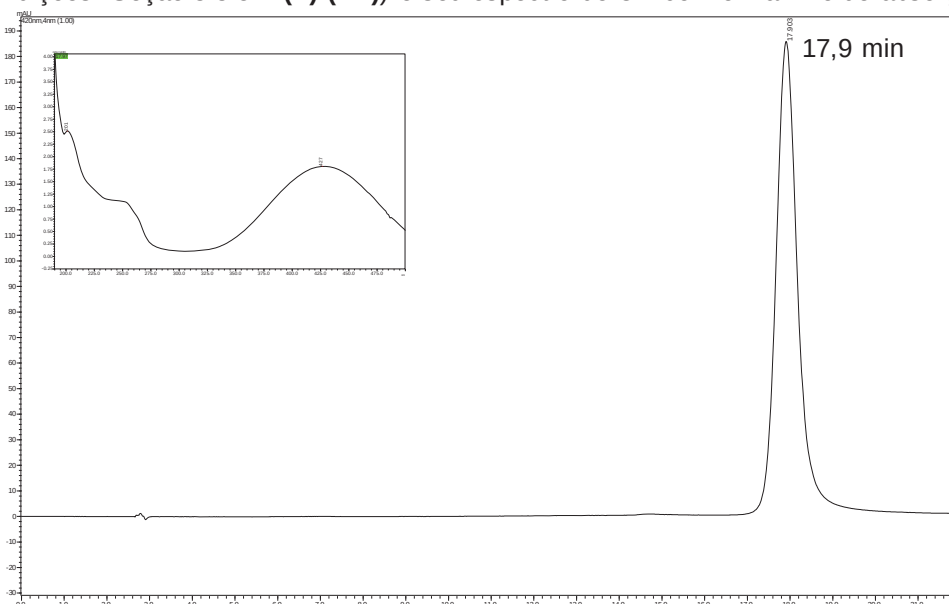
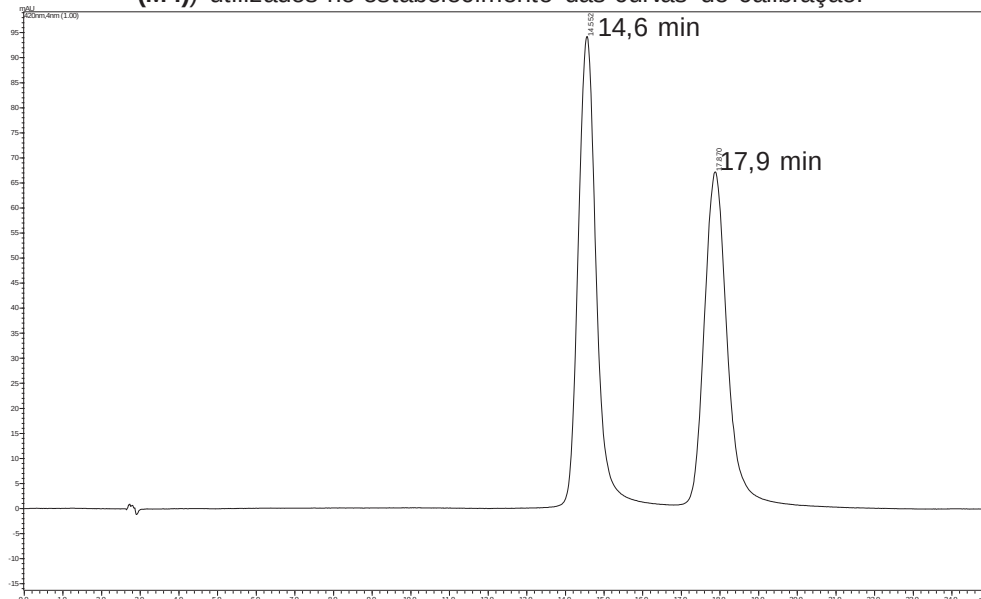


Figura 29 — Cromatograma obtido via CLAE da mistura dos padrões maitenina (TR=14,6) e netzauualcoieno (TR=17,9) em concentração de 50 µg/mL (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)) utilizados no estabelecimento das curvas de calibração.



A partir da construção de uma curva analítica é possível estimar os coeficientes de regressão **a** (coeficiente angular) e **b** (coeficiente linear) e de correlação **r**, utilizando o método de regressão linear (CHUI et al., 2001; CUSTODIO et al., 2004). O parâmetro **r** é o que permite a estimativa da qualidade da curva construída, pois quanto mais próximo de 1,0 for esse valor, menor será a dispersão

do conjunto de pontos experimentais e maior a certeza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

Para a quantificação dos triterpenos quinonametídeos, os dados obtidos pela construção da curva analítica dos padrões maitenina (Figura 30) e netzualcoieno (Figura 31) resultaram, respectivamente, nas equações de regressão $Y = -2,70 \times 10^5 + 3,55 \times 10^5 X$ ($r = 0,998$) e $Y = -5,67 \times 10^4 + 5,52 \times 10^4 X$ ($r = 0,998$). Os coeficientes de correlação obtidos indicam uma boa linearidade do método, tendo em vista que o INMETRO recomenda valores acima de 0,90 (INSTITUTO..., 2010) e a ANVISA de 0,99 (AGÊNCIA..., 2003).

Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram $43,0 \times 10^{-3}$ e $130, \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ para a maitenina e $41,00 \times 10^{-3}$ e $124,0 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ para o netzualcoieno (Tabela 4). Esses resultados são considerados satisfatórios quando comparados com estudos, utilizando a mesma técnica (CLAE-DAD), realizados anteriormente. Buffa Filho et al. (2002), trabalhando com calos de *Maitenus ilicifolia*, encontraram valores de LD = $18,75 \times 10^{-3}$, $2,50 \times 10^{-3}$, $6,25 \times 10^{-3}$, $18,75 \times 10^{-3}$ e $22,50 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ para os TQs 20 α -hidroximaitenina, 22 β -hidroximaitenina, maitenina, celastrol e pristimerina. Nossack et al. (2004), analisando extratos hidroalcoólicos de *Maytenus aquifolium*, relataram para a maitenina e pristimerina LD = 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 30 — Curva analítica com padronização externa na faixa de 1,5 a 35,0 $\mu\text{g/mL}$ para a maitenina

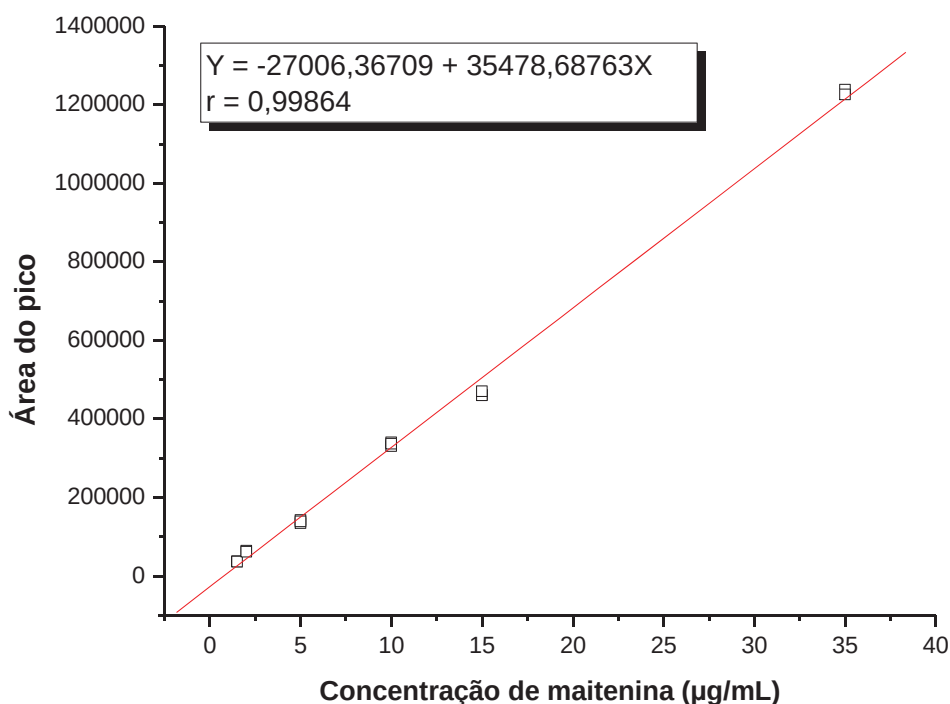


Figura 31 — Curva analítica com padronização externa na faixa de 1,5 a 35,0 µg/mL para o netzauualcoieno.

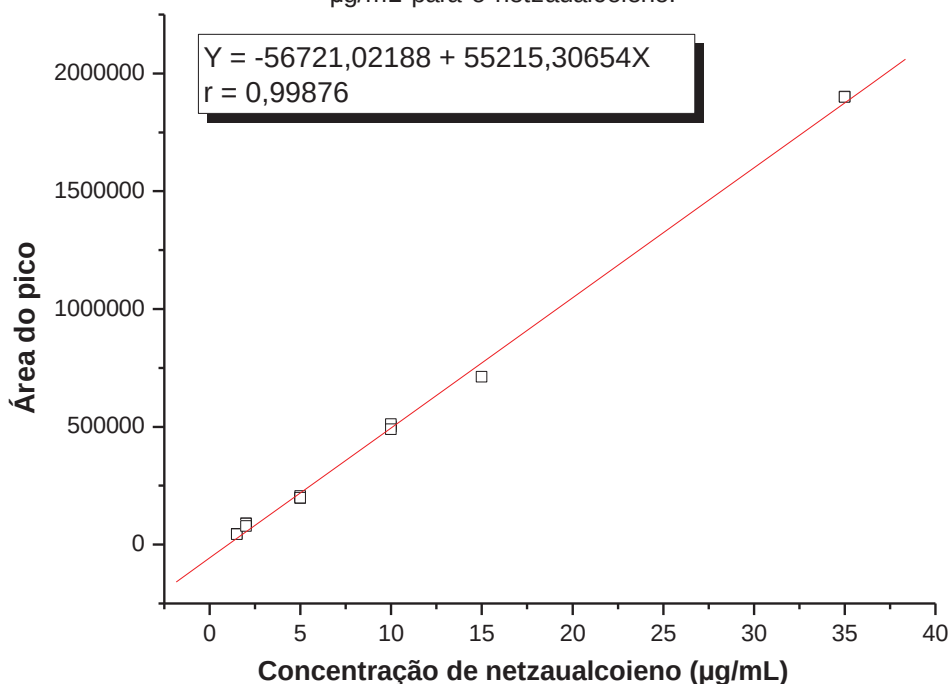


Tabela 4 — Dados de calibração, limites de detecção e quantificação de maitenina e netzauualcoieno.

Composto	Inclinação da reta (a)	DP de a	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
maitenina	35478,68763	462,85526	43,0x10 ⁻³	130, x10 ⁻³
netzauualcoieno	55215,30654	687,26888	41,00x10 ⁻³	124,0 x10 ⁻³

Análises das raízes *in vitro* e dos sistemas radiculares de *Salacia campestris*

Os valores de rendimento de biomassa seca em relação à biomassa fresca das raízes *in vitro* de *S. campestris* (RV), durante o período de cultivo, variaram de 5,16 a 8,19%. Já para os sistemas radiculares de plantas jovens (RPJ) e da planta adulta coletada em seu habitat natural (RN) os rendimentos de biomassa seca foram 36,0 e 50,8%, respectivamente (Tabela 5). Essa diferença no valor dos rendimentos de biomassa seca encontrado nas raízes *in vitro* e nos sistemas radiculares *ex vitro* é esperado, tendo em vista que a disponibilidade de água para órgãos ou tecidos cultivados em meio de cultura é muito maior que para plantas cultivadas em condições de campo.

Com relação os rendimentos dos extratos diclorometânicos das raízes cultivadas *in vitro*, houve uma variação de 2,14 á 4,30%, entre o primeiro e o último dia de cultivo, enquanto que os sistemas radiculares de planta jovem e de planta

adulta os valores de rendimento foram 1,06 e 2,02%, respectivamente. Com esses resultados foi possível inferir que raízes de *S. campestris* cultivadas *in vitro* produzem mais metabólitos, na faixa de polaridade do DCM (média polaridade), do que sistemas radiculares de plantas mantidas *ex vitro* da mesma espécie (Tabela 5).

Tabela 5 — Rendimento da biomassa seca em relação à fresca e do extrato DCM em relação a biomassa seca das raízes *in vitro* e do sistema radicular de *S. campestris*.

Raiz ou sistema radicular de <i>S. campestris</i>	Rendimento de biomassa seca em relação à massa fresca (%)	Rendimento do extrato DCM em relação à massa seca (%)
RV 0 ^a	8,19 ± 0,560	4,30 ± 0,271
RV 7 ^a	7,22 ± 0,352	3,96 ± 0,655
RV 15 ^a	7,21 ± 0,660	4,42 ± 0,372
RV 30 ^a	7,56 ± 0,663	2,99 ± 0,270
RV 45 ^a	6,72 ± 0,271	2,69 ± 0,0910
RV 60 ^a	7,72 ± 0,656	2,20 ± 0,0872
RV 75 ^a	7,00 ± 0,447	2,14 ± 0,722
RV 90 ^a	7,06 ± 0,444	3,00 ± 0,0844
RV 105 ^a	5,16 ± 0,949	4,44 ± 0,621
RPJ	36,0 ± 2,36	1,06 ± 0,309
RN	50,8	2,02

* os experimentos realizados com RN para a obtenção do rendimento de massa seca em relação à fresca e do rendimento do extrato DCM em relação à massa seca foram realizados com apenas um indivíduo.

^a período de cultivo (dias)

RV = raízes obtidas *in vitro*

RPJ = sistema radicular de plantas jovens (1 ano de cultivo em casa de vegetação)

RN = sistema radicular de plantas naturais (coletadas em habitat natural)

As análises em CLAE das raízes de *S. campestris* obtidas *in vitro* possibilitaram evidenciar que as mesmas produziram maitenina (TR ≈ 14,5 min) e 22β-hidroximaitenina (TR ≈ 10,8) (Figura 32) em concentrações variadas no decorrer dos 105 dias de cultura (Tabela 6 e Figura 33).

Figura 32 — Cromatogramas dos extratos das raízes obtidas *in vitro* (RV) com 0 (A), 7 (B), 15 (C), 30 (D), 45 (E), 60 (F), 75 (G), 90 (H) e 105 (I) dias de cultura (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4).

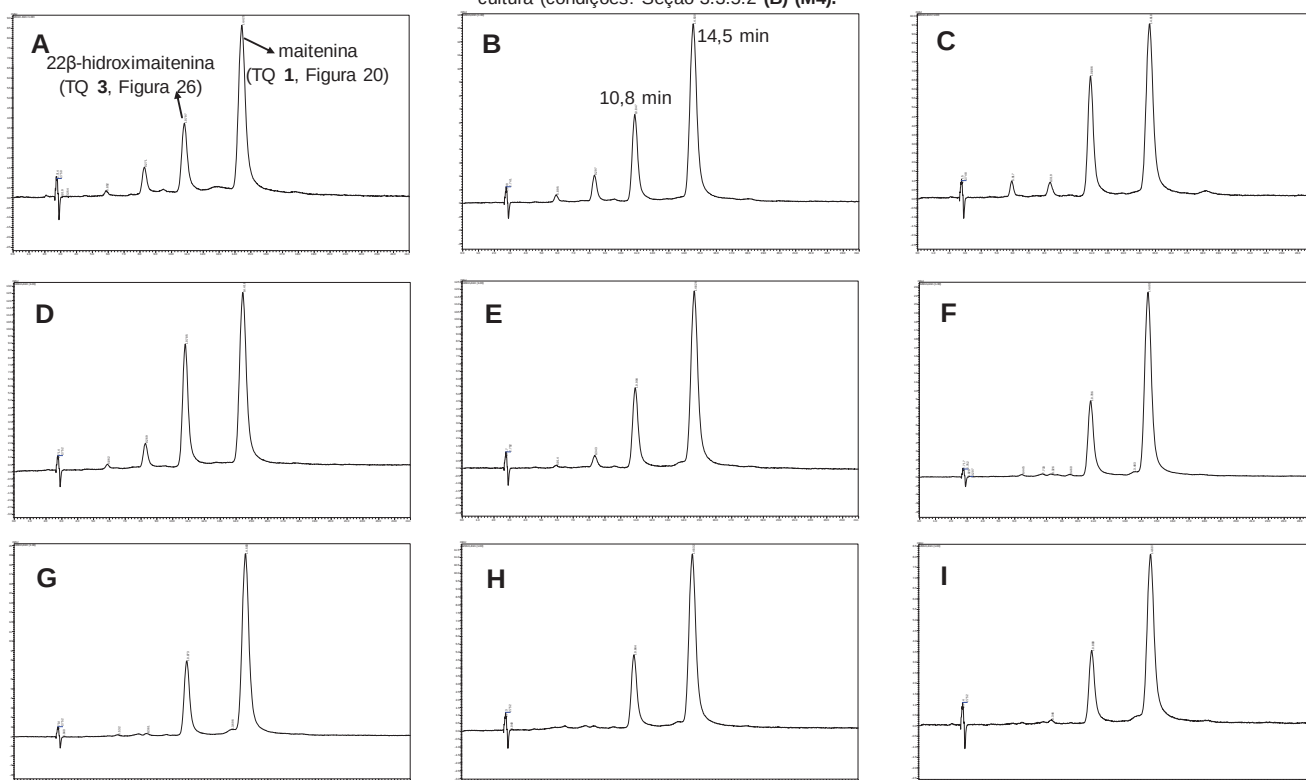


Tabela 6 — Teor dos triterpenos quinonametídeos maitenina, 22β-hidroximaitenina e netzauualcoieno dos extratos e da biomassa seca das raízes cultivadas *in vitro* e dos sistemas radiculares de *S. campestris*.

Raiz ou sistema radicular de <i>S. campestris</i>	Conc. maitenina no extrato (mg/g)	Conc. 22β-hidroximaitenina no extrato (mg/g)	Conc. netzauualcoieno no extrato (mg/g)	Conc. maitenina na biomassa seca (μg/g)	Conc. 22β-hidroximaitenina na biomassa seca (μg/g)	Conc. netzauualcoieno na biomassa seca (μg/g)
RV ^a 0 ^b	16,53 ± 0,02	6,368 ± 0,34	ND	711,84 ± 0,972	274,17 ± 14,6	ND
RV ^a 7 ^b	24,58 ± 0,04	10,91 ± 0,13	ND	972,11 ± 1,60	431,47 ± 5,16	ND
RV ^a 15 ^b	18,20 ± 0,09	11,05 ± 0,09	ND	804,60 ± 3,89	488,44 ± 3,91	ND
RV ^a 30 ^b	23,32 ± 0,30	13,54 ± 0,38	ND	697,46 ± 9,02	404,86 ± 11,5	ND
RV ^a 45 ^b	22,41 ± 0,40	9,084 ± 0,13	ND	601,98 ± 10,7	244,00 ± 3,52	ND
RV ^a 60 ^b	39,63 ± 0,37	14,27 ± 0,14	ND	871,26 ± 8,22	313,70 ± 3,02	ND
RV ^a 75 ^b	35,36 ± 1,61	12,52 ± 0,01	ND	754,85 ± 34,58	267,28 ± 0,128	ND
RV ^a 90 ^b	20,71 ± 0,08	8,062 ± 0,15	ND	620,83 ± 2,45	241,64 ± 4,425	ND
RV ^a 105 ^b	15,43 ± 0,18	6,421 ± 0,15	ND	685,15 ± 8,06	285,08 ± 6,70	ND
RPJ ^c	16,49 ± 0,02	4,198 ± 0,12	ND	175,27 ± 0,254	44,612 ± 1,32	ND
RN ^d	220,70 ± 7,04	ND ^e	89,72 ± 2,85	4452,4 ± 142,1		1810,1 ± 57,5

* os experimentos realizados com RN para a obtenção do rendimento de massa seca em relação à fresca e do rendimento do extrato DCM em relação à massa seca foram realizados com apenas um indivíduo.

^a raízes obtidas *in vitro*

^b período de cultivo (dias)

^c sistema radicular de plantas jovens (1 ano de cultivo em casa de vegetação)

^d sistema radicular de plantas naturais (coletadas em habitat natural)

^e não detectado

Figura 33 — Gráfico de comparação do teor de maitenina e 22 β -hidroximaitenina nas raízes de *S. campestris* cultivadas *in vitro* com 0, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias.

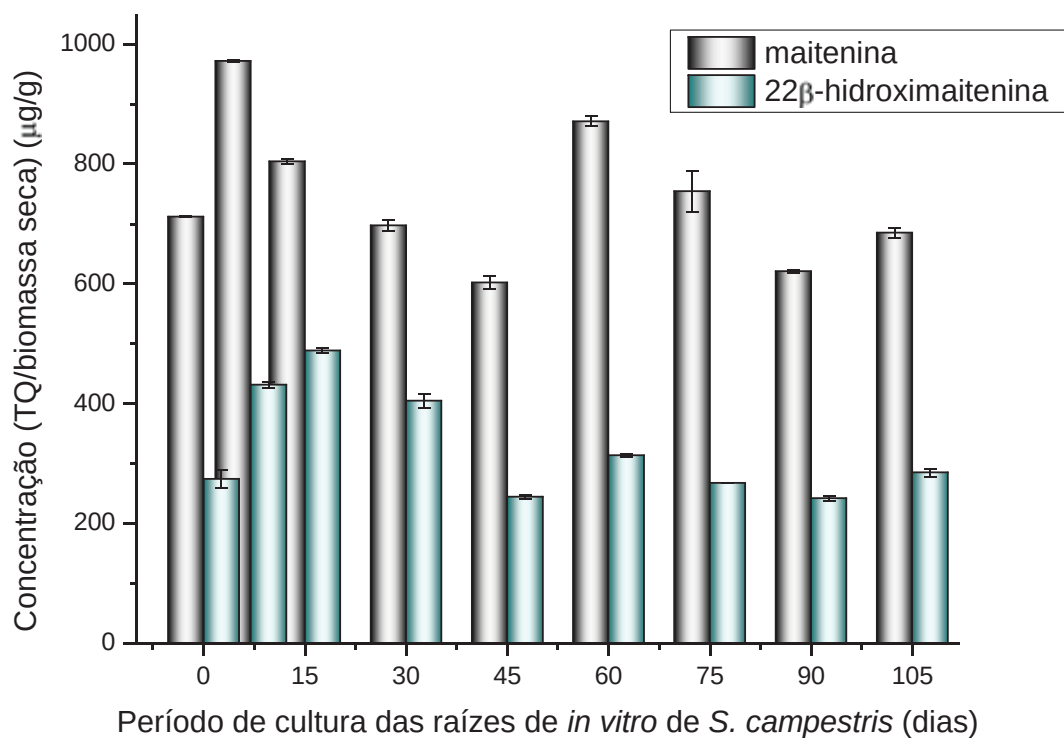
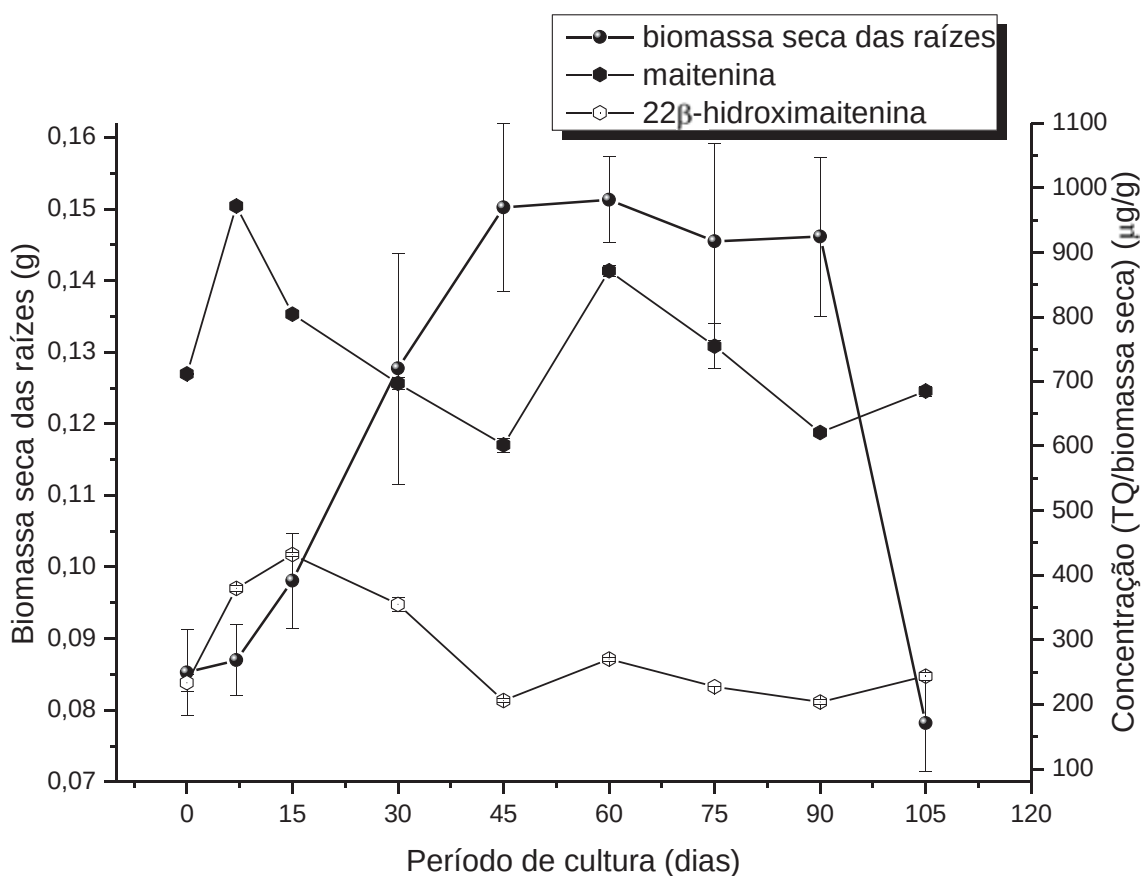


Figura 34 — Acúmulo de biomassa seca e concentração de maitenina e 22 β -hidroximaitenina nas raízes de *S. campestris* cultivadas *in vitro* por 105 dias



Durante todo o período de cultivo das raízes *in vitro* houve produção de TQs, sendo que no início e no período mediano da cultura a biossíntese foi intensificada mostrando que provavelmente neste período há um pulso enzimático que favorece esse acúmulo (Figura 34).

O aumento da produção dos triterpenos quinonametídeos aos 7 dias de cultivo, não está relacionado com ganho de biomassa seca das raízes. Os teores de maitenina (972,11 µg/g) e 22β-hidroximaitenina (488,44 µg/g) nas raízes produzidas *in vitro* atingiram o pico máximo de produção aos 7 e 15 dias, respectivamente. Entretanto, o maior acúmulo de biomassa seca ocorreu dentro do período de 45 a 90 dias (Figura 34).

Um comportamento similar ao encontrado neste trabalho com raízes de *S. campestris*, foi observado em calos de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) cultivados *in vitro*. No estudo, os autores encontraram que a produção máxima dos mesmos metabólitos foi igualmente atingida nas fases lag e log, mas ao contrario do observado nas raízes de *S. campestris*, a produção máxima de 22β-hidroximaitenina (410,0 µg/g) foi atingida na fase lag (8 dias de cultivo) e de maitenina (44,0 µg/g) na fase log (16 dias de cultivo) (BUFFA FILHO et al., 2004).

Durante a fase de crescimento entre o 15º e 45º dia houve um aumento de 52,28% na massa seca das raízes de *S. campestris*. Em contrapartida, na mesma fase foi observada uma diminuição tanto na produção de maitenina (33,66%) quanto na de 22β-hidroximaitenina (100,18%). A redução na produção dos mesmos triterpenos quinonametídeos, na fase de crescimento, também foi observada em calos de *Maytenus ilicifolia* cultivados *in vitro* (BUFFA-FILHO et al., 2004). Um comportamento semelhante também foi encontrado em calos friáveis de *Salvia officinalis*, os quais diminuíram a produção do triterpeno ácido ursônico no início da fase linear de crescimento (BOLTA et al., 2000). Estes resultados são esperados, pois, de modo geral, durante a fase linear de crescimento de células vegetais, ocorre principalmente a síntese de metabólitos primários em detrimento dos metabólitos secundários. Segundo Stepan-Sarkissian e Grey (1999), entre os principais metabólitos primários produzidos na fase linear de crescimento estão as proteínas da parede celular e o amido, ambos sintetizados a partir de carboidratos disponíveis no meio de cultura.

Embora tenha ocorrido uma desaceleração significativa no processo de crescimento das raízes entre 45 e 60 dias de cultivo, o acúmulo máximo de

biomassa ocorreu aos 60 dias. Dentro deste período, a síntese de maitenina e 22 β -hidroximaitenina foi novamente estimulada resultando em um aumento no teor de 44,73 e 28,56%, respectivamente. Outra vez o comportamento dos primeiros dias de cultura se repete, ocorrendo um aumento da concentração dos quinonametídeos sem um ganho de biomassa neste período. Estes dados corroboram com o trabalho realizado com células em suspensão de *Panax japonicus* cujo estudo demonstrou que a produção de ginsenosídeos (triterpenos), como no caso dos TQs para *S. campestris*, também aumentou durante o início da fase de desaceleração (SMOLENSKAYA et al., 2007).

Quando o desenvolvimento das raízes permaneceu constante (60 aos 90 dias) a concentração de maitenina diminuiu de 871,26 para 620,83 $\mu\text{g/g}$ (diminuição de 40,34%) e de 22 β -hidroximaitenina, de 313,70 para 241,64 $\mu\text{g/g}$ (diminuição de 29,82%). Esses resultados divergem dos obtidos com células em suspensão de *Centella asiatica* cuja produção máxima dos triterpenos de interesse (ácido asiático, ácido madecássico, asiaticosídeo e madecassosídeo) foi atingida na fase estacionária (JAMES et al., 2008).

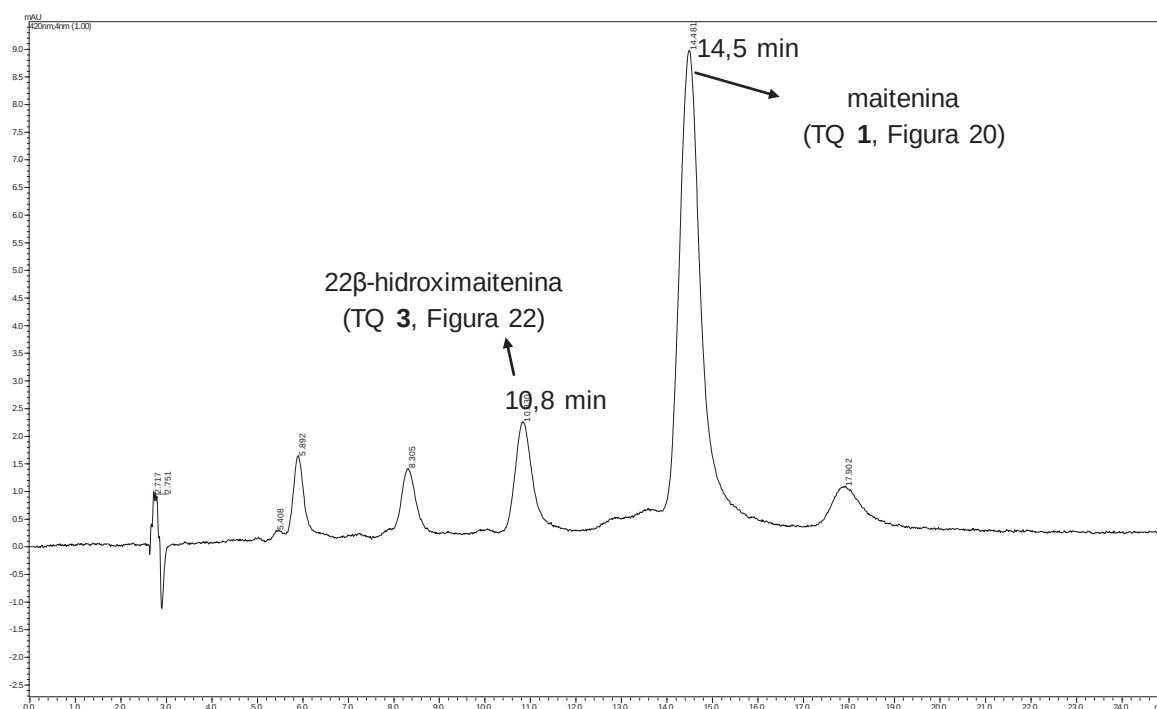
A partir do nonagésimo dia de cultivo *in vitro* das raízes de *S. campestris* começou a fase de declínio, a qual é caracterizada pela necrose e morte celular. Ainda assim, do 90º ao 105º dia, as raízes promoveram aumento na produção de maitenina (10,36%) e 22 β -hidroximaitenina (17,98%). Resultados semelhantes a esses foram relatados para a espécie *Panax japonicus*, cujas células em suspensão atingiram o pico de produção máxima de ginsenosídeos também no estágio de declínio de crescimento (SMOLENSKAYA et al., 2007). Nesta fase de desenvolvimento, as células vegetais, da maioria das espécies, perdem a capacidade de dividirem-se e adquirem maior habilidade de biossintetizar metabólitos secundários (CONSTABEL e TYLER, 1994).

Contudo, os resultados obtidos indicam que para ser alcançada a maior produção dos TQs, utilizando raízes *in vitro* de *S. campestris*, deve-se cultivar as raízes por 60 dias (período com maior coincidência entre acúmulo de biomassa e teor de TQs), seguido de transferência das mesmas para meio de cultura fresco e mantê-las *in vitro* por mais 7 (produção máxima de maitenina) ou 15 dias (produção máxima de 22 β -hidroximaitenina).

Com relação aos sistemas radiculares das plantas jovens cultivadas em casa de vegetação (RPJ), estes demonstraram acumular os mesmos quinonametídeos das

raízes cultivadas *in vitro*, 22 β -hidroximaitenina (TR = 10,8 min) e maitenina (TR = 14,5 min) (Figura 35), entretanto, em menores teores (Figura 37). A produção de maitenina pelas raízes *in vitro* com 7 dias de cultivo (maior produção) foi 5,55 vezes maior do que as RPJ (972,11 e 175,27 μ g/g, respectivamente) (Tabela 6). Da mesma maneira, a produção de 22 β -hidroximaitenina pelas raízes *in vitro* com 15 dias de cultivo (maior produção) foi 10,95 vezes maior do que as RPJ (488,44 e 44,612 μ g/g, respectivamente) (Tabela 6). Os resultados obtidos com *S. campestris* corroboram com outros estudos os quais também demonstram que células e tecidos cultivados *in vitro* produzem triterpenos em concentrações maiores que plantas *in natura*. Exemplos podem ser citados com as espécies *Centella asiatica* cujos calos e células em suspensão produziram triterpenos ursônicos em concentrações maiores que plantas *ex vitro* (JAMES et al., 2008) e *Maytenus ilicifolia* cuja cultura de células estabelecidas na presença de ácido naftaleno acético (ANA) e ácido 2,4–diclorofenoxiacético (2,4 D) evidenciaram maior produção de triterpenos quinonametídeos, em proporções de 3 a 100 vezes maior que a planta cultivada no campo (BUFFA FILHO et al., 2002; BULFFA FILHO et al., 2004).

Figura 35 — Cromatograma do extrato dos sistemas radiculares de plantas jovens (RPJ) (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)).



Contudo, outras investigações mostraram que tecidos cultivados *in vitro* também podem produzir triterpenos em concentrações menores que plantas *in*

natura (MATHUR et al., 1999; TANIGUCHI et al., 2002). Uma investigação comparando a produção do triterpeno ácido ursônico em calos e plantas cultivadas em casa de vegetação (4 anos de cultivo), da espécie *Salvia officinalis*, demonstrou que os calos produziram o composto de interesse em quantidade 100 vezes menor que as plantas *in natura* (BOLTA et al., 2000).

Em se tratando dos sistemas radiculares das plantas adultas de *S. campestris* coletadas em campo (RN), um comportamento diferenciado, não apenas quantitativo, mas também qualitativo foi observado. Esses sistemas produziram maitenina (TR = 14,1 min) (Figura 36) na concentração de 4452 µg/g de massa seca, cerca de 4,58 vezes superior a encontrada em RV (972,11 µg/g) e 25,4 vezes superior a encontrada em RPJ (175,27 µg/g). Um fato relevante é que as cascas dos sistemas radiculares (parte da planta responsável pelo maior acúmulo de TQs) das plantas adultas são muito mais espessas que das RPJ e, portanto, é esperada uma quantidade superior desses metabólitos. Além do estágio fenológico, outros fatores também podem influenciar no conteúdo de metabólitos secundários de plantas, tais como: sazonalidade; índice pluviométrico; temperatura, altitude, entre outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Figura 36 — Cromatograma do extrato do sistema radicular da planta coletada no campo (RN) (condições: Seção 3.3.5.2 (B) (M4)).

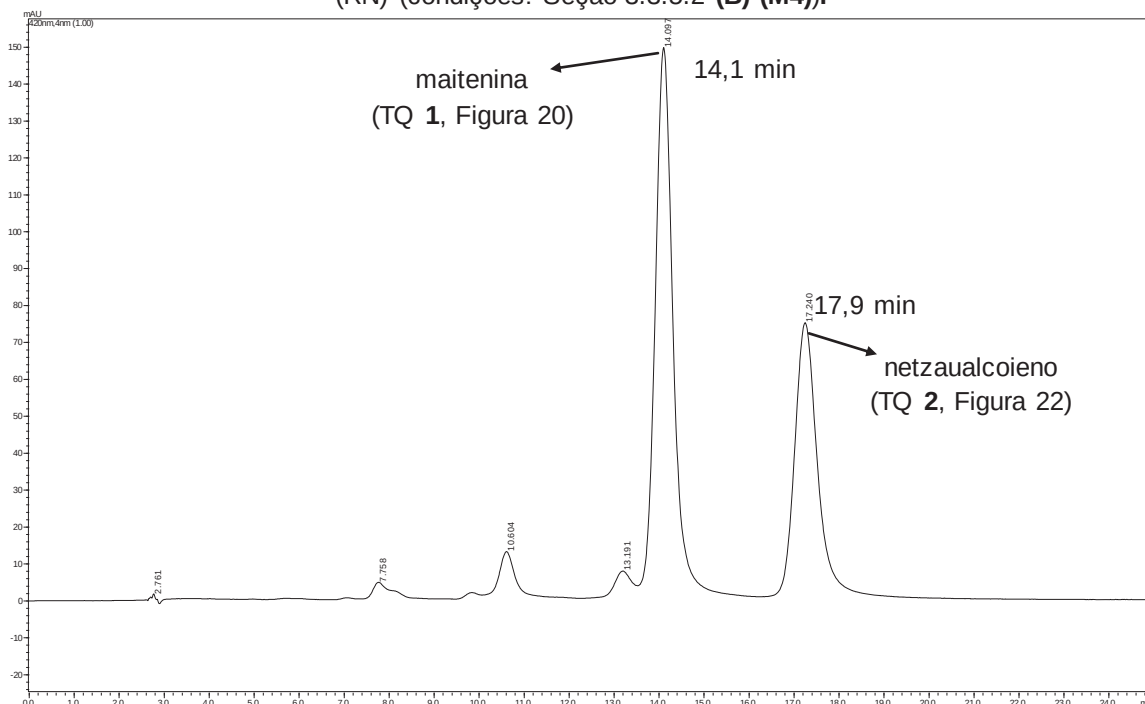
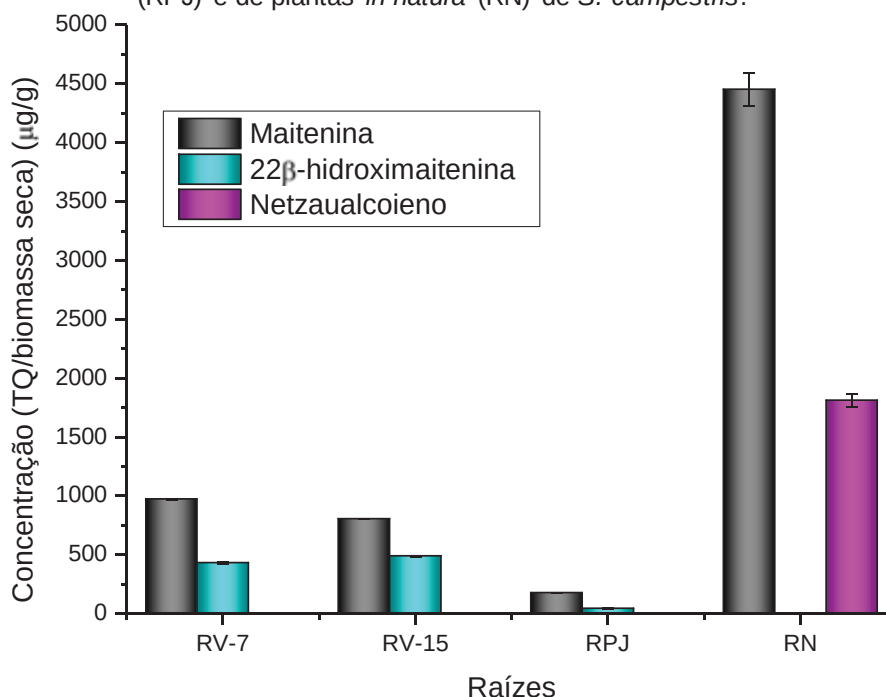


Figura 37 — Gráfico de comparação do teor de maitenina, 22 β -hidroximaitenina e netzauualcoieno nas raízes *in vitro* (RV), com 7 e 15 dias de crescimento e nos sistemas radiculares de plantas jovens (RPJ) e de plantas *in natura* (RN) de *S. campestris*.



A principal diferença entre os sistemas radiculares de plantas adultas coletadas e as RV e RPJ, além da diferença no teor de maitenina, é a ausência do 22 β -hidroximaitenina e a presença do netzauualcoieno (TQ 2, TR = 17,2 min) (Figura 36), sendo este último encontrado em concentração de 1810,1 $\mu\text{g/g}$. A explicação mais provável para essa diferença qualitativa de TQs entre as plantas adultas (RN) e as outras (RV e RPJ) é a existência de quimiotipos de *S. campestris*. Esta hipótese é reforçada por outros trabalhos realizados com a mesma espécie. Carvalho et al. (2005) isolaram de sistemas radiculares de *S. campestris* coletadas em habitat natural os mesmos quinonametídeos maitenina e netzauualcoieno, mas, além destes, também foram isolados 22 β -hidroximaitenina, salacina, 20 α -hidroximaitenina e pristimerina. Em outra investigação realizada com sistemas radiculares de *S. campestris ex vitro* foram isolados os TQs maitenina, netzauualcoieno, 22 β -hidroximaitenina, 20 α -hidroximaitenina, pristimerina e celastrol (LIÃO et al., 1994).

Trabalhos que relatam a existência de quimiotipos de plantas são amplamente encontrados na literatura (ANDERSON et al., 2010; APPENDINO et al., 2009; CHEHREGANI et al., 2010; CORREA et al., 2009; DESJARDINS, 2008; MOHSENZADEH et al., 2011; WOOLLARD et al., 2008). Um exemplo importante que pode ser citado é do estudo realizado com a espécie *Podophyllum peltatum*,

cujo objetivo principal foi desenvolver uma metodologia para avaliar fatores que poderiam influenciar na produção de lignanas o qual resultou na identificação de vários quimiotipos (MORAES et al., 2005). Schlag e McIntosh (2006) em estudo realizado com 10 populações de *Panax quinquefolius* evidenciaram que, dependendo do local de coleta, o acúmulo de triterpenos ginosídeos nas raízes das plantas variaram tanto quali- quanto quantitativamente. Esses resultados forneceram subsídios aos autores para concluir que essa diferença no conteúdo de triterpenos estava relacionado não a fatores ambientais, mas sim a existência de quimiotipos em *P. quinquefolius*.

Estimativa de produção de triterpenos quinonametídeos em escala a partir de raízes cultivadas *in vitro* de *S. campestris*

A partir dos dados obtidos nos experimentos realizados com as raízes cultivadas *in vitro* e com sistemas radiculares de plantas mantidas em casa de vegetação, é possível fazer uma estimativa aproximada de produção dos triterpenos quinonametídeos em escala. Em média, a biomassa seca de um sistema radicular de uma planta de *S. campestris*, advinda de semente, cultivada por um ano em casa de vegetação, foi de 0,50 g ($\pm 0,11$), assim o rendimento de maitenina e 22 β -hidroximaitenina por uma planta de *S. campestris* seria de 86,635 e 22,306 μ g, respectivamente.

Em contrapartida, se um explante de raiz de *S. campestris* pesando 1 g de massa fresca (81,9 mg de massa seca) for cultivado *in vitro* pelo mesmo período (1 ano), sendo repicado a cada 60 dias, acumulará uma biomassa seca de 0,93 g (aumento de massa de 11,37 vezes) e assim produzirá, no final de um ano, 811,32 μ g de maitenina e 292,12 μ g de 22 β -hidroximaitenina. Assim, por essa estimativa é possível inferir que raízes de *S. campestris* cultivadas *in vitro* produzem 9,36 e 13,1 vezes mais maitenina e 22 β -hidroximaitenina, respectivamente, do que plantas cultivadas em casa de vegetação. Além disso, é importante considerar que uma das maiores vantagens da cultura *in vitro* é não ser afetada por fatores ambientais, o que garante a produção contínua dos compostos de interesse.

4.3 Ensaios citotóxicos *in vitro*

Os resultados de IC_{50} dos ensaios citotóxicos realizados *in vitro* com os triterpenos quinonametídeos maitenina e netzauualcoieno e com as drogas controle paclitaxel e doxorubicina estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 — Valores de IC_{50} expressos em $\mu\text{g/mL}$ para os triterpenos quinonametídeos maitenina e netzauualcoieno e os controles positivos paclitaxel e doxorubicina.

Composto	Linhagem celular		
	HeLa	B16-F10	3T3
maitenina	4,0	2,0	2,0
netzauualcoieno	8,0	2,0	4,0
paclitaxel	4,0	4,0	4,0
doxorubicina	4,0	2,0	2,0

Para a linhagem tumoral de colo de útero HeLa, o terpeno maitenina foi duas vezes mais citotóxico que o netzauualcoieno. Em comparação com os controles positivos, frente à linhagem HeLa, a maitenina apresentou o mesmo nível citotóxico que os antibióticos paclitaxel e doxorubicina, demonstrando assim seu potencial farmacológico para esse tipo de câncer.

Frente à linhagem B16-F10, maitenina e netzauualcoieno mostraram-se tão citotóxicos quanto a droga controle doxorubicina, com IC_{50} de 2 $\mu\text{g/mL}$. Em comparação com paclitaxel, ambos quinonametídeos foram duas vezes mais citotóxicos para essas células tumorais do que o mesmo.

Em se tratando dos ensaios realizados com a linhagem 3T3, o triterpeno maitenina foi duas vezes mais citotóxico que o netzauualcoieno e o paclitaxel. Tendo em vista que a linhagem 3T3 são células normais, quanto maior concentração de ativo necessária para atingir o IC_{50} desta linhagem, maior é seu potencial para o desenvolvimento de um possível fármaco. Como os resultados indicaram que diminuir a viabilidade celular da linhagem 3T3 em 50% é necessário uma concentração de netzauualcoieno duas vezes superior a de maitenina, é possível inferir que o netzauualcoieno é menos citotóxico para células normais que maitenina e sendo assim, mais potencialmente interessante.

Com relação à seletividade das substâncias frente a linhagens tumorais e não tumorais, os resultados indicam que o netzauualcoieno é mais seletivo para a linhagem tumoral B16-F10 menos agressivo para a linhagem normal 3T3, sendo,

portanto, uma molécula que deve ser mais amplamente investigada como composto antitumoral.

5 CONCLUSÕES

Para a obtenção de raízes de *S. campestris in vitro* o explante mais adequado foi o endosperma cultivado em meio de cultura WPM semi-sólido, acrescido de AIB (4,0 mg/L) e PVP (100 mg/L), mantidos na ausência de luz.

As análises por injeção direta dos extratos em espectrômetro de massas (EM), utilizando a ionização química á pressão atmosférica (APCI) no modo positivo, foram muito eficientes na detecção dos triterpenos quinonametídeos.

Com relação à produção de triterpenos quinonametídeos, raízes cultivadas *in vitro* e plantas jovens mantidas em casa de vegetação, da espécie *S. campestris*, produziram maitenina e 22 β -hidroximaitenina, enquanto que plantas coletadas em seu habitat natural biosintetizaram maitenina e netzualcoieno.

O maior acúmulo de biomassa de raízes de *S. campestris* mantidas *in vitro* foi alcançado no período de 60 dias e os maiores teores de maitenina e 22 β -hidroximaitenina foram encontrados em 7 e 15 dias, respectivamente.

Raízes de *S. campestris* cultivadas *in vitro* produziram triterpenos quinonametídeos em concentrações maiores que sistemas radiculares de plantas jovens da espécie, cultivadas *ex vitro*, e que células em suspensão da espécie *Maytenus ilicifolia*, tida até então como uma das fontes mais promissoras desta classe de metabólitos secundários.

Os triterpenos quinonametídeos maitenina e 22 β -hidroximaitenina apresentaram atividades citotóxicas similares às das drogas antitumorais paclitaxel e doxorubicina frente às linhagens de células normais 3T3 (fibroblasto) e de células tumorais HeLa (cólon de útero) e B16-F10 (melanoma murino).

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N.; SAWAYA, A.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 6, p. 806-811, Nov./Dec. 2005.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 03 ago. 2011.
- AKASE, T.; SHIMADA, T.; HARASAWA, Y.; AKASE, T.; IKEYA, Y.; NAGAI, E.; IIZUKA, S.; NAKAGAMI, G.; IIZAKA, S.; SANADA, H.; ABURADA, M. Preventive effects of *Salacia reticulata* on obesity and metabolic disorders in TSOD mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-10, Apr. 2009. Disponível em: <<http://downloads.hindawi.com/journals/ecam/2011/484590.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2011.
- AKASHI, T.; FURUNO, T.; TAKAHASHI, T.; AYABE, S. Biosynthesis of triterpenoids in cultured cells, and regenerated and wild plant organs of *Taraxacum officinale*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 303-308, May 1994.
- ALÉCIO, A. C. **Utilização de cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas no estudo do perfil químico de espécies de Piperaceae, Rubiaceae, Lauraceae e Celastraceae**. 2005. 200 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- ALMEIDA, M. T. R.; RIOS-LUCI, C.; PADRON, J. M.; PALERMO, J. A. Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14-15, p. 1741-1748, Oct. 2010.
- ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from celastraceae. In: RAHMAN, A-U. (Ed.). **Studies in natural products chemistry: bioactive natural products (Part M)**. London: Elsevier, 2006. v. 33. p. 239-307.
- AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Biociência**, v. 6, n. 30, p. 55-59, jan.-jun. 2003. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br/revista/bio30/plantas.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2010.
- AMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Estabelecimento de culturas de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2009.

ANDERSON, S. A.; NORTHCOTE, P. T.; PAGE, M. J. Spatial and temporal variability of the bacterial community in different chemotypes of the New Zealand marine sponge *Mycale hentscheli*. **Fems Microbiology Ecology**, v. 72, n. 3, p. 328-342, June 2010.

ANISZEWSKI, T. Alkaloid chemistry. In: _____. **Alkaloids - secrets of life**: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Amsterdam: Elsevier Science, 2007. Cap. 2, p. 61-138.

ANKLI, A.; HEILMANN, J.; HEINRICH, M.; STICHER, O. Cytotoxic cardenolides and antibacterial terpenoids from *Crossopetalum gaumeri*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 5, p. 531-537, June 2000.

APPENDINO, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; ROMANO, A.; POLLASTRO, F.; AVONTO, C.; RUBIOLO, P. Genepolide, a sesterpene gamma-Lactone with a novel carbon skeleton from mountain wormwood (*Artemisia umbelliformis*). **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 340-344, Mar. 2009.

AZIZ, Z. A.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; ANTHONY, P.; SMITH, R. M.; LOWE, K. C. Production of asiaticoside and madecassoside in *Centella asiatica* *in vitro* and *in vivo*. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 34-42, Mar. 2007.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, abr. 2009.

BARRUETO CID, L. P.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Seed dormancy in trees of climax tropical vegetation types. **Tropical Ecology**, v. 46, n. 1, p. 17-28, 2005.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.)Taub. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, out./dez. 2006.

BOLTA, Z.; BARICEVIC, D.; BOHANEK, B.; ANDRENESEK, S. A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 62, n. 1, p. 57-63, July 2000.

BONFILL, M.; CUSIDO, R. M.; PALAZON, J.; PINOL, M. T.; MORALES, C. Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 68, n. 1, p. 73-78, Jan. 2002.

BROWN, P. M.; MOIR, M.; THOMSON, R. H.; KING, T. J.; KRISHNAM, V.; SESHADRI, T. R. Tingenone and hydroxytingenone, triterpenoid quinone methides from *Euonymus tingers*. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, n. 22, p. 2721-2725, 1973.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, É. P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido á-naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71, p.19-24, Ago. 2006.

BRUNING, R.; WAGNER, H. Übersicht über die celastraceen-inhaltsstoffe: chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. **Phytochemistry**, v. 17, n. 11, p. 1821-1858, März 1978.

BUFFA FILHO, W. **Estudo biossintético de triterpenos quinonametídeos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) e cascas das raízes de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) e *Salacia campestris* (Hippocrateaceae)**. 2005. 168 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

BUFFA FILHO, W.; CORSINO, J.; BOLZANI, V. D.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. Quantitative determination of cytotoxic friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 75-78, Mar./Apr. 2002.

BUFFA FILHO, W.; BOLZANI, V. D.; FURLAN, M.; PEREIRA, S. I. V.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. BUFFA, W. *In vitro* propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, part IV, p. 137-146, Sept. 2004.

CACERES-CASTILLO, D.; MENA-REJON, G. J.; CEDILLO-RIVERA, R.; QUIJANO, L. 21 beta-hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 1057-1064, Feb. 2008.

CARETTO, S.; SPETH, E. B.; FACHECHI, C.; GALA, R.; ZACHEO, G.; GIOVINAZZO, G. Enhancement of vitamin E production in sunflower cell cultures. **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 3, p. 174-179, Sept. 2004.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes a micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276578/1/DOC148.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2010.

CARVALHO, P. R. F. **Estudo químico, biológico e biossintético dos triterpenos quinonametídeos de *Salacia campestris***. 2002. 181 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinomethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 367-372, Mar. 2005.

CHANG, F. R.; HAYASHI, K.; CHEN, I. H.; LIAW, C. C.; BASTOW, K. F.; NAKANISHI, Y.; NOZAKI, H.; CRAGG, G. A.; WU, Y. C.; LEE, K. H. Antitumor agents. 228. Five new agarofurans, reissantins A-E, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1416-1420, Nov. 2003.

CHAVAN, S. P.; LOKHANDE, V. H.; NITNAWARE, K. M.; NIKAM, T. D. Influence of growth regulators and elicitors on cell growth and alpha-tocopherol and pigment productions in cell cultures of *Carthamus tinctorius* L. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1701-1707, Mar. 2011.

CHEHREGANI, A.; MOHSENZADEH, F.; MIRAZI, N.; HAJISADEGHIAN, S.; BAGHALI, Z. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Tripleurospermum disciforme* in three developmental stages. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 11, p. 1280-1284, Nov. 2010.

CHEN, B.; DUAN, H. Q.; TAKAISHI, Y. Triterpene caffeoyl esters and diterpenes from *Celastrus stephanotifolius*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 5, p. 683-687, July 1999.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 374-380, maio/jun. 2001.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 19, p. 16-21, mar./abr. 2001. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio19/19_3.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2010.

COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; DID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n.1, p. 38-48, jan. 2001.

CONFALONIERI, M.; CAMMARERI, M.; BIAZZI, E.; PECCHIA, P.; SALEMA FEVEREIRO, M. P.; BALESTRAZZI, A.; TAVA, A.; CONICELLA, C. Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel beta-amyrin synthase (AsOXA1) gene. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, n. 2, p. 172-182, Feb. 2009.

CONSTABEL, F.; TYLER, R. T. Cell culture for production of secondary metabolites. In: VASIL, K. I.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. Cap. 11, p. 271-290.

CORREA, H.; LUCIA VALENZUELA, A.; FERNANDO OSPINA, L.; DUQUE, C. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andres (SW Caribbean). **Journal of Inflammation-London**, v. 6, p. 1-10, Mar. 2009.

CORSINO, J.; BOLZANI, V. D. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C.; FURLAN, M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-140, May 1998a.

CORSINO, J.; ALECIO, A. C.; RIBEIRO, M. L.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B.; FRANCA, S. C. Quantitative determination of maitenin and 22 beta-hydroxymaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 245-247, Sept./Oct. 1998b.

CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F. de; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. D.; FRANCA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 741-748, Dec. 2000.

CUSTODIO, R.; ANDRADE, J. C. de; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 219-225, abr. 1997.

DELGADO-MENDEZ, P.; HERRERA, N.; CHAVEZ, H.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite Leishmania. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1425-1430, Feb. 2008.

DESJARDINS, A. E. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7587-7592, Sept. 2008.

DU, Y-C.; LIN, A-S.; WU, C-C.; HSIEH, P-W.; CHEN, Y-H.; CHEN, I. H.; CHEN, S-L.; YEN, H-F.; LUEBKEN, T.; CHANG, F-R.; WU, Y-C. New cytotoxic lupane triterpenes from *Perrottetia arisanensis*. **Planta Medica**, v. 75, n. 8, p. 848-855, June 2009.

DYMOWSKI, W.; FURMANOWA, M. Search for cytostatic substances in the tissues of *in vitro* cultured plants of the *Maytenus molina* genus. II. Chromatographic examination of the extracts from *Maytenus wallichiana* callus. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 47, n. 5-6, p. 51-54, 1990.

DYMOWSKI, W.; FURMANOWA, M. Search for cytostatic substances in the tissues of *Maytenus molina* plants *in vitro* cultures. III. Isolation of compounds from biologically active fractions of the *Maytenus wallichiana* callus extracts. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 49, n. 1-2, p. 29-33, 1992.

EL TAHIR, A.; IBRAHIM, A. M.; SATTI, G. M. H.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A.; KHALID, S. A. The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 8, p. 576-579, Dec. 1998.

ERIG, C. A.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de plantas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivares MC, Adans e Portugal. **Ciência Rural**, v. 8, n. 2, p.107-115, abr. 2003.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H. ; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 201-205, 1998.

FUJIOKA, N.; KOHDA, H.; YAMASAKI, K.; KASAL, R.; TANAKA, O.; SHOYAMA, Y.; NISHIOKA, I. Dammarane and oleanane saponins from callus tissue of *Panax japonicus*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 7, p. 1855-1858, Dec. 1989.

FULCHERI, C.; MORARD, P.; HENRY, M. Stimulation of the growth and the triterpenoid saponin accumulation of *Saponaria officinalis* cell and *Gypsophila paniculata* root suspension cultures by improvement of the mineral composition of the media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 2055-2061, May 1998.

GAMLATH, C. B.; GUNATILAKA, A. A. L.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T.; BALASUBRAMANIAM, S. Studies on terpenoids and steroids .21. Quinone-methide, phenolic and related triterpenoids of plants of Celastraceae - further evidence for the structure of celastranhydride. **Phytochemistry**, v. 29, n. 10, p. 3189-3192, Mar. 1990.

GEORGIEV, M. I.; KUZEVA, S. L.; PAVLOV, A. I.; KOVACHEVA, E. G.; ILIEVA, M. P. Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 301-304, Feb. 2007.

GEORGIEV, M. I.; WEBER, J.; MACIUK, A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 809-823, July 2009.

GEVRENOVA, R.; STANCHEVA, T.; VOYNIKOV, Y.; LAURAIN-MATTAR, D.; HENRY, M. Root *in vitro* cultures of six *Gypsophila* species and their saponin contents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 3, p. 97-104, Aug. 2010.

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

GONZALEZ, A. G.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L.; JIMÉNEZ, I. A. Ethnobotanical uses of celastraceae. Bioactive metabolites. In: RAHMAN, A-U. (Ed.). **Studies in natural products chemistry**. London: Elsevier Science, 2000. v. 23. p. 649-738.

GONZALEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G.; MOUJIR, L. Triterpene trimers from *Maytenus scutioides*: cycloaddition compounds? **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 8, p. 1185-1187, Aug. 1999.

GONZALEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; RAVELO, A. G.; JIMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L. Two triterpenes from *Maytenus canariensis*. **Journal of Natural Products-Lloydia**, v. 58, n. 4, p. 570-573, Apr. 1995.

GONZALEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. Structure and absolute configuration of triterpene dimers from *Maytenus scutioides*. **Tetrahedron**, v. 52, n. 28, p. 9597-9608, July 1996.

GONZALEZ, A. G.; FRANCISCO, C. G.; FREIRE, R.; HERNANDEZ, R.; SALAZAR, J. A.; SUAREZ, E. Iguesterin, a new quinonoid triterpene from *Catha cassinoides*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 4, p. 1067-1070, Sept. 1975.

GONZALEZ, A. G.; SANANDRES, L.; RAVELO, A. G.; LUIS, J. G.; JIMENEZ, I. A.; DOMINGUEZ, X. A. Minor constituents from *Orthosphenia mexicana*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1338-1341, Nov./Dec. 1989.

GONZALEZ, A. G.; KENNEDY, M. L.; RODRIGUEZ, F. M.; BAZZOCCHI, I. L.; JIMENEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; MOUJIR, L. Absolute configuration of triterpene dimers from *Maytenus* species (Celastraceae). **Tetrahedron**, v. 57, n. 7, p. 1283-1287, Feb. 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998. v.1, p.183-260.

GUNATILAKA, A. A. L.; FERNANDO, H. C.; KIKUCHI, T. Triterpenoid quinonemethides and related compounds (Celastraceae). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 67, p. 1-123, 1996.

HAMILTON, G. R.; BASKETT, T. F. In the arms of morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 47, n. 4, p. 367-374, Apr. 2000.

HAN, J. Y.; JUNG, S. J.; KIM, S. W.; KWON, Y. S.; YI, M. J.; YI, J. S.; CHOI, Y. E. Induction of adventitious roots and analysis of ginsenoside content and the genes involved in triterpene biosynthesis in *Panax ginseng*. **Journal of Plant Biology**, v. 49, n. 1, p. 26-33, Feb. 2006.

HAYASHI, H.; FUKUI, H.; TABATA, M. Examination of triterpenoids produced by callus and cell suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*. **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 7, p. 508-511, Dec. 1988.

HENDERSON, J. W. The yellow brick road to penicillin: a story of serendipity. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 72, n. 7, p. 683-687, July 1997.

IDRIS, A. I.; LIBOUBAN, H.; NYANGOGA, H.; LANDAO-BASSONGA, E.; CHAPPARD, D.; RALSTON, S. H. Pharmacologic inhibitors of I kappa B kinase suppress growth and migration of mammary carcinosarcoma cells *in vitro* and prevent osteolytic bone metastasis *in vivo*. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 8, p. 2339-2347, Aug. 2009.

IM, R.; MANO, H.; NAKATANI, S.; SHIMIZU, J.; WADA, M. Aqueous extract of kotahla himbutu (*Salacia reticulata*) stems promotes oxygen consumption and suppresses body fat accumulation in mice. **Journal of Health Science**, v. 54, n. 6, p. 645-653, Dec. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2011.

JAMES, J. T.; MEYER, R.; DUBERY, I. A. Characterisation of two phenotypes of *Centella asiatica* in Southern Africa through the composition of four triterpenoids in callus, cell suspensions and leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 94, n. 1, p. 91-99, July 2008.

JELLER, A. H. **Ocorrência e biossíntese de triterpenos quinometídeos em *cheiloclinium cognatum* miers (hippocrateaceae)**. 2003. 158 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

JELLER, A. H.; SILVA, D. H. S.; LIAO, L. M.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1977-1982, July 2004.

JOSHI, L.; VAN ECK, J. M.; MAYO, K.; DI SILVESTRO, R.; BLAKE, M. E.; GANAPATHI, T.; HARIDAS, V.; GUTTERMAN, J. U.; ARNTZEN, C. J. Metabolomics of plant saponins: bioprospecting triterpene glycoside diversity with respect to mammalian cell targets. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 6, n. 3, p. 235-246, July 2002.

JUNGHANS, T. G.; SANTOS-SEREJO, J. A. Obtenção e manuseio de explantes. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz Das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. Cap. 5, p. 98-113.

KALIDASS, C.; MOHAN, V. R.; DANIEL, A. Effect of auxin and cytokinin on vincristine production by callus cultures of *Catharanthus roseus* L. (apocynaceae). **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, n. 2, p. 283-288, May/Aug. 2010.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, Dec. 2009.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio01/1hp_11.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2010.

KHALID, S. A.; FRIEDRICHSEN, G. M.; CHRISTENSEN, S. B.; EL TAHIR, A.; SATTIC, G. M. Isolation and characterization of pristimerin as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. **Arkivoc**, Part IX, p. 129-134, Jan. 2007.

KIM, O-T.; BANG, K-H.; SHIN, Y-S.; LEE, M-J.; JUNG, S-J.; HYUN, D-Y.; KIM, Y-C.; SEONG, N-S.; CHA, S-W.; HWANG, B. Enhanced production of asiaticoside from hairy root cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban elicited by methyl jasmonate. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 11, p. 1941-1949, Nov. 2007.

KIM, Y. D.; KANG, S. M.; MIN, J. Y.; CHOI, W. K.; JEONG, M. J.; KARIGAR, C. S.; CHOI, M. S. Production of tropane alkaloids during de-differentiation of *Scopolia parviflora* Calli. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 2, p. 147-150, Feb. 2010.

KIONG, A. L. P.; MAHMOOD, M.; FADZILLAH, N. M.; DAUD, S. K. Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus cultures. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 8, p. 1160-1169, 2005.

KOLEWE, M. E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S. C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 243-256, Mar./Apr. 2008.

KOLLÁROVÁ, L.; LSKOVA, D.; KAKONIOVA, D.; LUX, A. Effect of auxins on *Karwinskia humboldtiana* root cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 79, n. 2, p. 213-221, Nov. 2004.

KOYAMA, Y.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; SHINZATO, T.; TAKEDA, Y. Microtropiosides A-F: *ent*-Labdane diterpenoid glucosides from the leaves of *Microtropis japonica* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 71, n. 5-6, p. 675-681, Apr. 2010.

KUTNEY, J. P.; BEALE, M. H.; SALISBURY, P. J.; STUART, K. L.; WORTH, B. R.; TOWNSLEY, P. M.; CHALMERS, W. T.; NILSSON, K.; JACOLI, G. G. Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of *Maytenus buchananii*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 653-657, Apr. 1981.

KUTNEY, J. P.; BEALE, M. H.; SALISBURY, P. J.; SINDELAR, R. D.; STUART, K. L.; WORTH, B. R.; TOWNSLEY, P. M.; CHALMERS, W. T.; DONNELLY, D. J.; NILSSON, K.; JACOLI, G. G. Triptadiolide from tissue culture of *Tripterygium wilfordii*. **Heterocycles**, v. 14, n. 10, p. 1465-1467, 1980.

LEE, B. W.; SEO, W. D.; YANG, M. S.; PARK, K. H. Quinone methide triterpenes from *Tripterygium regelii*. **Agricultural Chemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 77-80, June 2004.

LEE, M. H.; JEONG, J. H.; SEO, J. W.; SHIN, C. G.; KIM, Y. S.; IN, J. G.; YANG, D. C.; YI, J. S.; CHOI, Y. E. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 8, p. 976-984, Aug. 2004.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, July 2009.

LI, K. H.; DUAN, H. Q.; KAWAZOE, K.; TAKAISHI, Y. Terpenoids from *Tripterygium wilfordii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 791-796, June 1997.

LI, Z. H.; LIU, Z. J. Effect of NaCl on growth, morphology, and camptothecin accumulation in *Camptotheca acuminata* seedlings. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 83, n. 4, p. 931-938, Oct. 2003.

LIÃO, L. M. **Triterpenos quinona-metídeos de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae)**. 1994. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1994.

LIÃO, L. M. **Alcalóides sesquiterpênicos piridínicos e triterpenos quinonametídeos degradados de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae)**. 1997. 183 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.

LIÃO, L. M. Sesquiterpene pyridine alkaloids. In: CORDELL, G. (Ed.). **The alkaloids**. New York: Elsevier Science, 2003. v. 60, cap. 5, p. 287-343.

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

LOMBARDI, J. A. Notas nomenclaturais em Salacioideae (Celastraceae). **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 123-125, 2010.

LOMBARDI, J. A.; TEMPONI, L. G. **Flora dos estados de Goiás e Tocantins: Hippocrateaceae**. Goiânia: Ed. UFGO, 2000. 36 p. (Coleção Rizzo).

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

LUCZKIEWICZ, M.; ZARATE, R.; DEMBINSKA-MIGAS, W.; MIGAS, P.; VERPOORTE, R. Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. **Plant Science**, v. 163, n. 1, p. 91-100, July 2002.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: _____. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-181.

MARTIN, J. D. New diterpenoids extractives of *Maytenus dispermus*. **Tetrahedron**, v. 29, n. 17, p. 2553-2559, Mar. 1973.

MARTINOTTO, C.; PAVA, R.; SANTOS, B. R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1668-1671, nov./dez. 2007.

MATHUR, A.; MATHUR, A. K.; PAL, M.; UNİYAL, G. C. Comparison of qualitative and quantitative *in vitro* ginsenoside production in callus cultures of three *Panax* species. **Planta Medica**, v. 65, n. 5, p. 484-486, June 1999.

MEFTAHIZADE, H.; LOTFI, M.; MORADKHANI, H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 28, p. 4314-4321, July 2010.

MISHIBA, K. I.; OKAMOTO, T.; MILL, M. Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Physiologia Plantarum**, v. 112, n. 1, p. 142-148, May 2001.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C. Sm. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/50112335>>. Acesso em: 13 maio 2011.

MOHSENZADEH, F.; CHEHREGANI, A.; AMIRI, H. Chemical composition, antibacterial activity and cytotoxicity of essential oils of *Tanacetum parthenium* in different developmental stages. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 9, p. 920-926, Sept. 2011.

MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B.; COELHO, J. S. B.; LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I. L. Maitenin: a new antitumoral substance from *Maytenus* sp. **Gazzetta Chimica Italiana**, v.102, n. 4, p. 317-320, 1972.

MONACHE, F. D.; MARINIBETTOLO, G. B.; POMPONI, M.; DEMELLO, J. F.; LIMA, O. G. de ; THOMSON, R. H. New triterpene quinone-methides from hippocrateaceae. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, n. 12, p. 3127-3131, 1979.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65, n. 2, p. 171-175, Feb. 2002.

MORAES, R. M.; MOMM, H. G.; SILVA, B.; MADDOX, V.; EASSON, G. L.; LATA, H.; FERREIRA, D. Geographic information system method for assessing chemo-diversity in medicinal plants. **Planta Medica**, v. 71, n. 12, p. 1157-1164, Dec. 2005.

MORITA, H.; HIRASAWA, Y.; MUTO, A.; YOSHIDA, T.; SEKITA, S.; SHIROTA, O. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 1050-1052, Feb. 2008.

MOUJIR, L.; GUTIERREZNAVARRO, A. M.; GONZALEZ, A. G.; RAVELO, A. G.; LUIS, J. G. The relationship between structure and antimicrobial activity in quinones from the Celastraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 18, n. 1, p. 25-28, Apr. 1990.

MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W. M., MROGINSKI, L. A. (Ed). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. Cap. 2, p.19-40.

MUFFLER, K.; LEIPOLD, D.; SCHELLER, M-C.; HAAS, C.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; NEUHAUS, H. E.; MIRATA, M. A.; SCHRADER, J.; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 1-15, Jan. 2011.

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

NAKANO, K.; OOSE, Y.; MASUDA, Y.; KAMADA, H.; TAKAISHI, Y. A diterpenoid and triterpenes from tissue cultures of *Tripterygium wilfordii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 293-296, May 1997.

NGASSAPA, O.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M.; FARNSWORTH, N. R. Quinone-methide triterpenes and salaspermic acid from *Kokoona ochracea*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 1-8, Jan. 1994.

NIAMPOKA, C.; SUTTISRI, R.; BAVOVADA, R.; TAKAYAMA, H.; AIMI, N. Potentially cytotoxic triterpenoids from the root bark of *Siphonodon celastrineus* griff. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 5, p. 546-549, May 2005.

NOLETTO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 109-120, jul./dez. 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/copaiba.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

NOSSACK, A. C.; CELEGHINI, R. M. D.; LANÇAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. HPLC-UV and LC-MS analysis of quinonemethides triterpenes in hydroalcoholic extracts of "espíneira santa" (*Maytenus aquifolium* Martius, Celastraceae) leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 4, p. 582-586, jul./ago. 2004.

NÚÑEZ, M. J.; REYES, C. P.; JIMENEZ, I. A.; HAYASHI, H.; TOKUDA, H.; BAZZOCCHI, I. L. *ent*-Rosane and abietane diterpenoids as cancer chemopreventive agents. **Phytochemistry**, v. 72, n. 4-5, p. 385-390, Mar./Apr. 2011.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS (Espanha). Rafael, Z. M.; Angel Domingo, G. R. **Metodo de produccion de nor-triterpenos metilen-quinonas a partir de cultivos *in vitro* de explantes de *Maytenus canariensis***. ES 2352491, 23 Feb. 2009, 21 Feb. 2011. Disponível em: <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=ES&NR=2352491A1&KC=A1&FT=D&date=20110221&DB=EPODOC&locale=en_EP>. Acesso em: 28 maio 2011.

OKRSLAR, V.; PLAPER, I.; KOVAC, M.; ERJAVEC, A.; OBERMAJER, T.; REBEC, A.; RAVNIKAR, M.; ZEL, J. Saponins in tissue culture of *Primula veris* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 6, p. 644-651, Dec. 2007.

OLIVEIRA, A. L.; KIDO, W. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; KIDO, L. M. H. Efeito do estágio de maturação da semente na regeneração *in vitro* de *Vigna unguiculata* cv IPA201. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 66-68, jul. 2007.

ORAMAS-ROYO, S. M.; CHAVEZ, H.; MARTIN-RODRIGUEZ, P.; FERNANDEZ-PEREZ, L.; RAVELO, A. G.; ESTEVEZ-BRAUN, A. Cytotoxic triterpenoids from *Maytenus retusa*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 12, p. 2029-2034, Dec. 2010.

PALOMINO, G.; DOLEZEL, J.; CID, R.; BRUNNER, I.; MENDEZ, I.; RUBLUO, A. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term *in vitro* culture. **Plant Science**, v. 141, n. 2, p. 191-200, Feb. 1999.

PASQUA, G.; SILVESTRINI, A.; MONACELLI, B.; MULINACCI, N.; MENENDEZ, P.; BOTTA, B. Triterpenoids and ellagic acid derivatives from *in vitro* cultures of *Camptotheca acuminata* Decaisne. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 220-225, Apr. 2006.

PERESTELO, N. R.; JIMENEZ, I. A.; TOKUDA, H.; HAYASHI, H.; BAZZOCCHI, I. L. Sesquiterpenes from *Maytenus jelskii* as potential cancer chemopreventive agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 2, p. 127-132, Feb. 2010.

PHONGPRUEKSAPATTANA, S.; PUTALUN, W.; KEAWPRADUB, N.; WUNGSINTAWEEKUL, J. *Mitragyna speciosa*: hairy root culture for triterpenoid production and high yield of mitragynine by regenerated plants. **Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences**, v. 63, n. 9-10, p. 691-698, Sept./Oct. 2008.

PLETSCHI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 4, p. 12-15, jan./fev. 1998. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio04/4hp_4.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2011.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, May 2002.

RESHETNYAK, O. V.; CHERNYAK, N. D.; SMOLENSKAYA, I. N.; ORESHNIKOV, A. V.; SMIRNOVA, Y. N.; NOSOV, A. M. Comparative analysis of ginsenosides in different root parts and cultured cells from Chinese ginseng. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 1, p. 32-36, Jan. 2008.

RIBANI, M.; GRESPLAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

ROBERTS, S.; KOLEWE, M. Plant natural products from cultured multipotent cells. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 1175-1176, Nov. 2010.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Floresta**, v. 14, n. 1, p. 91-101, abr. 2004.

RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; FERNANDES, J. B.; BRAZ, R. Detection and identification of quinonemethide triterpenes in *Peritassa campestris* by mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 6, p. 627-633, Feb. 2002.

RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. da. Studies towards the detection and identification of sesquiterpene pyridine alkaloids in *Peritassa campestris* by mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 3, p. 185-193, May/June 2001.

ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C. Paclitaxel (Taxol). **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 15, p. 1004-1014, Apr. 1995.

SAITO, K.; MIZUKAMI, H. Plant cell cultures as producers of secondary compounds. In: OKSMAN-CALDENTEY, K-M.; BARZ, W. H. (Ed.). **Plant biotechnology and transgenic plants**. New York: Marcel Dekker, 2002. Cap. 5, p. 66-92.

SALES, D. M.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; COELHO, M. F. B.; PIMENTA, S. M.; FAVALESSA, O. Germinação de sementes de *Brosimum gaudichaudii* Trec., submetidas a diferentes pré-tratamentos. **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 137-140, 2002.

SALOMÃO, A. N.; SOUSA-SILVA, J. C.; DAVIDE, A. C.; GONZÁLES, S.; TORRES, R. A. A.; WETZEL, M. M. V. S.; FIRETTI, F.; CALDAS, L. S. **Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do cerrado**. Brasília, DF: Rede de Sementes do Cerrado, 2003. 96 p.

SANTOS, V. A. F. F. M. **Avaliação da capacidade antioxidante e possíveis associações sinérgicas de quinonametóides e substâncias fenólicas em *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)**. 2006. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

SANTOS, V. A. F. F. M. **Aspectos metabólico, biológico e proteômico de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris* (Celastraceae)**. 2010. 265 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SARDAR, D.; KOLE, R. K. Metabolism of chlorpyrifos in relation to its effect on the availability of some plant nutrients in soil. **Chemosphere**, v. 61, n. 9, p. 1273-1280, Dec. 2005.

SATTAR, E. A.; EL-OLEMY, M. M.; ELHAG, H.; GOHAR, A.; MOSSA, J. S.; NAHRSTEDT, A. Quinone-methide triterpenes from tissue cultures of *Catha edulis*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 6, n. 3-4, p. 242-245, 1998.

SCHLAG, E. M.; McINTOSH, M. S. Ginsenoside content and variation among and within American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) populations. **Phytochemistry**, v. 67, n. 14, p. 1510-1519, July 2006.

SCHWEINGRUBER, F. H.; BÖRNER, A.; SCHULZE, D. **Atlas of stem anatomy in herbs, shrubs and trees**: an ecological and systematic approach. Berlin: Springer, 2011. 503 p.

SEO, H. R.; SEO, W. D.; PYUN, B.-J.; LEE, B. W.; JIN, Y. B.; PARK, K. H.; SEO, E.-K.; LEE, Y.-J.; LEE, Y.-S. Radiosensitization by celastrol is mediated by modification of antioxidant thiol molecules. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, n. 1, p. 34-42, Aug. 2011.

SEO, S.; TOMITA, Y.; TORI, K. Biosynthesis of oleanene- and ursene-type triterpenes from [4-¹³C]mevalonic acid in tissue cultures of *Isodon japonicus* Hara. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, n. 8, p. 270-271, 1975.

SETZER, W. N.; HOLLAND, M. T.; BOZEMAN, C. A.; ROZMUS, G. F.; SETZER, M. C.; MORIARTY, D. M.; REEB, S. Isolation and frontier molecular orbital investigation of bioactive quinone-methide triterpenoids from the bark of *Salacia petenensis*. **Planta Medica**, v. 67, n. 1, p. 65-69, Feb. 2001.

SHABANI, L.; EHSANPOUR, A. A.; ASGHARI, G.; EMAMI, J. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 56, n. 5, p. 621-626, Sept./Oct. 2009.

SHIM, J.-S.; LEE, O. R.; KIM, Y.-J.; LEE, J.-H.; KIM, J.-H.; JUNG, D.-Y.; IN, J.-G.; LEE, B.-S.; YANG, D.-C. Overexpression of PgSQS1 increases ginsenoside production and negatively affects ginseng growth rate in *Panax ginseng*. **Journal of Ginseng Research**, v. 34, n. 2, p. 98-103, Mar. 2010.

SHIROTA, O.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Two cangorosin A type triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 9, p. 1148-1150, Sept. 2004.

SILVA, M. L. **Germinação *in vitro*, ontogenia de gemas radiculares e brotos adventícios de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes-Rubiaceae**. 2003. 62 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

SILVA, S.; SILVA, G. D. F.; BARBOSA, L. C. A.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Lupane pentacyclic triterpenes isolated from stems and branches of *Maytenus imbricata* (Celastraceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, n. 5, p. 1102-1109, May 2005.

SIMMONS, M. P. Celastraceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, 2004. v. 6, p. 29-64.

SIMMONS, M. P.; CLEVINGER, C. C.; SAVOLAINEN, V.; ARCHER, R. H.; MATHEWS, S.; DOYLE, J. J. Phylogeny of the Celastraceae inferred from phytochrome B gene sequence and morphology. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 2, p. 313-325, Feb. 2001.

SKRZYPEK, Z.; WYSOKINSKA, H. Sterols and triterpenes in cell culture of *Hyssopus officinalis* L. **Zeitschrift fur Naturforschung Teil C Biochemie Biophysik Biologie Virologie**, v. 58, n. 5-6, p. 308-312, May/June 2003.

SMOLENSKAYA, I. N.; RESHETNYAK, O. V.; NOSOV, A. V.; ZORINIANTS, S. E.; CHAIKO, A. L.; SMIRNOVA, Y. N.; NOSOV, A. M. Ginsenoside production, growth and cytogenetic characteristics of sustained *Panax japonicus* var. Repens cell suspension culture. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 2, p. 235-241, June 2007.

SOTANAPHUN, U.; SUTTISRI, R.; LIPIPUN, V.; BAVOVADA, R. Quinone-methide triterpenoids from *Glyptopetalum sclerocarpum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1749-1755, Nov. 1998.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; COSTA, M. A. P. C. Micropropagação. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz Das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. Cap. 2, p. 38-50.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, nov./dez. 2006.

STEPAN-SARKISSIAN, G. Selection of media for tissue and cell culture. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J. M. (Ed.). **Methods in molecular biology**: plant cell and tissue culture. New York: Humana Press, 1990. v. 6, cap. 1, p. 1-12.

STEPAN-SARKISSIAN, G.; GREY, D. Growth determination and medium analysis. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J. M. (Ed.). **Methods in molecular biology**: plant cell and tissue culture. New York: Humana Press, 1990. v. 6, cap. 2, p. 13-28.

STRAUSS, A.; SPENGEL, S. M.; SCHAFFNER, W. Saponins from root cultures of *Phytolacca acinosa*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 861-865, Mar. 1995.

SUN, I. C.; KASHWADA, Y.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. Plant-derived terpenoids and analogues as anti-HIV agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 155-169, 2003.

SUNG, B.; PARK, B.; YADAV, V. R.; AGGARWAL, B. B. Celastrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 15, p. 11498-11507, Apr. 2010.

SZAKIEL, A.; GRZELAK, A.; DUDEK, P.; JANISZOWSKA, W. Biosynthesis of oleanolic acid and its glycosides in *Calendula officinalis* suspension culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 271-275, Mar. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TAKAISHI, Y.; WARIISHI, N.; TATEISHI, H.; KAWAZOE, K.; NAKANO, K.; ONO, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; IWASHIMA, A. Triterpenoid inhibitors of interleukin-1 secretion and tumour-promotion from *Tripterygium wilfordii* var. *regelii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 969-974, July 1997.

TAKAZAWA, H.; YOSHIMURA, K.; IKUTA, A.; KAWAGUCHI, K. Production of triterpenes from the callus tissues of actinidiaceous plants. **Plant Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 181-186, Feb. 2002.

TANAKA, N.; OOBA, N.; DUAN, H. Q.; TAKAISHI, Y.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K.; LEE, K. H. Kaurane and abietane diterpenoids from *Tripterygium doianum* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2071-2076, July 2004.

TANIGUCHI, S.; IMAYOSHI, Y.; KOBAYASHI, E.; TAKAMATSU, Y.; ITO, H.; HATANO, T.; SAKAGAMI, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; SUGITA, D.; SHIMURA, S.; YOSHIDA, T. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 315-323, Feb. 2002.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/index.htm> Acesso em: 25 jul. 2010.

TOKER, G.; MEMISOGLU, M.; TOKER, M. C.; YESILADA, E. Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7-8, p. 618-623, Dec. 2003.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TORRES-ROMERO, D.; KING-DIAZ, B.; JIMENEZ, I. A.; LOTINA-HENNSSEN, B.; BAZZOCCHI, I. L. Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1331-1335, Aug. 2008.

TROTT, A.; WEST, J. D.; KLAIC, L.; WESTERHEIDE, S. D.; SILVERMAN, R. B.; MORIMOTO, R. I.; MORANO, K. A. Activation of heat shock and antioxidant responses by the natural product celastrol: transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 3, p. 1104-1112, Mar. 2008.

UNITED STATES PATENT (United States). Chalmers, W.T.; Kutney, J. P.; Salisbury, P. J.; Stuart, K. L.; Townsley, P. M.; Worth, B. R. **Method for producing triptolide, triptolide and celastrol**. US 4328309, 2 July 1980, 4 May 1982. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4328309.pdf>>. Acesso em: 28 maio 2011.

WANG, J. W.; XIA, Z. H.; CHU, J. H.; TAN, R. X. Simultaneous production of anthocyanin and triterpenoids in suspension cultures of *Perilla frutescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 7, p. 651-656, June 2004.

WANG, Z. Y.; ZHONG, J. J. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 2, p. 93-97, Nov. 2002.

WENG, J-R.; YEN, M-H. New dihydroagarofuranoid sesquiterpenes from *Celastrus paniculatus*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, n. 9, p. 1716-1724, Sept. 2010.

WIKTOROWSKA, E.; DLUGOSZ, M.; JANISZOWSKA, W. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 14-20, Jan. 2010.

WOOLLARD, J. M. R.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T.; VAN KLINK, J. W. Bullatenone, 1,3-dione and sesquiterpene chemotypes of *n* species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1313-1318, Apr. 2008.

WU, C. C.; CHAN, M. L.; CHEN, W. Y.; TSAI, C. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 8, p. 1277-1285, Aug. 2005.

XIA, W. J.; LI, D. R.; SHI, L.; TU, Y. Q. A novel approach for construction of the naturally occurring dihydroagarofuran sesquiterpene skeleton. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 4, p. 627-630, Jan. 2002.

XU, J.; GE, X.; DOLAN, M. C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 278-299, May/June 2011.

YELANI, T.; HUSSEIN, A. A.; MEYER, J. J. M. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 15, p. 1418-1425, Feb. 2010.

YOON, H. J.; KIM, H. K.; MA, C. J.; HUH, H. Induced accumulation of triterpenoids in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures using a yeast elicitor. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 13, p. 1071-1075, July 2000.

YU, K. W.; MURTHY, H. N.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 53-56, Mar. 2005.

ZHONG, J. J.; ZHANG, Z. Y. High-density cultivation of *Panax notoginseng* cell cultures with methyl jasmonate elicitation in a centrifugal impeller bioreactor. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 5, p. 471-474, Oct. 2005.