



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Débora de Aguiar Lage

**Desenvolvimento de sistemas *in vitro* visando à produção de plantas,
culturas celulares e metabólitos com potencial antioxidante e antineoplásico
de *Pereskia aculeata* Mill.**

Rio de Janeiro

2015

Débora de Aguiar Lage

Desenvolvimento de sistemas *in vitro* visando à produção de plantas, culturas celulares e metabólitos com potencial antioxidante e antineoplásico de *Pereskia aculeata* Mill.

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Norma Albarello

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Katia C. C. Sabino

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

L174 Lage, Débora de Aguiar.
Desenvolvimento de sistemas *in vitro* visando à produção de plantas,
culturas celulares e metabólitos com potencial antioxidante e antineoplásico
de *Pereskia aculeata* Mill. / Débora de Aguiar Lage. - 2015.
221f.

Orientação: Norma Albarello.

Coorientação: Kátia C. C. Sabino.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa
de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

1. Plantas medicinais - Propagação *in vitro* - Teses. 2. Plantas - Teses.
I. Albarello, Norma. II. Sabino, Kátia C. C. III. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial desta
dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Débora de Aguiar Lage

Desenvolvimento de sistemas *in vitro* visando à produção de plantas, culturas celulares e metabólitos com potencial antioxidante e antineoplásico de *Pereskia aculeata* Mill.

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal.

Aprovada em 13 de agosto de 2015.

Orientadoras:

Prof^ª. Dra. Alice Sato
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dra. Kátia C. C. Sabino
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Alice Sato
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Maria da Graça Justo Araújo
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Geórgia Pacheco Peters de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Norma Albarello
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Ao Chuck, meu amor.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Norma Albarello pelo apoio, pela confiança no meu trabalho, dedicação e por todo carinho recebido ao longo destes muitos anos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan - NBV).

À minha querida co-orientadora Kátia Sabino pela paciência, dedicação e por me receber com tanto carinho no laboratório.

Ao professor Alexandre Gabriel Christo (*in memoriam*) pela indicação e identificação da espécie foco deste trabalho.

Aos professores do PGBV/UERJ, Adriano, Claudia, Georgia, José Carlos, Marsen, Norma, Rachel e à querida professora Vânia, pela dedicação e qualidade das disciplinas.

À FAPERJ pelo apoio financeiro ao projeto “Produção e avaliação de plantas e metabólitos de interesse medicinal obtidos *in vivo* e *in vitro*”, no qual a presente tese está inserida.

À Noeli Pinheiro, do Sítio flora Bioativas (Porto Belo - SC), pela generosidade e doação dos frutos de *Pereskia aculeata* para a realização deste trabalho.

À minha querida amiga Tatiana Castro, Farmacêutica do Labplan, pela amizade, auxílio nas atividades do laboratório, pelas conversas, risadas, enfim, muito obrigada por tudo.

À Bióloga do Labplan, Claudia Simões-Gurgel pela alegria, disposição e exemplo de quem ama o que faz.

Ao Farmacêutico do LPPN, Eduardo Fonseca, pelo auxílio na realização das análises fitoquímicas.

A todos os amigos do Labplan, Ivan, Livia, Grazi, Thiago, Anna Flávia, Brenda, Cecília, Adriana, Francisca, Luciano e Victor, pelas brincadeiras, risadas e desabafos durante todos estes anos. Em especial aos alunos de iniciação científica Matheus e Shade pela parceria ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os membros do laboratório LIA-BPPN por me fazerem sentir em casa em tão pouco tempo. Em especial aos queridos Paulinho, Shirley, Fernanda, Rachel, Mariana e Beto.

Aos meus mais novos amigos de infância Thiago, Letícia e Girlaine por toda paciência, dedicação e auxílio na realização dos experimentos. Muito obrigada por tudo! Vocês contribuíram para que o final do meu doutorado fosse um momento de muito aprendizado associado a muita alegria e companheirismo.

Aos queridos amigos do CAP-UERJ, Lincoln Silva, Andrea Fernandes, Lúcia Facco e Atílio Grigoli, pelo carinho e pela parceria de sempre.

À minha mãe Tereza Cristina e à minha irmã Joyce por compreenderem a minha ausência, as minhas ideias e por me apoiarem em tudo.

Ao Chuck, que junto com os nossos filhos Mamão e Amora, me cobriu de muito amor e carinho, especialmente nos momentos mais difíceis. Obrigado por me amar tanto!

Obrigada a todos que passaram pela minha vida até agora e contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Sou como você me vê.
Posso ser leve como uma brisa ou forte como uma ventania,
depende de quando e como você me vê passar.

Clarice Lispector

RESUMO

LAGE, D. A. **Desenvolvimento de sistemas *in vitro* visando à produção de plantas, culturas celulares e metabólitos com potencial antioxidante e antineoplásico de *Pereskia aculeata* Mill.** 2015. 221f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Técnicas biotecnológicas têm sido usadas para a produção de plantas e metabólitos secundários de interesse, em larga escala, contribuindo para o uso sustentável da biodiversidade. Adicionalmente, o aumento da incidência de câncer associado aos efeitos colaterais causados pelo tratamento quimioterápico tradicional tem impulsionado as pesquisas científicas para a descoberta de novos fármacos de origem natural. Espécies de Cactaceae são reconhecidas como fontes de vitaminas, proteínas e sais minerais, ricas em substâncias bioativas, sendo consideradas alimentos funcionais. Conhecida como ora-pro-nóbis, *Pereskia aculeata* Mill. é um cacto nativo que apresenta alto valor nutritivo e propriedades medicinais. Este trabalho objetivou o estabelecimento de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *P. aculeata* visando à produção de metabólitos de importância medicinal e nutracêutica, com ênfase no potencial antineoplásico. A germinação *in vitro* foi estabelecida, fornecendo explantes epicotiledonares usados na propagação *in vitro* da espécie. Brotos proliferados em meio MS suplementado com BA foram enraizados *in vitro* e aclimatizados com sucesso. Elevadas taxas de proteínas totais foram determinadas em folhas de plantas de campo e aclimatizadas. Culturas de calos (CC) pigmentados foram estabelecidas a partir de segmentos de hipocótilo mantidos em meio MS contendo Picloram. A modificação no meio MS em relação ao conteúdo total e à fonte de nitrogênio favoreceu a otimização de biomassa calogênica pigmentada. Culturas de células em suspensão (CCS) foram estabelecidas a partir de calos friáveis pigmentados cultivados em meio líquido de mesma composição. Os pigmentos foram caracterizados como betalaínas. CC e CCS pigmentadas foram submetidas à extração e quantificação de betalaínas totais. Alta produção de betalaínas foi verificada nas CCS cultivadas em meio MS modificado. Extratos metanólicos foram obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e culturas *in vitro* de *P. aculeata*. A ação antioxidante da espécie foi demonstrada por meio da captura do radical DPPH, da capacidade quelante de ferro II e redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. O potencial antitumoral de *P. aculeata* foi verificado em diferentes linhagens de células neoplásicas. A amostra obtida de folhas de campo apresentou alta citotoxicidade sobre as linhagens leucêmicas K562 e Jurkat. O potencial medicinal da espécie foi associado à presença de betalaínas e polifenóis, determinados por CLAE-UV-MS-IES. Os resultados alcançados confirmam o potencial nutracêutico de *P. aculeata* em materiais produzidos *in vitro*, revelam a atividade antineoplásica da espécie em linhagens ainda não investigadas e viabilizam métodos de exploração da espécie a partir da biotecnologia vegetal.

Palavras-chave: Ora-pro-nóbis. Cultura *in vitro*. Betalaínas. Atividade antioxidante. Potencial antitumoral. Cactaceae.

ABSTRACT

LAGE, D. A. ***In vitro* system development aimed at production of plants, cell cultures and metabolites with antioxidant and anticancer potential of *Pereskia aculeata* Mill.** 2015. 221f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Biotechnological techniques have been used for large-scale production of plants and secondary metabolites of interest, contributing to the sustainable use of biodiversity. Additionally, the increased incidence of cancer associated with adverse effects induced by traditional chemotherapy has leading scientific research to search for new drugs of natural origin. Species from the Cactaceae family are recognized as sources of vitamins, proteins and minerals, rich in bioactive substances, and they may be considered as functional foods. Commonly known as “ora-pro-nobis”, *Pereskia aculeata* Mill. is a native cactus with high nutritional value and medicinal properties. This study aimed the establishment of different *in vitro* culture systems for *P. aculeata* to produce metabolites of medicinal and nutraceutical significance, focusing on anticancer potential. *In vitro* germination was established and provided epicotyl explants used in the micropropagation of the species. Buds proliferated on MS medium supplemented with BA were *in vitro* rooted and successfully acclimatized. High rates of total protein were determined in leaves from field and acclimatized plants. Pigmented callus cultures (PCC) were established from hypocotyl segments kept on MS medium containing Picloram. Modifications in the composition of MS medium with respect to the total content and the nitrogen source favored to optimize the pigmented calogenic biomass. Cell suspension cultures (CSC) were established from pigmented friable callus grown in liquid medium of the same composition. The pigments were characterized as betalains. PCC and CSC were submitted to extraction and quantification of total betalains. High production of betalains was verified in CSC grown in modified MS. Methanolic extracts were obtained from acclimatized and field plants, and from *in vitro* cultures of *P. aculeata*. The antioxidant action of the species was demonstrated by scavenging the DPPH radical, iron II chelating capacity and reduction of reactive oxygen species and nitric oxide levels. The anticancer potential of *P. aculeata* was observed in different strains of neoplastic cells. The field leaf sample showed high cytotoxicity on K562 and Jurkat leukemia cell lines. The medicinal potential of the species was associated with the presence of betalains and polyphenols, determined by HPLC-UV-MS ESI. The results confirm the nutraceutical potential of *P. aculeata* from *in vitro* produced materials, reveal the antitumor activity for tumor cell lines still not investigated and make possible the species exploration by plant biotechnology.

Keywords: Ora-pro-nobis. *In vitro* culture. Betalains. Antioxidant activity. Antitumor potential. Cactaceae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Diversidade entre as espécies da família Cactaceae.....	24
Figura 2 -	Distribuição geográfica dos cactos basais.....	26
Figura 3 -	Distribuição geográfica do gênero <i>Pereskia</i>	29
Figura 4 -	<i>Pereskia aculeata</i> Miller.....	30
Figura 5 -	Potencial antitumoral reportado para diferentes espécies da família Cactaceae.....	41
Figura 6 -	Esquema representando as diferentes vias de produção de radicais livres e geração do estresse oxidativo.....	43
Figura 7 -	Reação entre o íon Cu^{2+} presente no reagente de biureto com os grupamentos amina dos aminoácidos.....	55
Figura 8 -	Amostras de <i>Pereskia aculeata</i> Mill.....	57
Figura 9 -	Germinação <i>in vitro</i> de sementes <i>P. aculeata</i> submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação ao longo de 10 semanas de cultivo em meio MS0.....	58
Figura 10 -	Germinação <i>in vitro</i> e desenvolvimento pós seminal de <i>P. aculeata</i> em meio básico MS sem fitorreguladores, ao longo de sete semanas de cultivo.....	59
Figura 11 -	Porcentagem de regeneração de brotos de <i>P. aculeata</i> a partir de explantes nodais cultivados em meios básicos MS ou B5 suplementados com diferentes concentrações de BA ou KIN.....	61
Figura 12 -	Número de brotos produzidos por explante nodal de <i>P. aculeata</i> cultivado em meios MS ou B5 suplementado com diferentes concentrações de BA ou KIN.....	62
Figura 13 -	Taxa de regeneração de brotos de <i>P. aculeata</i> cultivados em meios básicos MS e B5 suplementados com BA ou KIN ao longo das quatro subculturas.....	65
Figura 14 -	Número de brotos produzidos a partir da multiplicação de gemas axilares em meios básicos MS e B5 suplementados com diferentes concentrações de BA e KIN ao longo das quatro subculturas.....	66
Figura 15 -	Micropropagação de <i>Pereskia aculeata</i>	67
Figura 16 -	Biossíntese de betalainas.....	72

Figura 17 -	Proliferação de raízes adventícias a partir de explantes de folha cotiledonar de <i>P. aculeata</i> cultivados em meio MS suplementado com ANA, após três subcultivos.....	92
Figura 18 -	Explantes foliares de <i>P. aculeata</i> após 63 dias de cultivo em meio básico MS contendo diferentes concentrações de 2,4-D.....	93
Figura 19 -	Pequena formação de calos friáveis a partir da base dos explantes hipocotiledonares de <i>P. aculeata</i> cultivados em meios contendo 2,4-D, após três subculturas.....	93
Figura 20 -	Respostas morfogênicas apresentadas pelos segmentos de folha cotiledonar de <i>P. aculeata</i> cultivados em meios de cultura MS contendo 2,4-D, após três subculturas.....	94
Figura 21 -	Formação de calos friáveis pigmentados a partir de explantes foliares de <i>P. aculeata</i> cultivados em meios MS suplementados com diferentes concentrações de Picloram, após 63 dias de cultivo.....	95
Figura 22 -	Calogênese em explantes de folha cotiledonar de <i>P. aculeata</i> cultivados durante 63 dias em meios MS suplementados com Picloram.....	96
Figura 23 -	Produção de calos friáveis pigmentados a partir de explantes hipocotiledonares de <i>P. aculeata</i> mantidos em meios MS suplementados com Picloram, após três subculturas.....	97
Figura 24 -	Influência da associação entre o fitorreguladores Picloram e BA sobre a calogênese em <i>P. aculeata</i> , após 63 dias de cultura.....	99
Figura 25 -	Calogênese em <i>P. aculeata</i> a partir de explantes de hipocótilo cultivados em meios MS contendo a associação entre Picloram e KIN em diferentes concentrações, após três subculturas.....	100
Figura 26 -	Massas calogênicas selecionadas a partir de calos proliferados em meios MS suplementados com Picloram, mantidas por três semanas em culturas estoque.....	101
Figura 27 -	Culturas de calos pigmentados e não pigmentados de <i>P. aculeata</i> mantidas em meio básico MS ½ suplementadas com 10 µM de Picloram, após oito subculturas.....	102
Figura 28 -	Alterações na coloração de pigmentos em massas calogênicas submetidas a atmosferas com variação de pH.....	103

Figura 29 - Calos cultivados de <i>P. aculeata</i> em meio HB suplementados com Picloram, após 63 dias de cultivo.....	104
Figura 30 - Alta produção de biomassa calogênica pigmentada de <i>P. aculeata</i> nas culturas mantidas em meios MS suplementados com 10 µM de Picloram, contendo 30 mM de nitrogênio total e alterações na razão amônio e nitrato, após três subculturas.....	105
Figura 31 - Acúmulo de biomassa ao longo do crescimento das culturas de células em suspensão de <i>P. aculeata</i> mantidas em meio MS ½ + 10 µM de Picloram.....	106
Figura 32 - Cultura de células em suspensão de <i>P. aculeata</i> em meio MS suplementado com 10 µM de Picloram, após 15 dias de cultivo.....	108
Figura 33 - Produção de betalaínas totais ao longo do crescimento das culturas de células em suspensão de <i>P. aculeata</i> mantidas em meio MS ½ + 10 µM de Picloram.....	110
Figura 34 - Reações de produção de radicais livres na célula.....	122
Figura 35 - <i>Pereskia aculeata</i> cultivada <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	125
Figura 36 - Reação de oxirredução entre o antioxidante BHT (di-terc-butil metil fenol) e o radical DPPH.....	126
Figura 37 - Atividade quelante do reagente ferrozina [3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina] com o ferro II.....	128
Figura 38 - Mecanismo de ação da sonda DCFH-DA para determinação de ERO.....	130
Figura 39 - Reação de Griess utilizada para a dosagem da produção de nitrito.....	131
Figura 40 - Princípio do ensaio de citotoxicidade utilizando o reagente MTT.....	132
Figura 41 - Porcentagem de captura do radical DPPH em diferentes extratos metanólicos obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e culturas <i>in vitro</i> de <i>P. aculeata</i>	137
Figura 42 - Capacidade quelante de ferro II nos diferentes extratos metanólicos obtidos a partir de plantas de campo, aclimatização e culturas <i>in vitro</i> de <i>P. aculeata</i>	139
Figura 43 - Efeito protetor do extrato caulinar de plantas aclimatizadas contra a produção de ERO em células RAW 264.7 de um experimento representativo, mostrado em histogramas de intensidade de fluorescência da sonda DCFA-DA.....	141

Figura 44 -	Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) da sonda DCFH-DA para a determinação intracelular de ERO em células RAW 264.7.....	142
Figura 45 -	Avaliação da inibição da produção de NO pelas células RAW 264.7, após tratamento com diferentes amostras de <i>P. aculeata</i> obtidas a partir de plantas de campo, aclimatizadas em culturas <i>in vitro</i>	144
Figura 46 -	Avaliação da atividade citotóxica dos extratos metanólicos obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e culturas <i>in vitro</i> de <i>P. aculeata</i> sobre macrófagos da linhagem RAW 264.7.....	146
Figura 47 -	Avaliação da atividade citotóxica dos extratos metanólicos obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e culturas <i>in vitro</i> de <i>P. aculeata</i> sobre linhagens celulares leucêmicas.....	147
Figura 48 -	Avaliação da atividade citotóxica dos extratos metanólicos de <i>P. aculeata</i> obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e em culturas <i>in vitro</i> sobre diferentes linhagens celulares obtidas de tumores sólidos.....	148
Figura 49 -	Efeito da concentração do extrato metanólico de <i>P. aculeata</i> de folhas de plantas de campo na atividade citotóxica sobre as linhagens leucêmicas K562 e Jurkat.....	149
Figura 50 -	Avaliação da atividade citotóxica do extrato metanólico de <i>P. aculeata</i> obtido de folhas de plantas de campo sobre células mononucleares humanas de sangue periférico de indivíduos saudáveis.....	151
Figura 51 -	Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD a 535 nm do extrato foliar de <i>Pereskia aculeata</i> cultivada a campo.....	152
Figura 52 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-EM-IES de amostras de <i>P. aculeata</i> a partir de plantas de campo, aclimatizadas e em culturas <i>in vitro</i> a partir do detector de UV a 340 nm.....	153
Figura 53 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-EM-IES dos extratos de folha e caule obtidos a partir de plantas de campo e aclimatizadas de <i>P. aculeata</i> ...	154
Figura 54 -	Cromatogramas dos extratos obtidos a partir das culturas de calos e de células em suspensão, obtidos por CLAE-UV-EM-IES.....	155
Figura 55 -	Espectros de massas da substância com tempo de retenção de 112 min., obtidos a partir da análise por CLAE-UV-MS-IES das diferentes amostras de <i>P. aculeata</i>	156

Figura 56 - Espectro de massas da molécula N- α -Benzoil-L-arginina encontrado na base MassBank, sugerida como a principal substância observada nas amostras de *Pereskia aculeata*..... 158

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Estimativas da taxa bruta (incidência de câncer por 100 mil habitantes) e de novos casos de câncer no Brasil para o ano de 2013.....	37
Quadro 2 -	Principais metabólitos com atividade antineoplásica identificados em diferentes espécies da família Cactaceae.....	39
Tabela 1 -	Tratamentos para desinfestação de sementes de <i>P. aculeata</i> visando à germinação sob condições <i>in vitro</i>	52
Tabela 2 -	Valores da porcentagem de germinação, do índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de <i>P. aculeata</i> submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação.....	58
Tabela 3 -	Porcentagem de variação da taxa de regeneração e do número de brotos de <i>P. aculeata</i> produzidos por explante em relação ao tipo de meio básico e tipo de fitorregulador adicionado ao meio de cultura.....	62
Tabela 4 -	Porcentagem de variação da taxa de regeneração e do número de brotos de <i>P. aculeata</i> produzidos por explante em relação ao tipo e concentração do fitorregulador adicionado aos diferentes meios de cultura.....	63
Tabela 5 -	Comprimento dos brotos micropropagados de <i>P. aculeata</i> obtidos a partir da multiplicação de gemas axilares, após 60 dias de cultura.....	64
Tabela 6 -	Efeito da concentração de ágar sobre a abscisão foliar de plantas mantidas <i>in vitro</i> em meio MS sem fitorreguladores.....	68
Tabela 7 -	Quantificação de proteínas totais em folhas de <i>P. aculeata</i> obtidas de plantas de campo e plantas aclimatizadas.....	69
Tabela 8 -	Produção de betalainas a partir de diferentes sistemas biotecnológicos.....	85
Tabela 9 -	Composição e concentração (mM) dos diferentes nutrientes minerais e orgânicos presentes nos meios básicos de cultura MS, LS e HB.....	88
Tabela 10 -	Produção de biomassa calogênica a partir de explantes de hipocótilo e folha cotiledonar de <i>P. aculeata</i> cultivados em meios MS contendo diferentes concentrações do fitorregulador Picloram, após 63 dias de cultura.....	96

Tabela 11 -	Efeito da associação entre o fitorregulador Picloram e as citocininas BA ou KIN sobre a produção de massa calogênica em <i>P. aculeata</i> a partir de explantes hipocotiledonares, após três subcultivos.....	98
Tabela 12 -	Acúmulo de biomassa a partir das CCS de <i>P. aculeata</i> iniciadas com diferentes inóculos.....	106
Tabela 13 -	Acúmulo de biomassa a partir das CCS de <i>P. aculeata</i> em diferentes meios MS suplementados com 10 µM de Picloram, ao longo de três subcultivos.....	107
Tabela 14 -	Produção de betalaínas totais a partir de cultura de calos e de células em suspensão de <i>P. aculeata</i> em meio MS ½ suplementado com 10 µM de Picloram (meio C) e meio MS modificados em relação à quantidade e à fonte de nitrogênio (meios C4 e C8).....	109
Tabela 15 -	Composição dos diferentes meios nutritivos utilizados na cultura de calos e de células em suspensão de <i>P. aculeata</i>	125
Tabela 16 -	Análise dos fragmentos da principal substância presente nas amostras de <i>Pereskia aculeata</i>	157

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftalenoacético
ANOVA	Análise de variância
B5	Meio de cultivo de Gamborg e colaboradores (1968)
BA	6-benzilaminopurina
BHT	di-terc-butil metil fenol
BME	β -mercaptoetanol
CCS	Cultura de células em suspensão
CLAE-UV/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
CLAE-UV-EM-IES	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray
DCF	Diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DMEN	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FeCl ₂	Cloreto ferroso
Ferrozina	3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -(2-ácido etanosulfônico)
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
iNOS	NO sintase induzida
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KIN (Cinetina)	6-furfurilamino-purina

LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
LS	Meio de cultivo de Linsmaier e Skoog (1965)
Meio C	MS ½ + 10 µM PIC (1 NH ₄ ⁺ : 2 NO ₃ ⁻)
Meio C4	MS ½ + 10 µM PIC (1 NH ₄ ⁺ : 4 NO ₃ ⁻)
Meio C8	MS ½ + 10 µM PIC (1 NH ₄ ⁺ : 8 NO ₃ ⁻)
Meio HB	Meio <i>High betalain</i>
MS	Meio de cultivo de Murashige e Skoog (1962)
MS0	Meio de cultivo de Murashige e Skoog (1962) sem reguladores de crescimento
MS ½	Meio MS contendo a metade da concentração salínica
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
nNOS	NO sintase neuronal
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OC1 ⁻	Radical hipoclorito
ONOO	Peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato-salino
PF	Peso fresco
PHA	Fitohemaglutinina
PIC	Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico)
PS	Peso seco
RPM	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio do Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
Tween 80 [®]	Polioxietilenosorbitano monolito

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	23
1	REVISÃO DA LITERATURA	23
1.1	Família Cactaceae	23
1.1.1	<u>Origem e distribuição geográfica</u>	23
1.1.2	<u>Importância econômica, nutritiva e medicinal</u>	26
1.2	<i>Pereskia aculeata</i> Miller	28
1.3	Alimentos funcionais e Nutraceuticos	31
1.4	Metabólitos secundários ou especiais	33
1.5	Estudo do potencial antineoplásico	36
1.5.1	<u>Atividade citotóxica</u>	40
1.5.2	<u>Atividade antioxidante</u>	42
1.6	Biotecnologia vegetal aplicada à produção de metabólitos especiais	44
2	OBJETIVOS	48
2.1	Geral	48
2.2	Específicos	48
3	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>, MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE <i>Pereskia aculeata</i> MILL. CULTIVADA <i>IN VIVO</i> E <i>EX VITRO</i>	49
3.1	Introdução	49
3.2	Material e Métodos	51
3.2.1	<u>Material botânico</u>	51
3.2.2	<u>Germinação <i>in vitro</i></u>	51
3.2.3	<u>Micropropagação</u>	52
3.2.3.1	Indução de gemas e proliferação de brotos.....	52
3.2.3.2	Alongamento e Enraizamento <i>in vitro</i>	53
3.2.3.3	Aclimatização.....	53
3.2.4	<u>Avaliação da abscisão foliar</u>	54
3.2.5	<u>Análise quantitativa de proteínas totais</u>	54
3.2.5.1	Preparo das amostras.....	54
3.2.5.2	Quantificação de proteínas totais.....	55

3.2.6	<u>Análise estatística</u>	56
3.3	Resultados	56
3.3.1	Germinação <i>in vitro</i>	56
3.3.2	<u>Micropropagação</u>	60
3.3.2.1	Indução de gemas e proliferação de brotos.....	60
3.3.2.2	Alongamento, Enraizamento e Aclimatização das plantas.....	67
3.3.3	<u>Avaliação da abscisão foliar</u>	68
3.3.4	<u>Quantificação de proteínas totais</u>	69
3.4	Discussão	69
3.5	Conclusões	80
4	PRODUÇÃO DE BETALAÍNAS A PARTIR DA CULTURA DE CALOS E DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>Pereskia aculeata</i> MILL.	81
4.1	Introdução	81
4.2	Material e Métodos	86
4.2.1	Cultura de calos de <i>P. aculeata</i> Mill.....	86
4.2.1.1	Material botânico	86
4.2.1.2	Estabelecimento da cultura de calos	86
4.2.1.3	Manutenção da cultura de calos	87
4.2.1.4	Identificação inicial dos pigmentos.....	87
4.2.1.5	Modulação da produção de pigmentos.....	87
4.2.2	<u>Culturas de células em suspensão de <i>P. aculeata</i> Mill.</u>	89
4.2.3	<u>Extração e quantificação de betalaínas</u>	90
4.2.4	<u>Análise estatística</u>	91
4.3	Resultados	91
4.3.1	Cultura de calos de <i>P. aculeata</i> Mill.....	91
4.3.1.1	Estabelecimento da calogênese	91
4.3.1.2	Manutenção da cultura de calos	100
4.3.1.3	Identificação inicial dos pigmentos.....	102
4.3.1.4	Modulação da produção de pigmentos	103
4.3.2	<u>Culturas de células em suspensão de <i>P. aculeata</i> Mill.</u>	105
4.3.3	<u>Quantificação de betalaínas</u>	109
4.4	Discussão	110
4.5	Conclusões	120

5	ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE <i>Pereskia aculeata</i> MILL. CULTIVADA <i>IN VIVO</i>, <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i>	121
5.1	Introdução	121
5.2	Material e Métodos	124
5.2.1	<u>Material botânico</u>	124
5.2.2	<u>Preparo dos extratos metanólicos</u>	125
5.2.3	<u>Determinação da atividade antioxidante</u>	126
5.2.3.1	Avaliação da capacidade de captura do radical DPPH.....	126
5.2.3.2	Avaliação da capacidade quelante de ferro (II).....	127
5.2.3.3	Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) por citometria de fluxo.....	128
5.2.3.4	Avaliação da produção de óxido nítrico.....	130
5.2.3.5	Avaliação da atividade citotóxica.....	131
5.2.4	<u>Determinação o potencial antitumoral</u>	132
5.2.4.1	Linhagens celulares e cultivo.....	132
5.2.4.2	Avaliação da atividade citotóxica.....	133
5.2.5	<u>Determinação da atividade citotóxica em células mononucleares</u>	134
5.2.6	<u>Análise estatística</u>	135
5.2.7	<u>Análises por cromatografia líquida de alta eficiência, detecção por UV acoplada e espectrometria de massas com ionização por electrospray (CLAE-UV-EM-IES)</u>	135
5.3	Resultados	136
5.3.1	<u>Avaliação da atividade antioxidante</u>	136
5.3.1.1	Avaliação da capacidade de captura do radical DPPH.....	136
5.3.1.2	Avaliação da capacidade quelante de ferro (II).....	138
5.3.1.3	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por citometria de fluxo.....	140
5.3.2	<u>Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico</u>	142
5.3.2.1	Avaliação da atividade citotóxica.....	145
5.3.3	<u>Determinação o potencial antitumoral</u>	145
5.3.4	<u>Determinação da atividade citotóxica em células mononucleares</u>	150
5.3.5	<u>Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u>	151

5.4	Discussão	158
5.5	Conclusões	170
	CONCLUSÕES FINAIS	172
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173
	APÊNDICE - Artigo publicado	211

INTRODUÇÃO

O aumento da incidência de câncer associado aos efeitos colaterais causados pelo tratamento quimioterápico tradicional tem impulsionado as pesquisas científicas para a descoberta de novos fármacos de origem natural. Neste sentido, técnicas biotecnológicas têm sido utilizadas para a produção de plantas e metabólitos secundários de interesse, em larga escala, contribuindo para o uso sustentável da biodiversidade.

Espécies de Cactaceae são reconhecidas como fontes de vitaminas, proteínas e sais minerais, ricas em substâncias bioativas, sendo consideradas alimentos funcionais. Conhecida como ora-pro-nóbis, *Pereskia aculeata* Mill. é um cacto nativo das Américas que apresenta alto valor nutritivo e medicinal. Deste modo, este estudo objetivou o estabelecimento de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *P. aculeata* visando à produção de metabólitos de importância medicinal e nutracêutica, com ênfase no potencial antineoplásico.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Família Cactaceae

A família Cactaceae compreende aproximadamente 2.000 espécies agrupadas em 170 gêneros, originalmente restritas às Américas, ocorrendo desde o norte do Canadá até o sul da Argentina, com exceção do gênero africano *Rhipsalis*, além de algumas espécies de *Opuntia* introduzidas na Austrália (ROJAS-ARÉCHIGA; VÁZQUEZ-YANES, 2000). Embora sejam encontradas em uma ampla variedade de ambientes, as cactáceas ocorrem principalmente nas regiões áridas do Novo Mundo e constituem uma das maiores radiações evolutivas no deserto, com diversas adaptações morfológicas e fisiológicas a condições de déficit hídrico (EDWARDS et al., 2005).

Segundo Edwards e Donoghue (2006), todas as espécies possuem um sistema radicular superficial, capaz de absorver água das camadas superiores do solo. Além disso, muitas espécies possuem camadas corticais do caule com grandes células mucilaginosas, que armazenam água em longo prazo, apresentando metabolismo do tipo CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), via fotossintética especializada onde a abertura dos estômatos durante a noite reduz a perda de água por transpiração (KLUGE; TING, 1978). Adicionalmente, a maioria dos cactos não possuem folhas e as atividades fotossintéticas são realizadas pelo caule a partir de uma camada de tecido cortical especializada.

A perda das folhas constitui uma das mais importantes adaptações do grupo ao clima seco. Esses órgãos temporários, com grande área de superfície, propiciam a perda de água

para a atmosfera, seja através dos estômatos ou através da cutícula (EDWARDS; DONOGHUE, 2006). Estas características representam ótimas estratégias adaptativas e garantem aos cactos um grande sucesso ecológico, uma vez que são capazes de manter uma taxa positiva de água nos tecidos mesmo em ambientes secos, a partir de uma boa absorção e armazenamento, além de apresentarem alta eficiência no uso da água fotossintética (GIBSON; NOBEL, 1986).

1.1.1 Origem e distribuição geográfica

Na classificação tradicional das cactáceas são reconhecidas três subfamílias: Opuntioideae, Cactoideae e Pereskioideae. As duas primeiras abrangem a maior diversidade observada dentro do grupo, conhecidas como “cactos normais”, com ausência de folhas, caule suculento, córtex fotossintético desenvolvido com metabolismo CAM, entrenós curtos com presença de espinhos e ovário inferior (BUTTERWORTH; EDWARDS, 2008), como observado nas espécies *Opuntia aciculata* e *Echinocereus adustus* (Figura 1A e B).

Figura 1- Diversidade entre as espécies da família Cactaceae.



Legenda: A- *Opuntia aciculata* (Opuntioideae); B- *Echinocereus adustus* (Cactoideae); C- *Pereskia bleo* (Pereskioideae); D- *Maihuenia poeppigii* (Maihuenioideae).

Fonte: <http://www.cactiguide.com>. Acesso em fevereiro de 2013.

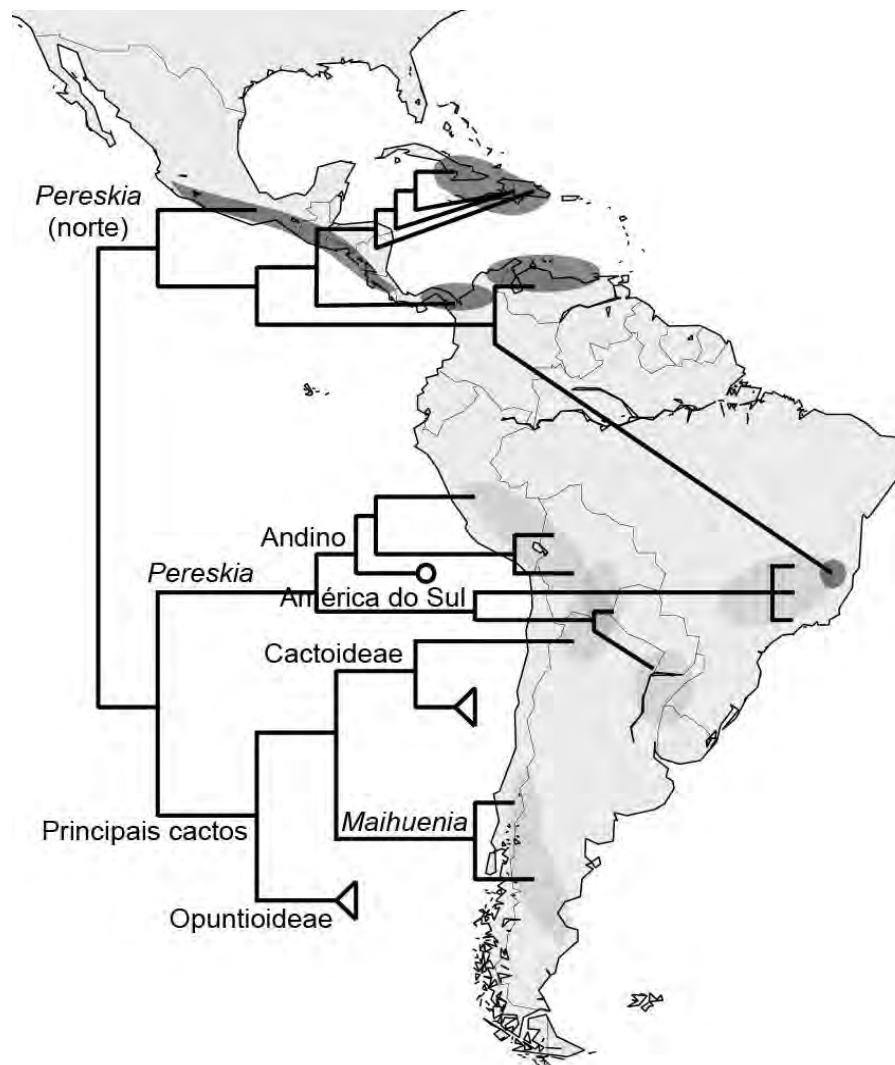
Os demais cactos, membros da subfamília Pereskioideae, incluíam os gêneros *Pereskia* e *Maihuenia*, apesar deste último ter sido recentemente alocado em outra subfamília, Maihuenioidae. As espécies deste grupo apresentam folhas persistentes e ovários do tipo superior ou inferior, características morfológicas consideradas rudimentares dentro das cactáceas (GIBSON; NOBEL, 1986) (Figura 1C e D).

Recentes estudos baseados em análises moleculares sugerem que Opuntioideae e Cactoideae são grupos monofiléticos e originários da região sul da América do Sul, possivelmente a partir da região andina do Peru, Bolívia e norte da Argentina (EDWARDS et al., 2005). Apesar disso, suas relações evolutivas com *Pereskia* e *Maihuenia* ainda não foram totalmente esclarecidas.

Nos estudos de Edwards e colaboradores (2005), o grupo Pereskioideae é sugerido como parafilético, com *Maihuenia*, gênero restrito ao centro sul do Chile e da Argentina, sendo recuperado como grupo-irmão de Cactoideae e o gênero *Pereskia*, também recuperado como parafilético e formado por dois grupos. Ao norte, o gênero *Pereskia* é encontrado na América Central, norte da América do Sul e Cuba, com exceção de *P. aureiflora* que ocorre no leste do Brasil, e um segundo grupo formado pelas espécies andinas, ocorrentes no Peru e na Bolívia, e espécies brasileiras (*P. grandifolia*, *P. stenantha*, *P. bahiensis* e *P. aculeata*) grupo-irmão do grupo formado por Opuntioideae, Cactoideae e *Maihuenia* (Figura 2).

A biogeografia das cactáceas parece estar intimamente relacionada à evolução do continente sul-americano, a partir do início do processo de soerguimento dos Andes (~63 Ma) (BURNHAM; GRAHAM, 1999). Segundo Hartley (2003), tendo ocorrido em um clima predominantemente árido/semiárido, a elevação da cordilheira é sugerida como uma das principais causas para a diversificação das diferentes linhagens dentro da família Cactaceae.

Figura 2 - Distribuição geográfica dos cactos basais.



Legenda: As áreas sombreada indicam a diversidade de espécies, com exceção de alguns táxons de ampla distribuição: *Pereskia aculeata* (círculo), Opuntioideae (triângulo) e todas as Cactoideae (triângulo), exceto *Blossfeldia*.

Fonte: Adaptado de Edwards e colaboradores, 2005.

1.1.2 Importância econômica, nutritiva e medicinal

As espécies da família Cactaceae, além de apresentarem uma grande importância ecológica, possuem um elevado valor ornamental, nutritivo, medicinal e cosmético (BIAVATTI et al., 2007; MARIATH et al., 2009). Muitos cactos possuem um alto potencial ornamental, devido à beleza e à ampla diversidade morfológica observada entre as espécies. Tal diversidade deve-se principalmente aos padrões exuberantes de floração e às diferentes formas observadas no caule, os quais podem ser cilíndricos, globulares ou achatados (TERRAZAS-SALGADO; MAUSETH, 2002). Neste contexto, devido a pouca exigência

ambiental e a baixa necessidade de manutenção, os cactos e as suculentas têm sido mais utilizados em projetos paisagísticos e atraído grande interesse no mercado de plantas ornamentais (LESSA et al., 2009).

Deste modo, considerando a grande diversidade e valor ornamental, muitos membros da família Cactaceae foram submetidos à intensa exploração e, atualmente, encontram-se ameaçados, com suas populações drasticamente reduzidas. Dentre as espécies mais exploradas destacam-se *Aztekium ritterii*, *Strombocactus disciformis*, *Mammillaria pectinifera*, *Cephalocereus senilis* e *Astrophytum asterias* (ROJAS-ARÉCHIGA; VÁZQUEZ-YANES, 2000).

Além do potencial ornamental, muitos cactos representam parte importante da dieta da população principalmente do México, EUA, Espanha, Itália e norte da África, onde suas folhas e frutos nutritivos são consumidos crus ou utilizados no preparo de saladas (SHETTY et al., 2011). Espécies como *Opuntia ficus-indica*, *O. megacantha* e *O. amychlea* produzem vegetais, frutas e forragem para os animais, com 14% de glicose (FAO, 1996). Atualmente, *O. ficus-indica* é o cacto mais importante para a agricultura, constituindo o primeiro cultivo de frutos especialmente adaptados para solos semiáridos e sem irrigação. Além disso, a espécie é utilizada como forragem, tintura, fonte de energia e atua na remediação de ecossistemas (SMALL; CATLING, 2004).

Os frutos das cactáceas possuem propriedades funcionais, uma vez que são ricos em açúcares, vitaminas, minerais e aminoácidos, além de serem fontes de betalaínas (STINTZING; CARLE, 2006). As betalaínas são pigmentos naturais bastante utilizados na indústria como corantes naturais de iogurtes e sorvetes e que possuem uma elevada atividade antioxidante (SAENZ, 2006). Os frutos de *Opuntia stricta* possuem o mais alto conteúdo de betacianina já observado, com 80 mg de pigmento em 100 g de frutos frescos (CASTELLAR et al., 2003).

Desde a antiguidade, as cactáceas vêm sendo utilizadas na medicina tradicional e em práticas místicas e religiosas, por curandeiros e tribos indígenas do México (GUIMARÃES et al., 2009 *apud* HOLLIS; SCHEINVAR, 1995). Um dos cactos mais conhecidos por seus efeitos alucinógenos é *Lophophora williamsii*, espécie nativa do México e conhecida como peiote (SHETTY et al., 2011). Contudo, nos últimos anos, o extrato de peiote tem sido aplicado para estimular o sistema nervoso central e regular a pressão arterial, o sono, a fome e a sede (FRANCO et al., 2003).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos têm justificado o uso popular de muitas espécies e comprovado diferentes propriedades medicinais na família. Conhecido como

mandacaru, *Cereus jamacaru* é utilizada no tratamento de doenças respiratórias e do escorbuto (SCHEINVAR, 1985). Suas raízes são usadas como diuréticas, e em problemas respiratórios e renais (AGRA et al., 2007; 2008), enquanto segmentos caulinares exibem atividade antibacteriana (DAVET et al., 2009). A espécie *Opuntia ficus-indica* possui atividade anti-inflamatória (PARK et al., 2000), antioxidante (LEE et al., 2002) e antiulcerogênica (GALATI et al., 2001), enquanto propriedades antidiabéticas foram verificadas em extratos de *Opuntia milpa alta* (LUO et al., 2010) e *O. streptacantha* (CASTANEDA et al., 1997).

Os frutos e os cladódios dos cactos contêm diversas substâncias antioxidantes, como pectinas, carotenos, betalainas, ácido ascórbico e derivados de quercetina, caracterizando-os como uma potencial fonte de medicamentos anticâncer (ZOU et al., 2005). Neste contexto, estudos de Harlev e colaboradores (2013) apontam as cactáceas como excelentes fontes de substâncias para tratamento antitumoral, com ação quimiopreventiva e quimioterápica superior às demais plantas já testadas. Entretanto, a pesquisa revela que apenas poucas espécies de cactos já foram estudadas, sendo um campo bem amplo a ser explorado.

1.2 *Pereskia aculeata* Miller

Pereskia é um dos gêneros mais antigos da família Cactaceae, descrito por Plumier em 1703, a partir de exemplares coletados provavelmente nas ilhas do Caribe entre 1695 e 1697. O gênero é formado por 17 espécies distribuídas principalmente no Caribe e nas Américas Central e do Sul, que ocorrem em ambientes méxicos ou levemente áridos (DUARTE; HAYASHI, 2005; LEUENBERGER, 2007) (Figura 3). Tais espécies têm sido consideradas como o grupo mais próximo do ancestral dos cactos, uma vez que se apresentam como árvores ou arbustos espinhosos, com folhas largas que realizam fotossíntese C3, aréolas com produção de folhas, além de serem decíduas e ligeiramente suculentas (EDWARDS; DONOGHUE, 2006).]

Conhecida como “ora-pro-nóbis”, “carne-de-pobre”, “trepadeira-limão” ou “groselha-da-américa”, *Pereskia aculeata* Mill. é um cacto de hábito escandente, nativo da América Tropical e que apresenta o maior número de caracteres primitivos da família Cactaceae (SCHEINVAR, 1985; MAUSETH, 1999). No Brasil, a espécie encontra-se distribuída entre os estados da Bahia e Rio Grande do Sul, principalmente ao longo das restingas e nas clareiras das florestas (SILVA JÚNIOR, 2008). No noroeste do Paraná, a espécie geralmente ocorre como trepadeira em matas secundárias (ROSA; SOUZA, 2003). Contudo, na África do Sul, *P. aculeata* apresenta-se como uma espécie invasora, sendo considerada um problema ambiental

(PATERSON et al., 2009).

Figura 3 - Distribuição geográfica do gênero *Pereskia* L.



Fonte: Adaptado de Leuenberger, 2007.

A espécie é caracterizada como uma trepadeira semilenhosa, com até 10 m de altura, apresentando ramos longos e espinhos nas axilas das folhas elípticas e carnosas (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1988; LORENZI; SOUZA, 1995; MANKE, 1998) (Figura 4 A-D). Estudos morfoanatômicos de Squena e colaboradores (2012) identificaram a presença de folha anfiestomática, estômatos paracíticos, ausência de tricomas, mesófilo dorsiventral, idioblastos com drusas de oxalato de cálcio, células contendo mucilagem e feixes vasculares colaterais. O caule, com crescimento secundário reduzido, apresenta epiderme simples, colênquima angular, parênquima cortical com muitos amiloplastos e organização vascular colateral. No córtex e na medula, há numerosas cavidades contendo mucilagem e drusas de oxalato de cálcio (DUARTE; HAYASHI, 2005).

Figura 4 - *Pereskia aculeata* Miller.



Legenda: A- *Habitus*; B- Flores; C- Frutos imaturos; D- Fruto aberto exibindo as sementes.
 Fonte: www.redorbit.com. Acesso em março de 2013.

Suas folhas possuem alto teor de mucilagem, sendo usadas na medicina popular como emoliente e consumidas pela população como fonte alimentar, sem relatos de toxicidade (DUARTE; HAYASHI, 2005). Nos últimos anos, a espécie tem despertado interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica devido à presença do biopolímero arabinogalactana e seu alto conteúdo proteico (MERCÊ et al., 2001). Segundo Almeida-Filho e Cambraia (1974) e Albuquerque e colaboradores (1991), as folhas possuem uma alta taxa de proteína quando comparadas ao milho comum e ao feijão, além de apresentarem uma elevada quantidade de aminoácidos essenciais, acima do necessário para o consumo humano, segundo a Food & Agriculture Organization (FAO) (SIERAKOWSKI et al., 1987).

Estudos de Takeiti e colaboradores (2009), revelaram que as folhas de *P. aculeta* possuem 39,1% de fibras e contêm minerais como cálcio, ferro, magnésio, manganês e zinco, vitaminas A, C e ácido fólico, além de proteínas e aminoácidos, principalmente o triptofano. Deste modo, a espécie consta na lista de vegetais indicados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) na publicação *Manual de Hortaliças Não*

convencionais (BRASIL, 2010), a qual tem por objetivo incentivar o cultivo de muitas hortaliças que possuem o consumo restrito a determinadas regiões, sendo pouco conhecidas pela comunidade científica e pela população como um todo. Devido ao elevado valor nutricional, a espécie é sugerida como uma alternativa simples e de baixo custo, para melhoria da qualidade da alimentação da população. Segundo Dias e colaboradores (2005), 77% da população de Diamantina (MG), consome regularmente este nutritivo vegetal não convencional.

Na medicina popular, as folhas de *P. aculeata* são utilizadas no tratamento de processos inflamatórios e para a recuperação da pele em casos de queimadura (BARROS et al., 2009), enquanto seus frutos são usados como expectorante e antissifilítico (ROSA; SOUZA, 2003). Estudos fitoquímicos realizados por Agostini-Costa e colaboradores (2012), identificaram diferentes carotenoides e compostos fenólicos presentes nas folhas de *P. aculeata*. Adicionalmente, extratos foliares da espécie foram testados quanto ao potencial biológico e apresentaram resultados satisfatórios, exibindo propriedades antioxidante (SILVA et al., 2012) e analgésica (PINTO et al., 2012). Recentes estudos de Carvalho e colaboradores (2014) mostraram o efeito da mucilagem das folhas de *P. aculeata* na cultura de fibroblastos, corroborando seu uso tradicional no tratamento de queimaduras.

1.3 Alimentos funcionais e Nutraceuticos

A industrialização e os avanços tecnológicos nas diferentes áreas, como na engenharia, na saúde, na produção de alimentos, de fármacos, dentre outros, provocaram não só o aumento da expectativa de vida, mas também uma efetiva mudança nos hábitos alimentares da população. Em contrapartida, observa-se o aumento de doenças crônicas na população, como problemas cardiovasculares, principal causa de morte nos países desenvolvidos, obesidade, diabetes, osteoporose, artrite, diversos tipos de câncer e outras desordens (DAS et al., 2012). Deste modo, considerando a estreita relação entre a alimentação e o desenvolvimento de certas doenças, nas últimas décadas a população tem demonstrado maior interesse na busca pela melhoria da qualidade de vida, através de uma dieta mais saudável e funcional.

Embora seja uma preocupação da sociedade atual, a relação entre a ingestão de certos alimentos e a prevenção de doenças, é sabida há pelo menos 2500 anos, quando Hipócrates salientava “faça do alimento o seu medicamento” (VIDAL et al., 2012). Contudo, o conceito de alimento funcional somente foi adotado em 1991 no Japão, quando o termo FOSHU (Foods for Specifed Health Use) foi utilizado para alimentos com um efeito específico sobre a

saúde. Segundo Cardoso e Oliveira (2008), a FDA (Food and Drug Administration), órgão dos Estados Unidos da América responsável pelo controle dos alimentos, estabelece critérios de avaliação e classificação em: alimento, alimento-medicamento, suplementos alimentares, alimento para usos dietéticos especiais ou droga.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta o registro de alimentos funcionais, a partir da portaria nº 398 de 1999, que define como alimento funcional “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo, sem supervisão médica” (PIMENTEL et al., 2005). Já na América do Norte, o termo alimento funcional é aplicado como sinônimo de nutracêutico, o que evidencia as muitas distorções na terminologia com respeito a esta temática.

O termo nutracêutico foi criado em 1989 pelo Dr. Stephen DeFelice, fundador e presidente da Fundação de Inovação em Medicina (EUA), a partir da combinação das palavras “nutrição” e “farmacêutico”. O termo nutracêutico refere-se a “qualquer substância que é um alimento ou parte dele, que promova benefícios para a saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças” (KUMAR et al., 2012). Desta forma, enquanto o alimento funcional tem aparência similar ou pode ser o próprio alimento convencional, que é consumido como parte da dieta normal do indivíduo, os nutracêuticos podem ser também produtos extraídos, purificados ou produzidos a partir de um vegetal, animal ou de fontes marinhas, com propriedades farmacológicas comprovadas, que geralmente estão associadas com um alimento, que passa a adquirir um valor nutritivo e farmacêutico (PRABU et al., 2012).

Nos últimos anos, a busca por tratamentos mais baratos e medicamentos mais efetivos, com menos efeitos colaterais, impulsionou o rápido crescimento no uso de nutracêuticos pela população. Em 2011, o mercado mundial de nutracêuticos movimentou cerca de 151 bilhões de dólares, com previsão de alcançar US\$ 207 bilhões em 2016, apresentando uma taxa de crescimento estimada em 6,5% ao ano (MONDELLO, 2013). Assim, especialistas da indústria alimentícia passaram a concentrar seus esforços na busca de estratégias nutritivas modernas, voltadas para consumidores que acreditam na saúde através de uma alimentação correta ou via suplementação alimentar.

Segundo Kalia (2005), as principais fontes de substâncias usadas como nutracêuticos são: (a) fibras alimentares, substâncias vegetais não hidrolisáveis pelas enzimas do trato digestório, mas digeridas pela flora intestinal, que atuam na redução do risco de hipertensão

(WHELTON et al., 2005), obesidade (LAIRON et al., 2005) e distúrbios gastrointestinais (PETRUZZIELLO et al., 2006); (b) ácidos graxos insaturados, como o ômega-3 e ômega-6, que são essenciais ao bom funcionamento do sistema cardiovascular, com ação antiarrítmica (LERAY et al., 2001), hipolipidêmica (BUCHNER et al., 2002) e antitrombótica (ALBERT et al., 2002); (c) probióticos, suplementos alimentares microbianos vivos, que em doses adequadas promovem benefícios para a microbiota da flora intestinal, reduzindo a ocorrência de alergias, infecções urinárias e câncer (LENOIR-WIJNKOOP et al., 2007); (d) prebióticos, componentes alimentares que alteram seletivamente a flora intestinal (MACFARLANE et al., 2006), promovendo benefícios à saúde, como a neutralização de toxinas, redução dos níveis de colesterol, tolerância à lactose e propriedades antitumorais (SANDERS, 1994); (e) vitaminas antioxidantes, como a vitamina C, a vitamina E e os carotenoides, que atuam na prevenção de reações oxidativas que podem desencadear diversas doenças como câncer, catarata e problemas cardiovasculares (ELLIOT, 1999); (f) Polifenóis, metabólitos secundários vegetais que protegem as plantas do estresse fotossintético e que apresentam propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, cardioprotetora e antidiabética (SCALBERT et al., 2005).

Neste contexto, considerando os benefícios nutritivos e medicinais já comprovados a partir do consumo regular de frutas, verduras e legumes, as plantas desempenham papel fundamental na dieta humana e, deste modo, constituem a principal fonte de nutracêuticos para o mercado. Sendo assim, ao longo dos anos tem-se observado um grande aumento no consumo de suplementos alimentares contendo diferentes tipos de fitometabólitos ou substâncias bioativas visando à prevenção de diversas doenças (REA et al., 2011).

1.4 Metabólitos secundários ou especiais

As substâncias bioativas geralmente são produtos de rotas metabólicas diferenciadas que constituem o chamado metabolismo secundário vegetal. Este, ao contrário do metabolismo primário, é restrito a certas espécies de seres vivos e não está relacionado diretamente à manutenção da vida, mas garante muitas vantagens ao organismo produtor (TAIZ; ZEIGER, 2009). Neste contexto, ao longo dos anos, a coevolução entre as plantas e os demais organismos, resultou em uma grande variedade funcional de produtos naturais de origem vegetal (KUTCHAN; DIXON, 2005). Assim, as plantas podem ser consideradas verdadeiras “biofábricas” dada à elevada quantidade e diversidade de substâncias bioativas produzidas por uma mesma espécie.

Os metabólitos secundários são moléculas de baixo peso molecular, produzidas em

pequenas quantidades (1 - 5 % de matéria seca), com estruturas complexas e que apresentam propriedades funcionais que conferem benefícios à saúde. Tais moléculas são sintetizadas em resposta ao ajuste/adaptação do vegetal a um estresse biótico ou abiótico e possuem grande valor econômico e farmacêutico, pois atuam como modelos para a produção de diversas drogas sintéticas (REA et al., 2011). Os metabólitos secundários ou especiais podem ser classificados em três grupos: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos.

Os terpenos ocorrem em todas as plantas e constituem o maior grupo de metabólitos secundários, com cerca de 22.000 substâncias descritas, as quais são formadas a partir da união de várias unidades de isopreno (ADEYEMI, 2011). Monoterpenos e sesquiterpenos são os principais componentes dos óleos essenciais, substâncias usadas para atrair polinizadores ou repelir insetos, como o citronelal, extraído da citronela (*Cymbopogon citratus*). Diversas espécies aromáticas são empregadas *na culinária, como o louro (Laurus nobilis) e o hortelã (Mentha sp.), e na indústria de perfumes, como o pau-rosa (Aniba rosaeodora) e o eucalipto (Eucalyptus citriodora) (BIZZO et al., 2009).*

As saponinas são esteroides ou triterpenos glicosilados, caracterizados pela formação de espuma em solução aquosa. Dentre as diversas aplicações, são substâncias bastante utilizadas na medicina natural para reduzir a fadiga, como o ginseng (Panax ginseng) (SCHENKEL, 2007). Os cardenolídeos são triterpenos ativos em vertebrados, que possuem gosto amargo, alta toxicidade e são empregados no tratamento de doenças cardíacas, como a digoxina, isolada a partir da espécie Digitalis sp. (RATES; BRIDI, 2007). Além destes, carotenos e xantofilas são tetraterpenos de coloração vermelha, laranja ou amarela, que além de atuarem como pigmentos acessórios nos fotossistemas, são potentes agentes antioxidantes e precursores da vitamina A (retinol), importante componente das proteínas presentes nas células fotossensíveis (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos nitrogenados compreendem diversas substâncias formadas a partir de diferentes vias e que apresentam o elemento nitrogênio em sua composição. Os alcaloides constituem um vasto grupo de metabólitos (mais de 15.000), formados a partir de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina) e alifáticos (ornitina, lisina) e encontrados principalmente nas angiospermas (ZULAK et al., 2006). Possuem gosto amargo e alta toxicidade, revelando seu importante papel na defesa do vegetal (HENRIQUES et al., 2004). Dentre outras propriedades, os alcaloides são conhecidos por exercerem pronunciado efeito no sistema nervoso, e por isso são largamente utilizados como venenos, alucinógenos, estimulantes e analgésicos, tais como a atropina, a cafeína, a nicotina, o ópio e a cocaína. Certos alcaloides apresentam elevado potencial antitumoral, como o taxol, isolado a partir de

Taxus brevifolia, e a vincristina e vimblastina, obtidas a partir de *Catharanthus roseus* (SCHENKEL, 2007).

Os glicosinolatos são compostos nitrogenados que apresentam enxofre em sua molécula e que ocorrem principalmente na família Brassicaceae. Ao serem hidrolisados por tioglucosidases (enzimas localizadas em compartimento ou tecidos diferentes), os glicosinolatos produzem cianeto, um gás letal para os organismos aeróbios, atuando assim, como um potente repelente alimentar (ADEYEMI, 2011). Muitos estudos apontam estas substâncias como potentes antitumorais (LI et al., 2010). As betalainas são pigmentos nitrogenados solúveis em água presentes na maioria das espécies da ordem Caryophyllales. Sintetizadas a partir do aminoácido tirosina, compreendem dois grupos: as betacianinas (vermelho-violeta), formadas pela condensação do ácido betalâmico com derivados de dihidroxifenilalanina (DOPA) e as betaxantinas (amarelo-laranja), formadas pela condensação do ácido betalâmico com aminoácidos ou seus derivados (TANAKA et al., 2008). São substâncias muito utilizadas como corantes naturais e apresentam propriedades antioxidante, anti-inflamatória (CHAKOLE et al., 2011) e antitumoral (SREEKANTH et al., 2007) já reportadas em diferentes espécies.

Compostos fenólicos compreendem mais de 8.000 substâncias com grande diversidade estrutural e caracterizadas pela presença de pelo menos uma hidroxila ligada a um anel benzênico (CARTEA et al., 2011). Dentre as substâncias fenólicas mais complexas estão os taninos, responsáveis pela adstringência de muitos frutos e que atuam como repelentes alimentares de animais, inibindo o ataque de herbívoros (ADEYEMI, 2011), com ação antioxidante e antitumoral (WEN et al., 2015). As cumarinas são produtos fenólicos fotoativos, que estimulam a produção de melanina e por isso, são usadas no tratamento de doenças de pele (KUSTER; ROCHA, 2007). Além disso, possuem atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória e anticoagulante (VENUGOPALA et al., 2013).

Os flavonoides correspondem a um dos grupos de polifenóis mais diversificados e abundantes em angiospermas. São ativos na proteção contra radiação UV, na defesa contra patógenos, além de atuarem como agentes antioxidantes (TERASHIMA et al., 2012) e alelopáticos (WESTON; MATHESIUS, 2013). Participam da sinalização entre plantas e outros organismos, especialmente na relação entre plantas e animais, como as flavonas e flavonóis que atuam como guias de nectário e as antocianinas, pigmentos que variam do azul ao vermelho, que atuam como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, além de apresentarem ação antimicrobiana, antioxidante e antitumoral (SU, 2012).

Diante do exposto, observa-se que há uma grande demanda por metabólitos de origem

vegetal, uma vez que as plantas constituem as principais fontes de produtos farmacêuticos (FULDA; EFFERTH, 2014), fragrâncias (MASSON et al., 2014), flavorizantes e aditivos alimentares (DAVIES; DEROLE, 2014), e pesticidas (CANTRELL et al., 2012). Entretanto, considerando que a produção de metabólitos secundários confere às plantas uma grande plasticidade às variações ambientais, diferentes fatores podem interferir na síntese destes compostos, tais como a sazonalidade, a altitude, a temperatura, a radiação ultravioleta, a disponibilidade hídrica e de nutrientes, o estímulo mecânico, o ataque de patógenos, além de fatores intrínsecos ao organismo produtor, como a idade de desenvolvimento da planta e dos diferentes órgãos vegetais (OKSMAN-CALDENTEY; INZÉ, 2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Neste contexto, uma vez que a maioria das preparações utilizadas pela população é produzida a partir de plantas cultivadas no campo (MURCH et al., 2000), têm sido observadas grandes variações no conteúdo e na qualidade de muitos fitoterápicos. Deste modo, torna-se necessária a produção vegetal em larga escala, de forma controlada e sistematizada, visando à conservação da biodiversidade e à busca por novos fitometabólitos de interesse (NASIM et al., 2010).

1.5 Estudo do potencial antineoplásico

A mudança do perfil demográfico da população brasileira, com o crescimento do número de idosos, aliada à vida sedentária, nutrição inadequada, exposição a substâncias tóxicas, além do consumo de álcool e cigarro, resultaram em um grande aumento da ocorrência de doenças crônico-degenerativas, como os diferentes tipos de câncer (INCA, 2012). De modo geral, o câncer é causado por mutações de genes celulares, os oncogenes, que atuam no controle do crescimento e da divisão mitótica (GUYTON; HALL, 2006). Deste modo, a célula alterada multiplica-se de maneira anormal, podendo atingir outros tecidos e até os vasos sanguíneos e linfáticos, que as transportam para diferentes partes do corpo, caracterizando a metástase (LALLEMAND, 2003).

No Brasil, a incidência de câncer aumentou consideravelmente, sendo considerado um grave problema de saúde pública devido ao elevado custo no diagnóstico e tratamento da doença (ROSAS et al., 2013). Pesquisas revelam uma estreita relação entre a ocorrência dos diferentes tipos de câncer e a classe social do paciente, ou seja, às condições de nutrição, de trabalho e de vida a que foram submetidos ao longo da vida (GUERRA et al., 2005). Em geral, cânceres de mama, próstata e cólon atingem pessoas mais favorecidas economicamente, enquanto o de colo do útero, pênis e estômago estão associados à condição de pobreza

(Quadro 1).

Quadro 1 - Estimativas da taxa bruta (incidência de câncer por 100 mil habitantes) e de novos casos de câncer no Brasil para o ano de 2013.

Localização primária Neoplasia maligna	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Corpo do útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Total	104.080	108,19	27.570	132,65	110.020	109,81	36.460	157,13

Fonte: Rosas e colaboradores, 2013. Adaptado do Instituto Nacional do Câncer, 2012.

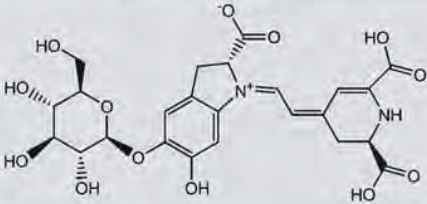
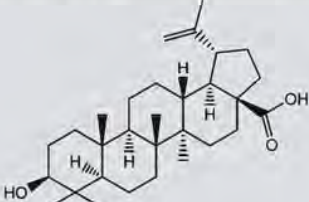
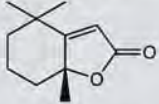
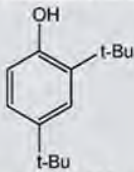
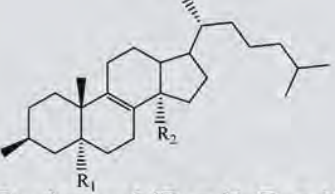
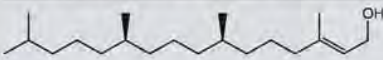
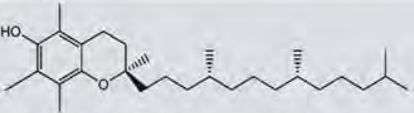
O desenvolvimento de medicamentos específicos para o tratamento dos diferentes tipos de câncer tem permitido a realização de um grande número de terapias efetivas na população. Entretanto, a complexidade de genomas do câncer, devido às múltiplas mutações que podem ocorrer entre diferentes tumores e em um mesmo tumor, pode favorecer para a resistência aos medicamentos (ROSAS et al., 2013). Desta forma, muitas pesquisas têm sido direcionadas para a descoberta de novos fármacos a partir de substâncias naturais que exerçam baixos efeitos colaterais, uma vez que os medicamentos sintéticos são tóxicos para as células normais e para as células do sistema imune (TRIPATHY; PRADHAN, 2013).

Neste contexto, na busca por fármacos efetivos, as plantas comestíveis estão cada vez mais sendo consideradas como fontes de substâncias anticâncer (FERGUSON et al., 2004). Há significativas evidências que o consumo de frutas e vegetais reduzem o risco de câncer (CHEN et al., 2003), assim como as plantas medicinais constituem a principal fonte de produtos farmacêuticos (IVANOVA et al., 2005). Sendo assim, recentemente, uma das principais áreas de atuação para o controle do câncer consiste na quimioprevenção a partir do consumo regular de alimentos funcionais e medicinais (JO et al., 2004). Atualmente, cerca de 50% das drogas anticâncer clinicamente testadas foram isoladas a partir de fontes naturais (NEWMAN; GRAGG, 2007).

Há séculos, americanos nativos consomem diversas substâncias obtidas a partir de cactos como suplemento alimentar. Curiosamente, tais grupos étnicos apresentam uma menor incidência de câncer comparado aos africanos e aos demais americanos (KAY, 1996; CORNETT, 2000). Ainda hoje, muitas espécies continuam sendo empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversos tipos de câncer. Segundo Goh (2000), as folhas de *P. grandifolia* são muito utilizadas na Malásia e na China para o tratamento de diferentes tipos de tumores, enquanto as folhas *P. bleo* são usadas para tratamento de câncer de pulmão na Malásia (SIDIK et al., 2009). Já no México, a espécie *Stenocereus thurberi* é usada para a cura de câncer de pele (HARLEV et al., 2013). Atualmente, muitos estudos fitoquímicos e farmacológicos já confirmaram o uso popular de muitas espécies para tratamento antitumoral (Quadro 2).

Segundo Hong e Sporn (1997), a ação dos quimioterápicos caracteriza-se pela inibição da iniciação, promoção e progressão, por ação farmacológica ou por agentes naturais, que impedem a ativação metabólica de pró-carcinógenos. Dentre os mecanismos de ação que impedem a proliferação das células neoplásicas, podem citar: (a) a indução de alterações no padrão de diferenciação celular, importantes na capacidade de invasão e metástase dos tumores; (b) o bloqueio da expansão de células neoplásicas ou pré-indução de apoptose, e (c) a intervenção da ativação metabólica dos carcinógenos pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SREEKANTH et al., 2007).

Quadro 2 - Principais metabólitos com atividade antineoplásica identificados em diferentes espécies da família Cactaceae.

FITOQUÍMICO	CLASSE	FONTE	REFERÊNCIAS
 <p>Betanina</p>	Betalainas	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Sreekanth <i>et al.</i> , 2007
 <p>Ácido betulínico</p>	Triterpenoides	<i>Stenocereus stellatus</i>	Kinoshita <i>et al.</i> , 1999
 <p>Dihidroactinidiolideo</p>	Terpenos	<i>Pereskia bleo</i>	Malek <i>et al.</i> , 2009
 <p>2,4-Di-tetra-butilfenol</p>	Polifenóis	<i>Pereskia bleo</i> <i>P. grandifolia</i>	Malek <i>et al.</i> , 2009 Sri Nurestri <i>et al.</i> , 2009
 <p>Peniocerol ($R_1 = H$, $R_2 = H$) Macgoldalina ($R_1 = H$, $R_2 = CH_3$)</p>	Esteróis	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Salazar <i>et al.</i> , 2011
 <p>Fitol</p>	Terpeno	<i>Pereskia bleo</i>	Malek <i>et al.</i> , 2009
 <p>Tocoferol (Vitamina E)</p>	Polifenóis	<i>Pereskia bleo</i>	Malek <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Adaptado de Harlev e colaboradores, 2013.

1.5.1 Atividade citotóxica

O potencial antineoplásico de uma espécie muitas vezes é verificado através de ensaios para atividade citotóxica do extrato vegetal ou metabólito sobre diferentes linhagens

celulares. De acordo com Cardellina II (1999), as substâncias antitumorais clinicamente empregadas possuem atividade citotóxica significativa em cultura de células *in vitro*. Contudo, um agente anticancerígeno eficaz será aquele capaz de eliminar as células neoplásicas sem afetar as células normais. Desta forma, estudos na área de imunofarmacologia buscam a identificação de drogas eficazes e seletivas, que exerçam pouco ou nenhum efeito colateral sobre o sistema imunológico do organismo em tratamento (SHAHNEH et al., 2013).

Durante muito tempo, o potencial citotóxico de uma substância era caracterizado pela sua capacidade de induzir a genotoxicidade (KAMESAKI, 1998). Entretanto, o efeito ideal do medicamento de agir somente sobre as células alteradas torna-se viável por indução de apoptose nas células cancerígenas (CRAGG; NEWMAN, 2005). A apoptose é o processo de morte celular programada que ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento, atuando como um mecanismo homeostático para a manutenção da populações de células nos tecidos (ELMORE, 2007). Todo este processo é regulado a partir de genes que promovem morte programada da célula, com padrões característicos de alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares, incluindo redução celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (VAUX; KORSMEYER, 1999).

O potencial antitumoral de muitas espécies vegetais tem sido comprovado a partir de diferentes estudos fitoquímicos e farmacológicos. O ginseng obtido da espécie *Panax ginseng* é uma das substâncias mais empregadas na supressão da atividade tumoral, interferindo na progressão do ciclo celular, aumentando a atividade imune, além de inibir a angiogênese tumoral (SATO et al., 1994). Os alcaloides vincristina e vimblastina, extraídos a partir das partes aéreas de *Catharanthus roseus*, são potentes agentes anticancerígenos contra diferentes tipos de tumores (ASLAM et al., 2010). A descoberta do paclitaxel (taxol), substância eficaz no tratamento de diversos tipos de câncer, reduziu drasticamente a população da espécie *Taxus brevifolia*, uma árvore de crescimento lento, que foi intensamente coletada para a obtenção do metabólito a partir de sua casca (ROWINSKY; DONEHOWER, 1995).

Diversas substâncias derivadas de cactos têm sido utilizadas como suplemento alimentar, especialmente por populações com alto risco para câncer (ZOU et al., 2005). Neste sentido, diversas espécies de cactáceas têm sido objeto de estudos citotóxicos contra diferentes linhagens tumorais, revelando resultados promissores (Figura 5).

Figura 5 - Potencial antitumoral reportado para diferentes espécies da família Cactaceae.

Cactus	Fraction/component studied	Cellular effect	Mechanism	IC ₅₀	Reference
<i>O. ficus-indica</i> <i>O. robusta</i> Amarillo <i>O. robusta</i> Gavia <i>O. robusta</i> Tapon <i>O. streptacantha</i> Cardon <i>O. violaceae</i> Moradillo <i>O. rastrera</i> Rastrero <i>O. leucotricha</i> Duraznillo Blanco <i>O. leucotricha</i> Duraznillo Rojo	Prickly pear juice	Diminished the viability of prostate, colon, mammary, and hepatic cancer cells	Antioxidant effects		Chavez-Santoscoy et al., 2009 [13]
<i>O. ficus-indica</i>	Aqueous cactus pear extract	Inhibited the growth of TCL-1, HeLa, Me180, IOSE, SKOV3, OVCA420, UM-UC6, T24, and UM-UC9 cells Displayed growth-inhibitory effect in OVCA420 and SKOV3 cells	↑ G1 phase; ↓ G2 & S phases ↑ Apoptosis; ↑ Bax; ↓ Bcl2, ↑ caspase-3; ↓ NF-κB, ↓ p-SAPK/JNK; ↑ p53; ↑ p21; ↑ p-AKT		Zou et al., 2005 [6] Feugang et al., 2010 [14]
	Betanin	Exhibited antiproliferative effects on in K562 cells	↑ Apoptosis; ↓ Bcl-2; ↑ caspase; ↑ Cyt. c; ↑ PARP cleavage	40 μM	Sreekanth et al., 2007 [[16]
<i>O. humifusa</i>	Aqueous fruit extract	Inhibited the proliferation of MCF-7 cells	Induced G1 arrest		Yoon et al., 2009 [17]
	Fruit and stem aqueous extracts	Suppressed the growth of U87MG cells	↑ Apoptosis; ROS-induced G1 arrest		Hahm et al., 2010 [18]
<i>P. bleo</i> (Kunth) DC	Aqueous leaf extract	Exhibited cytotoxic effects in T-47D cells	↑ Apoptosis; ↑ caspase-3; ↑ c-myc	2.0 μg/mL (EC ₅₀)	Tan et al., 2005 [24]
		Inhibited the proliferation of 4 T1 cells	↑ Apoptosis		Er et al., 2007 [26]
	Methanolic and ethyl acetate extracts	Induced cytotoxicity against KB cells		4.5–6.5 μg/mL	Sri Nurestret et al., 2008 [27]
	Dihydroactinidiolide	Induced cytotoxicity against HCT116 cells		5.0 μg/mL	Maleket al., 2009 [28]
	2,4-Di-tert-butylphenol	Induced cytotoxicity against KB, CasKi, A546, and MCF-7 cells		0.81–6 μg/mL	
	Phytol	Induced cytotoxicity against KB cells		7.1 μg/mL	
	α-Tocopherol	Induced cytotoxicity against CasKi, A549, and MCF-7 cells		6–7.5 μg/mL	
<i>P. grandifolia</i> Haw	Hexane extract	Induced cytotoxicity against KB cells		5 μg/mL	Sri Nurestret et al., 2009 [30]
	Ethyl acetate extracts	Induced cytotoxicity against KB and MCF-7 cells		16–20 μg/mL	
	2,4-di-tert-butylphenol	Exerted cytotoxicity against KB cells		0.81 μg/mL	
	Methanolic extract of leaves	Showed cytotoxicity against Saos-2 cells			Liew et al., 2012 [31]
<i>O. ficus-indica</i>	Aqueous cladode extract	Protected against B[a]P-induced genotoxicity in BALB/c male mice	↓ MDA; ↓ catalase; ↓ HSP70; ↓ HSP27; ↑ p53, ↑ Bax; ↓ Bcl-2	50 mg/kg (15–30 days); i.p.	Brahmi et al., 2011 [20]
		Reversed AFB ₁ -induced hepatic damage in BALB/c male mice	↓ MDA; ↓ PC; ↓ HSP70; ↓ HSP27; ↓ p53; ↓ Bax; ↑ Bcl-2	50 mg/kg (15–30 days); i.p.	Brahmi et al., 2011 [21]
		Exhibited antigenotoxic effects in CDDP-exposed male BALB/c mice	↓ MDA; ↓ catalase; ↑ SOD; ↓ p53; ↓ Bax; ↑ Bcl-2	50 mg/kg (15–30 days); i.p.	Brahmi et al., 2012 [22]
	Aqueous cactus pear extract	Suppressed tumor growth in female BALB/c mice xenografted with SKOV3 cells	↑ Apoptosis; ↓ VEGF	0.4 mL/mouse/day (5 days); i.p.	Zou et al., 2005 [6]
<i>O. humifusa</i>	Cactus fruit powder	Decreased numbers of papillomas and epidermal hyperplasia in DMBA-treated female BALB/c mice	↑ Apoptosis; ↓ MDA; ↑ SOD; ↑ GST	1, 3% (3 weeks); diet	Lee et al., 2012 [23]

Fonte: Retirado de Harlev e colaboradores, 2013.

1.5.2 Atividade antioxidante

Uma vez que a evolução das espécies na Terra ocorreu em um ambiente cada vez mais

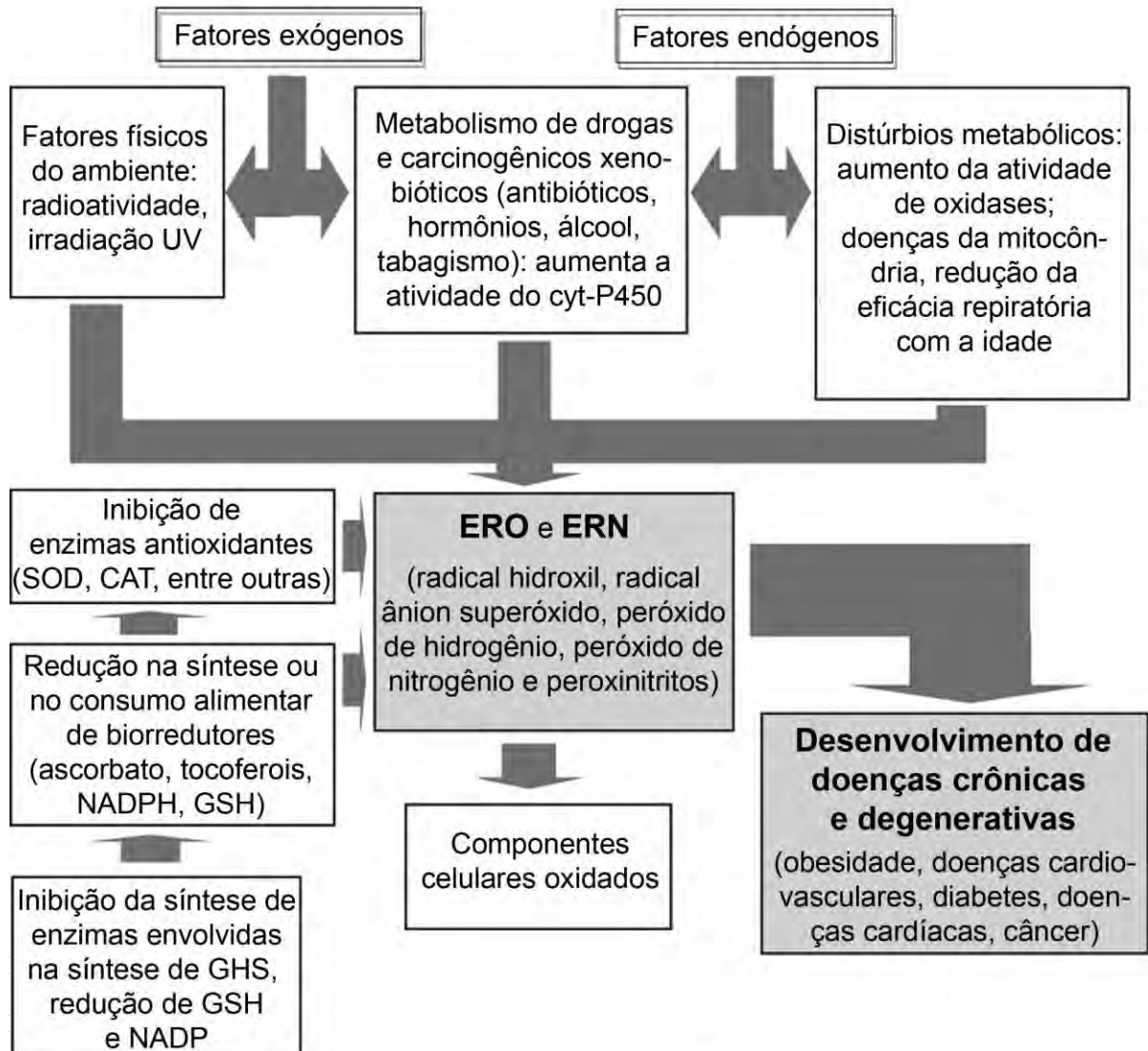
concentrado de oxigênio, é fundamental que os organismos aeróbios apresentem uma proteção bioquímica que evitem a excessiva oxidação celular, um sistema de defesa antioxidante biológico (CEMELI et al., 2009). Contudo, o atual modo de vida da população contribui sobrecarregando os mecanismos antioxidantes naturais, resultando em danos oxidativos celulares, que podem desencadear inúmeras doenças degenerativas. Deste modo, o consumo de substâncias antioxidantes poderá atuar não apenas na captura de radicais livres, mas também estimulando o sistema imunológico (DAS et al., 2012).

Em 1985, Helmut Sies definiu pela primeira vez o termo estresse oxidativo como um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante da célula, favorecendo a ocorrência do primeiro. Ao longo dos anos, diversos estudos contribuíram para uma maior compreensão das reações que envolvem o estresse oxidativo, o qual passou a ser definido como “*Situação que ocorre quando a concentração de ERO é aumentada de forma crônica ou transitória, interferindo no metabolismo celular e causando danos aos constituintes da célula*” (LUSHCHAK, 2011).

O estresse oxidativo é provocado por ERO que são produzidas durante o metabolismo celular aeróbio normal e alterado. De forma geral, o metabolismo incompleto do oxigênio atmosférico pode levar à geração de formas parcialmente reduzidas, como o oxigênio atômico (O_2^1), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila (OH^-), as quais são capazes de oxidar vários componentes celulares, sem restrições, e conduzir à destruição oxidativa da célula (KIRKINEZOSA; MORAES, 2001). Neste contexto, diversos estudos apontam que os radicais livres formados durante o metabolismo celular ou gerados a partir de fontes externas, seja pelo consumo de álcool, exposição à radiação ou às substâncias tóxicas, atuam diretamente sobre os componentes celulares e apresentam estreita relação com diversas patologias, incluindo muitas doenças crônicas (SHIBATA; KOBAYASHI, 2008; KADENBACH et al., 2009; MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2013) (Figura 6).

Muitos mecanismos de defesa evoluíram a fim de reduzir a produção de oxidantes e os danos celulares causados por estes. Substâncias antioxidantes são aquelas capazes de inibir ou atrasar a oxidação de substratos, mesmo que estejam presentes em concentrações inferiores ao substrato a ser oxidado. Tais moléculas podem ser recicladas na célula ou irreversivelmente danificadas, porém seus produtos de oxidação são menos prejudiciais ou podem ser convertidos em substâncias inofensivas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Diferentes mecanismos de ação podem garantir a propriedade antioxidante de uma substância, a qual pode ocorrer a partir da captura de ERO, da inibição da formação de ERO por ligação com metais ou por inibição enzimática.

Figura 6 - Esquema representando as diferentes vias de produção de radicais livres e geração do estresse oxidativo.



Para o organismo a proteção antioxidante é garantida por diversas enzimas, como a superóxido desmutase, a catalase e a glutatona peroxidase, além de moléculas antioxidantes de baixo peso molecular, como ácido ascórbico, ácido úrico, glutatona, tocoferóis, entre outras. Assim, os antioxidantes interferem na cascata de propagação de radicais livres e evitam danos celulares (MATKOWSKI, 2008). Dentre os antioxidantes enzimáticos a glutatona S-transferase atua inativando radicais aldeídos produzidos pela peroxidação lipídica (HAYES et al., 2005) e a glutatona peroxidase degrada os hidroperóxidos de lipídios (KOULAJIAN et al., 2013). As proteínas transferrina e ferritina agem como quelantes de íons

como o ferro e o cobre, evitando a formação de substâncias oxidantes (THEIL, 2010), enquanto o reparo do DNA é realizado por enzimas específicas para bases oxidadas juntamente com enzimas de reparo não específicas, que removem as lesões na molécula (LINDAHL, 2013).

Neste contexto, considerando que muitas lesões no DNA causadas por danos oxidativos, podem ser a causa de diversos tipos de câncer (ERDEMOGLU et al., 2006), a identificação de moléculas com ação antioxidante a partir de extratos vegetais torna-se muito relevante na busca de novas drogas com potencial antineoplásico. Na família Cactaceae, os frutos produzidos por espécies do gênero *Opuntia*, conhecidos como pera espinhosa ou figo de cacto, são ricos em vitamina C e seu consumo regular afeta positivamente o balanço redox celular, reduzindo o dano oxidativo aos lipídios e favorecendo a condição antioxidante do organismo (SHETTY et al., 2011). Já em espécies do gênero *Pereskia*, a atividade antioxidante tem sido observada a partir de extratos foliares obtidos de *P. bleo* (SIM et al., 2010), *P. grandifolia* (ADIB et al., 2010) e *P. aculeata* (SILVA et al., 2012).

1.6 Biotecnologia vegetal aplicada à produção de metabólitos especiais

Na busca de estratégias biotecnológicas para a síntese de metabólitos secundários de interesse, a cultura de tecidos vegetais representa uma importante ferramenta tanto para produção de biomassa e substâncias bioativas, quanto para a conservação e uso sustentável da biodiversidade (RAO; RAVISHANKAR, 2002; VANISREE et al., 2004). A cultura de tecidos vegetais envolve diversas técnicas relacionadas ao cultivo de células, tecidos ou órgãos, em meio nutritivo adequado e sob condições assépticas, tornando possível, por exemplo, a produção de metabólitos de interesse sob condições controladas, reduzindo os efeitos da variação dos fatores ambientais (BOTTA et al., 2001).

A cultura *in vitro* baseia-se principalmente na totipotência vegetal, ou seja, na capacidade de produzir órgãos (organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese somática) em um meio nutritivo favorável, o qual fornece substâncias essenciais ao crescimento dos tecidos cultivados e também participa do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Deste modo, as diferentes técnicas permitem interferir nas rotas biossintéticas, afetando tanto quantitativa como qualitativamente a produção dos metabólitos, constituindo uma valiosa fonte de moléculas bioativas. Além disso, possibilita a produção de substâncias que geralmente não são sintetizadas pela planta ou mesmo, permitem que moléculas produzidas apenas por certos tipos celulares ou órgãos,

sejam produzidos pelas células em cultura (AMARAL; SILVA, 2003; VANISREE et al., 2004).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, o cultivo de estruturas organizadas, como a cultura de brotos e de raízes adventícias, em meio nutritivo suplementado com diferentes sais minerais e reguladores de crescimento, pode induzir ou estimular a produção de metabólitos secundários. Em estudos de Santoro e colaboradores (2013), a adição de cinetina ao meio de cultura aumentou a produção de óleos essenciais em brotos de *Mentha piperita*, enquanto nas culturas de raízes adventícias de *Hypericum perforatum*, o aumento da produção de flavonoides ocorreu após uma alteração da fonte de nitrogênio presente no meio (CUI et al., 2010).

A cultura de calos caracteriza-se pela indução de massas celulares desorganizadas (calo) a partir do cultivo de explantes (segmentos obtidos a partir de diferentes órgãos vegetais) em meio nutritivo adequado, em um processo denominado calogênese (TORRES et al., 2000). Os calos obtidos *in vitro* podem apresentar diferentes consistências em função do explante e/ou do meio de cultura utilizado, e desta forma, apresentar diferentes respostas morfogenéticas. Os calos compactos apresentam alta coesão celular, e geralmente, são organogênicos, ou seja, capazes de regenerar brotos e raízes. Já os calos friáveis, são mais indicados para a produção de metabólitos especiais, uma vez que a pouca coesão entre as células facilita o cultivo, a produção e a extração de substâncias bioativas (ANDRADE, 2002). Muitos estudos têm reportado a produção de diferentes metabólitos a partir da cultura de calos, como a síntese de antocianinas em *Cleome rosea* (SIMÕES et al., 2009), alcaloides em *Stephania tetrandra* (KUO et al., 2011) e betalainas em *Zaleya decandra* (RADFAR et al., 2012).

A cultura de células em suspensão (CCS) consiste no cultivo de células, geralmente obtidas a partir da cultura de calos friáveis, em frascos contendo meio de cultura líquido, os quais são mantidos sob agitação constante. Nesta técnica, o metabólito muitas vezes pode ser excretado para o meio de cultura, facilitando sua extração e a manutenção da cultura. Este consiste no principal sistema de produção de metabólitos especiais *in vitro*, com resultados positivos em muitas espécies, como a síntese de fitoesteróis em *Centella asiatica* (BONFILL et al., 2011), de polifenóis em *Vitis vinifera* (MEWIS et al., 2011) e alcaloides em *Arnebia hispidissima* (SHEKHAWAT; SHEKHAWAT, 2011).

A cultura de células imobilizadas também é uma estratégia biotecnológica eficaz para a produção de metabólitos *in vitro*, uma vez que fornece um microambiente diferenciado às células, aumenta o contato célula-célula, protegendo-as do estresse causado durante a agitação

da cultura, reduz a divisão celular desnecessária, aumenta o nível de diferenciação celular e favorece a produção de metabólitos secundários (XIAO et al., 2009). A utilização desta estratégia possibilitou o aumento da secreção de taxol em *Taxus cuspidata* (CHENG et al., 2008), rutina em *Morus bombycis* (HAN et al., 2012) e de alizarina e purpurina em *Rubia tinctorum* (NARTOP et al., 2013).

A cultura do tipo “hairy root” ou “raízes em cabeleira”, baseada na infecção do tecido vegetal pela *Agrobacterium rhizogenes*, tornou-se popular nas últimas décadas como um eficiente sistema de produção de metabólitos produzidos pelas raízes das plantas (PALAZON et al., 1997). As raízes em cabeleira são caracterizadas por um rápido crescimento, independentes de fitorreguladores, ausência de geotropismo e ramificação lateral e estabilidade genética (KARUPPUSAMY, 2009). Esta técnica biotecnológica permitiu a produção de resveratrol de *Arachis hypogaea* (KIM et al., 2008) e de alcaloides tropânicos em *Hyoscyamus muticus* (DEHGHAN et al., 2012).

Muitos estudos relatam que a adição de elicitores na cultura *in vitro* pode aumentar significativamente a produção de metabólitos secundários (ZHAO et al., 2005). A elicitação consiste na adição de moléculas que simulam estresses ambientais, e desta forma, são capazes de interferir no metabolismo celular, sendo considerada uma das estratégias mais promissoras para o aumento na produção de metabólitos (GEORGIEV et al., 2008). A adição de metil jasmonato e β -glucano aumentou os níveis de betacianina na cultura de células em suspensão de *Potulaca sp.* (BHUIYAN; ADACHI, 2003), enquanto a exposição ao ozônio aumentou a produção de isoflavonoides em *Pueraria thomsnii* (SUN et al., 2012). Estudos de Tang e colaboradores (2011) mostraram que elicitores obtidos a partir de fungos aumentaram a síntese de alcaloides quando adicionados à cultura de células em suspensão de *Catharanthus roseus*.

A produção de metabólitos secundários também pode ser estimulada a partir da suplementação ao meio de cultura de intermediários da via biossintética da substância de interesse. Para empregar esta técnica é preciso possuir total conhecimento da rota biossintética do metabólito, bem como se este é o produto final da via metabólica e pode ser armazenado pela célula (DICOSMO; MISAWA, 1995). Resultados positivos após a adição de precursores às culturas foram obtidos na produção do alcaloide trigonelina em *Moringa oleifera* (MATHUR; KAMAL, 2012) e na síntese de polifenóis a partir da cultura de células de *Larrea divaricata* (PALACIO et al., 2011).

Nas últimas décadas, a cultura de tecidos na família Cactaceae tem sido empregada para a propagação *in vitro* de muitas espécies de cactos ornamentais e espécies ameaçadas,

como *Coryphantha elephantidens* (WAKHLU; BAHU, 2000), *Mammillaria elongata* (PAPAFOTIOU et al., 2001), *Mammillaria mathildae* (GARCÍA-RUBIO et al., 2010), *Notocactus magnificus* (DE MEDEIROS et al., 2006), *Obregonia denegrii* (MALDA et al., 1999; CARDARELLI et al., 2010), *Opuntia ficus-indica* (EL FINTI et al., 2012), *Pelecypora spp.* (PERES-MOLPHE-BALCH; DA'VILA-FIGUEROA, 2002), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (MOEBIUS-GOLDAMMER et al., 2003), *Turbinicarpus spp.* (DA'VILA-FIGUEROA et al., 2005). Entretanto, há poucos dados na literatura sobre a produção *in vitro* de metabólitos, com destaque para a produção de betaxantinas a partir da cultura de calos de *Mammillaria candida* e para a produção de alcaloides em calos de *Cereus peruvianus* (OLIVEIRA; MACHADO, 2003).

Diante do exposto, o presente estudo abordará o emprego de diferentes técnicas biotecnológicas visando ao estabelecimento de plantas e culturas *in vitro* em que sejam verificadas propriedades antioxidante e antineoplásica. Desta forma, o trabalho será apresentado em capítulos, dentro dos objetivos propostos, conforme a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer protocolos de produção de plantas, calos, células em suspensão e metabólitos sob condições *in vitro* com vistas à avaliação do potencial antioxidante e antineoplásico de *Pereskia aculeata* Mill.

2.2 Específicos

- Estabelecer um protocolo de germinação *in vitro* visando à produção de plântulas, a serem utilizadas como fonte de explantes;
- Avaliar o efeito de diferentes tipos de explantes, meios de cultura e fitorreguladores sobre a indução de gemas e a proliferação de brotos;
- Avaliar as taxas de enraizamento e aclimatização com vistas ao estabelecimento *ex vitro*;
- Avaliar o conteúdo de proteínas totais presente nas folhas de plantas cultivadas *in vivo* e *ex vitro*;
- Avaliar a influência de diferentes explantes, composições salínicas e fitorreguladores sobre a calogênese;
- Estabelecer um protocolo de cultura de células em suspensão;
- Avaliar a influência de diferentes condições de cultura na produção de metabólitos a partir de culturas de calos e células em suspensão;
- Caracterizar o perfil fitoquímico do material vegetal cultivado *in vivo*, *in vitro* e *ex vitro*;
- Realizar diferentes testes para determinação do potencial antioxidante de amostras obtidas de culturas *in vivo*, *in vitro* e *ex vitro*;
- Avaliar o potencial antineoplásico do material vegetal cultivado *in vivo*, *in vitro* e *ex vitro* sobre diferentes linhagens tumorais.

3 GERMINAÇÃO *IN VITRO*, MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE *Pereskia aculeata* MILL. CULTIVADA *IN VIVO* E *EX VITRO*

3.1 Introdução

A germinação consiste em uma das etapas fundamentais no ciclo de vida das plantas, uma vez que a eficiência deste processo irá influenciar diretamente na distribuição das espécies (HONÓRIO et al., 2011). O conhecimento sobre os aspectos morfológicos envolvidos no desenvolvimento pós-seminal são importantes não apenas para a manutenção da biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2006), mas também contribuem com informações para a classificação taxonômica, filogenética, bem como para estudos ecológicos sobre a regeneração natural de ecossistemas (MORAES; PAOLI, 1999; OLIVEIRA, 2001). Contudo, em muitos grupos vegetais, como ocorre com a família Cactaceae, a propagação sexuada ainda consiste em um método pouco empregado, havendo poucos dados disponíveis na literatura sobre a caracterização de sementes e plântulas, principalmente para espécies nativas (ABUD et al., 2010, 2012).

Além de material inicial para a propagação sexuada, as sementes podem ser usadas em alguns métodos de conservação vegetal. A conservação de germoplasma vegetal utilizando banco de sementes pode ser uma estratégia vantajosa para as cactáceas, uma vez que muitas espécies apresentam sementes ortodoxas, as quais são capazes de manter altas taxas de germinação, mesmo após longos períodos de armazenamento em condições de baixa temperatura e umidade (REIS et al., 2012). Entretanto, a manutenção de coleções naturais destas espécies torna-se dificultada, uma vez que plantas suculentas são sensíveis à contaminação por fungos e bactérias, os quais prejudicam a germinação e podem favorecer o crescimento anormal das plântulas (CASTRO et al., 2011). Desta forma, a biotecnologia vegetal apresenta-se como uma eficiente alternativa para a conservação *in vitro* de germoplasma de várias espécies, utilizando diferentes técnicas da cultura de tecidos (SANTOS et al., 2012; SHUKLA et al., 2012).

A micropropagação, uma das técnicas aplicadas na cultura de tecidos vegetais, tem sido amplamente utilizada na produção de mudas em escala comercial, com aplicação na agricultura e no fornecimento de espécies ornamentais e de reflorestamento (HUSSAIN et al., 2012). O sucesso da cultura de tecidos vegetais deve-se à totipotencialidade das células vegetais, a qual permite que células somáticas diferenciadas voltem a se dividir, rediferenciando-se em plantas completas e expressando capacidade bioquímica especializada, quando cultivadas em condições favoráveis (TORRES et al., 1998).

No cultivo a campo, as técnicas envolvendo a propagação convencional mostram-se lentas e sujeitas a variações ambientais, enquanto a cultura *in vitro* viabiliza a produção sustentável para espécies de interesse (COSTA et al., 2007). Além da rápida obtenção de um grande número de mudas em tempo e espaço reduzidos, a micropropagação pode ser aplicada na conservação *ex situ* de plantas selecionadas, mantendo as características fenotípicas e contribuindo na erradicação de pragas e doenças das culturas (PRAKASH; VAN STADEN, 2007).

A micropropagação pode ser conduzida a partir da multiplicação de zonas meristemáticas pré-existentes, como gemas axilares e/ou ápices caulinares; por organogênese direta, através da indução de gemas adventícias a partir de regiões não meristemáticas, que podem ser formadas diretamente nos tecidos, ou por organogênese indireta, em que a formação do órgão é precedida pela formação de calos (ANGULO-BEJARANO; PAREDES-LÓPEZ, 2011). A micropropagação também pode ser alcançada via de embriogênese somática, que consiste na indução de embriões a partir de células somáticas, de maneira direta ou indireta, na qual o embrião formado possui a capacidade de germinar *in vitro* desenvolvendo-se em uma plântula completa (LEMA-RUMINSKA et al., 2013).

A cultura *in vitro* pode induzir diferentes tipos de alterações somaclonais, como modificações fenotípicas, cromossômicas, além de instabilidades genéticas e epigenéticas, dependendo da via de regeneração obtida e das condições de cultura (DAN; WILSON, 2011; SMULDERS; KLERK, 2011). Deste modo, considerando que tais alterações são mais frequentes em plantas obtidas a partir de calos, seja por organogênese ou embriogênese indireta (SANAL-KUMAR; MATHUR, 2004; RODRÍGUEZ LÓPEZ et al., 2010), a utilização de explantes contendo gemas pré-existentes reduz as chances de ocorrência de variações somaclonais, favorecendo o estabelecimento de culturas com alta fidelidade genética (WU et al., 2012).

Estudos de propagação *in vitro* têm sido realizados com diferentes cactáceas, principalmente devido ao elevado valor nutritivo e ornamental de muitas espécies (LENG; KENG, 2007; VIÑAS et al., 2012; EL-FINTI et al., 2012, 2013). Neste contexto, *Pereskia aculeata* Mill., uma cactácea nativa distribuída na região tropical das Américas, apresenta características que justificam os métodos de cultivo e conservação *in vitro*. Conhecida no Brasil como ora-pro-nóbis, a espécie apresenta alto valor cultural, econômico e nutricional, além de propriedades farmacológicas já comprovadas, características que justificam a sua indicação como um alimento funcional.

Deste modo, considerando a escassez de literatura disponível sobre a espécie e o seu

elevado potencial nutracêutico, o objetivo deste estudo foi estabelecer a germinação e a propagação *in vitro* de *P. aculeata* e determinar a quantidade de proteínas totais nas folhas obtidas de plantas de campo e aclimatizadas, visando à produção de biomassa a ser utilizada na produção de metabólitos de interesse.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Botânico

Sementes de *Pereskia aculeata* foram obtidas a partir de frutos maduros doados pelo Sítio Flora Bioativas, localizado em Porto Belo, Santa Catarina. Uma amostra do material acessado encontra-se depositado no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob o registro HRJ 11849. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Alexandre Gabriel Christo (*in memoriam*). Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), pertencente ao Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Para caracterização morfológica do material botânico, 50 frutos foram avaliados quanto à forma, coloração, peso de matéria fresca (PF) e número de sementes por fruto. A partir destes frutos, 50 sementes foram selecionadas e avaliadas morfológicamente (forma, coloração e PF). Para aferição do PF, os frutos e as sementes foram pesados individualmente em balança de precisão.

3.2.2 Germinação *in vitro*

As sementes foram lavadas em água corrente com sabonete líquido anti-séptico e separadas em quatro grupos com 20 sementes em cada. Uma parte das sementes foi imersa por um minuto em etanol e mantida, sob agitação constante, em NaOCl a 1% durante 10 ou 20 min (grupos E1 e E2, respectivamente). Em outro lote, as sementes foram submetidas ao tratamento com NaOCl a 2% acrescido de Tween 80® (0,05 %) durante 10 ou 20 min (grupos T1 e T2 respectivamente) (Tabela 1). Em seguida, em câmara de fluxo

laminar, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril, visando à completa remoção dos agentes desinfestantes.

As sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 8 g.L⁻¹ de ágar (Merck). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C, 104 KPa), por 15 min. Os tubos de ensaio foram vedados com tampa dupla de folha de alumínio e mantidos em câmara de crescimento a 26±2°C, sob intensidade luminosa de 45 μmol m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

Tabela 1 - Tratamentos para desinfestação de sementes de *P. aculeata* visando à germinação sob condições *in vitro*.

Grupos	Tratamento	Tempo
E1	Etanol (1 min) + NaOCl 1%	10 min
E2	Etanol (1 min) + NaOCl 1%	20 min
T1	NaOCl 2% + Tween 80 (0,05%)	10 min
T2	NaOCl 2% + Tween 80 (0,05%)	20 min

Para a avaliação do processo germinativo, o início da germinação foi caracterizado a partir da protrusão da radícula e o término, quando as plântulas apresentavam o primeiro par de folhas. Neste estudo, o processo germinativo foi acompanhado durante cerca de 70 dias, onde foi avaliada a porcentagem e a velocidade de germinação *in vitro*, o tamanho das plântulas formadas, bem como a taxa de contaminação das sementes. A velocidade de germinação foi calculada através do Índice de Velocidade de Germinação (IVG = $G_1/N_1 + G_2/N_2 + G_3/N_3 + \dots + G_n/N_n$) para cada tratamento, no qual G_1 , G_2 , G_3 e G_n corresponde ao número de sementes germinadas na primeira contagem, na segunda, na terceira e na última contagem, enquanto N_1 , N_2 , N_3 e N_n indica o

número de dias após a inoculação das sementes (BIRUEL et al., 2007).

3.2.3 Micropropagação

3.2.3.1 Indução de gemas e proliferação de brotos

Plântulas com 50 dias de desenvolvimento, oriundas do processo de germinação *in vitro*, foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de micropropagação. Sob condições assépticas, segmentos de hipocótilo, epicótilo (região nodal) e folha foram seccionados com o auxílio de um bisturi, em placas de Petri contendo 20 mL de água destilada estéril. Os explantes apresentavam cerca de 1 cm para segmentos caulinares e 1 cm², para os foliares. Os segmentos caulinares foram inoculados na posição vertical e os foliares com a face abaxial em contato com o meio. Todos os explantes foram cultivados em frascos de vidro (65 mm x 85 mm) contendo 30 mL de meio de cultura e vedados com tampa de polipropileno. Em todos os tratamentos realizados foram inoculados quatro explantes em cada frasco de cultura.

Visando à indução de gemas e à proliferação de brotos, duas formulações de sais e vitaminas foram testadas e diferentes fitorreguladores adicionados ao meio de cultura. Foram utilizados o meio básico MS e o meio básico B5 (GAMBORG et al., 1968), contendo 30 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹ de sacarose, respectivamente. Os meios foram suplementados com as citocininas BA (benzilaminopurina) ou KIN (cinetina) em diferentes concentrações (2, 4, 6, 8 e 10 µM). A fim de otimizar a produção de brotos, um segundo experimento foi realizado, no qual diferentes concentrações (0,1; 0,2 e 0,3 µM) da auxina ANA (ácido α-naftalenoacético) foram adicionadas ao meio básico associadas à melhor citocinina, verificada após o primeiro experimento. Os meios nutritivos tiveram o pH ajustado em 5,8 e foram solidificados com ágar (8 g.L⁻¹, Merck), antes da esterilização em autoclave (121°C, 104 KPa) por 15 min.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sob intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h, durante 120 dias. A cada 30 dias, os brotos proliferados ($\geq 0,5$ cm) foram individualizados e subcultivados em meio de cultura de igual composição. Durante quatro subculturas (120 dias), avaliou-se a porcentagem de explantes responsivos, o número de brotos formados por explante e o tamanho dos brotos formados.

3.2.3.2 Alongamento e Enraizamento *in vitro*

Após 120 dias de cultura, os brotos propagados *in vitro* foram individualizados e inoculados em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura MS sem reguladores de crescimento (MS0). Os frascos de cultura (65 mm x 85 mm), contendo quatro brotos em cada, foram vedados com tampa de polipropileno. As culturas foram mantidas durante 30 dias nas mesmas condições físicas descritas anteriormente, onde foram avaliados a taxa de enraizamento e o comprimento dos brotos.

3.2.3.3 Aclimatização

Após 30 dias de cultivo, os brotos enraizados *in vitro* foram selecionados e submetidos à aclimatização. Inicialmente, as plantas foram removidas dos frascos de cultura e suas raízes lavadas para remoção do excesso de meio de cultura aderido. Em seguida, os brotos foram transferidos para vasos plásticos contendo como substrato terra vegetal adubada (West Garden[®]). Os vasos foram cobertos com uma campânula de plástico transparente, previamente umedecida com água corrente e a rega realizada em dias alternados. As plantas foram mantidas em sala ambiente, com temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e sob iluminação natural. Após uma semana, a campânula foi removida dos vasos e o desenvolvimento das plantas acompanhado durante três meses. Avaliou-se a taxa de sobrevivência e o comprimento das plantas aclimatizadas.

3.2.4 Avaliação da abscisão foliar

Parte dos brotos enraizados em meio MS0 foi mantida sob condições *in vitro*, visando

à manutenção de um estoque de plantas saudáveis e em condições assépticas, para posterior uso como fonte de explantes em outros ensaios de cultura de tecidos vegetais. Após 30 dias em meio MS0, as plantas enraizadas foram seccionadas na região basal do eixo caulinar (cerca de 2,0 cm), subcultivadas em meio de cultura fresco, de igual composição, e mantidas em câmara de crescimento a $26\pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h.

Após o segundo subcultivo, observou-se um aumento na queda foliar das plantas mantidas *in vitro* em meio MS0. Para avaliar se a abscisão foliar decorria da disponibilidade de água no meio de cultura, foi realizado um experimento no qual os brotos foram subcultivados em meio MS, com $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, sem reguladores de crescimento, porém com diferentes concentrações de ágar (8; 10 ou $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Foram inoculados quatro brotos em cada frasco de cultura. A cada 30 dias, as plantas foram subcultivadas para novo meio de cultura, de mesma composição, onde a abscisão foliar foi avaliada a partir do número de folhas caídas em cada frasco de cultura. As culturas foram subcultivadas e avaliadas durante 90 dias (três subculturas).

3.2.6 Análise quantitativa de proteínas totais

3.2.5.1 Preparo das amostras

Folhas obtidas de plantas cultivadas a campo e de plantas aclimatizadas foram pesadas e secas em estufa a 40°C , até peso constante, para obtenção dos pesos de matéria fresca e seca das amostras. Em seguida, o material foi triturado e submetido à extração com álcool metílico (Merck) a $26\pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, sob agitação constante, durante 14 dias. Os extratos obtidos foram filtrados em papel Whatman (nº1), concentrados sob pressão reduzida a 40°C e secos a vácuo em evaporador rotativo até peso constante.

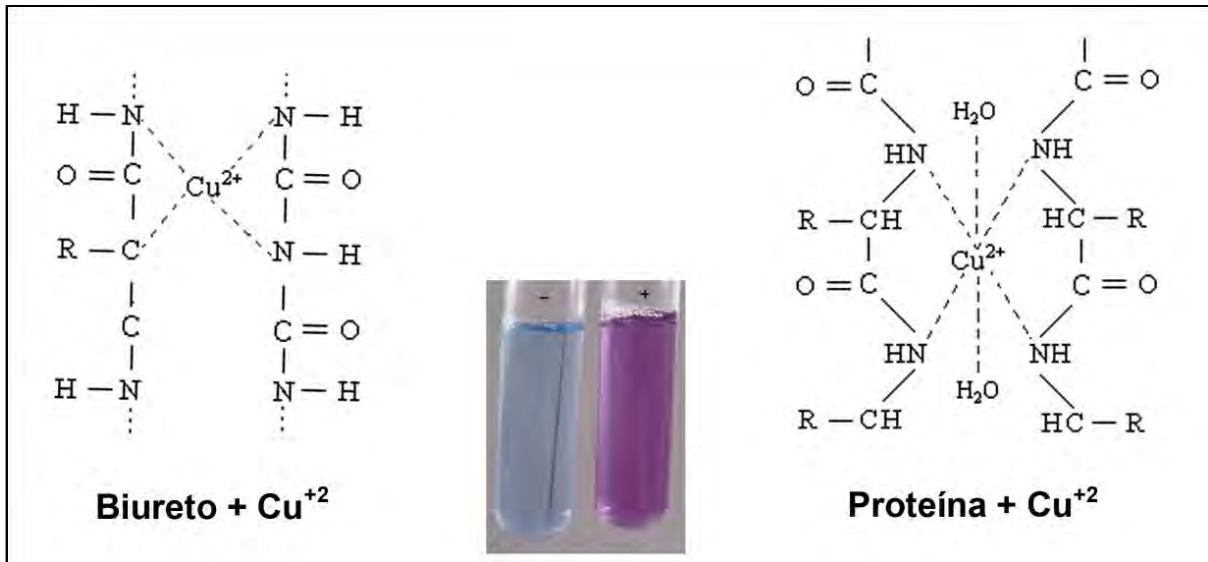
Para a realização da dosagem de proteínas, os extratos secos foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e estocados na concentração de 100 mg/mL , a 10°C e no escuro. A diluição das amostras foi realizada no momento da realização de cada experimento.

3.2.5.2 Quantificação de proteínas totais

O método empregado para a determinação de proteínas totais nas folhas de *P. aculeata* foi o teste do biureto (GORNALL et al., 1949). O ensaio se baseia na reação do biureto (composto formado a partir da degradação da uréia a 180°C) com solução alcalina de sulfato de cobre, onde os íons Cu^{2+} se ligarão aos átomos de nitrogênio presentes no biureto, formando um complexo de coloração violeta. Deste modo, uma vez que as ligações na molécula de biureto são muito semelhantes às ligações peptídicas entre os aminoácidos, a

reação entre proteínas e o sulfato de cobre, em solução alcalina, também promove a formação de um composto de cor violeta, sendo conhecido como Teste do Biureto (Figura 7).

Figura 7 - Reação entre o íon Cu^{2+} presente no reagente de biureto com os grupamentos amina dos aminoácidos.



Fonte: Adaptado de http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/reacoes_coradasdois3.htm. Acesso em março de 2015.

Para a realização do teste, o reagente de biureto foi preparado a partir da dissolução de 1,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 6 g de $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 500 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se, sob agitação, 300 mL de solução de NaOH a 10% (p/v) e 1 g de KI. A solução teve seu volume final aferido em 1L após adição de água destilada.

A reação foi conduzida em tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 25 μL de amostra em diferentes concentrações (3,125; 6,25; 12,5 e 25 mg/mL) e 350 μL de reagente de biureto. Os tubos foram agitados e, após 15 min, as amostras (100 μL) foram aplicadas em uma placa de 96 poços, para leitura em espectrofotômetro a 570 nm. A quantificação de proteínas foi realizada a partir da curva padrão de BSA (albumina de soro bovino). O experimento foi conduzido em triplicata e foram realizadas duas repetições.

3.2.7 Análise estatística

Os resultados referentes à germinação *in vitro*, à propagação *in vitro* e à quantificação de proteínas foram submetidos à análise de variância (ANOVA *one way*) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, com 95% de confiança ($p \leq 0,05$). Entretanto, na avaliação de duas variáveis independentes na propagação *in vitro*, como o tipo de meio básico e o tipo

de fitorregulador, assim como o tipo e a concentração do fitorregulador, utilizou-se o ANOVA *two way*, sendo realizado o pós-teste de Bonferroni para comparação entre as médias obtidas. Em todas as análises foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

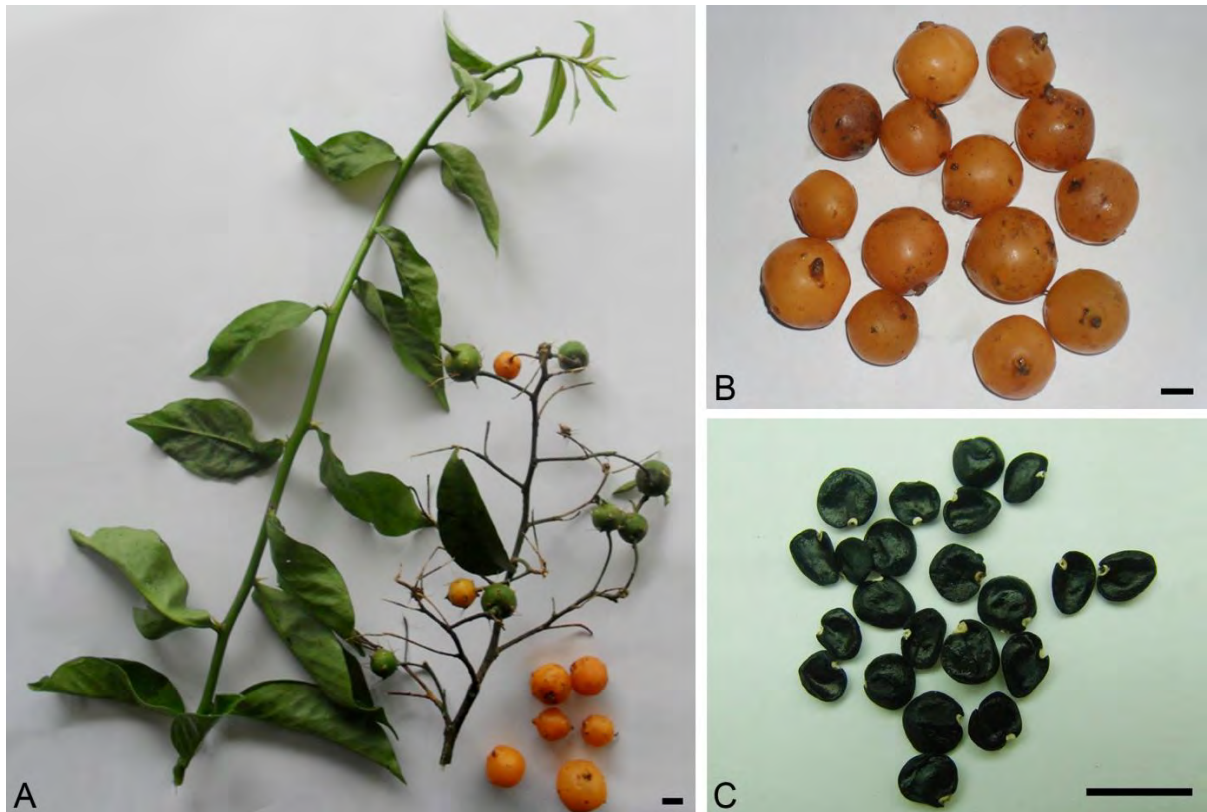
3.3 Resultados

3.3.1 Germinação *in vitro*

Os frutos maduros fornecidos pelo Sítio Flora Bioativas apresentaram peso de matéria fresca de $5,37 \pm 1,58$ g e possuem em média $2,74 \pm 1,57$ sementes, as quais se mostravam negras, brilhantes, com formato lenticular e com cerca de $0,021 \pm 0,005$ g de peso de matéria fresca (Figura 8 A - C).

Uma semana após a inoculação das sementes de *P. aculeata* em meio MS sem fitorreguladores, foi possível observar a protrusão radicular em algumas sementes, indicando o início do processo germinativo. O desenvolvimento pós-seminal sob condições *in vitro* ocorreu ao longo de sete semanas, sendo acompanhado desde a emergência da radícula até a formação e expansão do primeiro par de folhas.

Figura 8 - Amostras de *Pereskia aculeata* Mill.

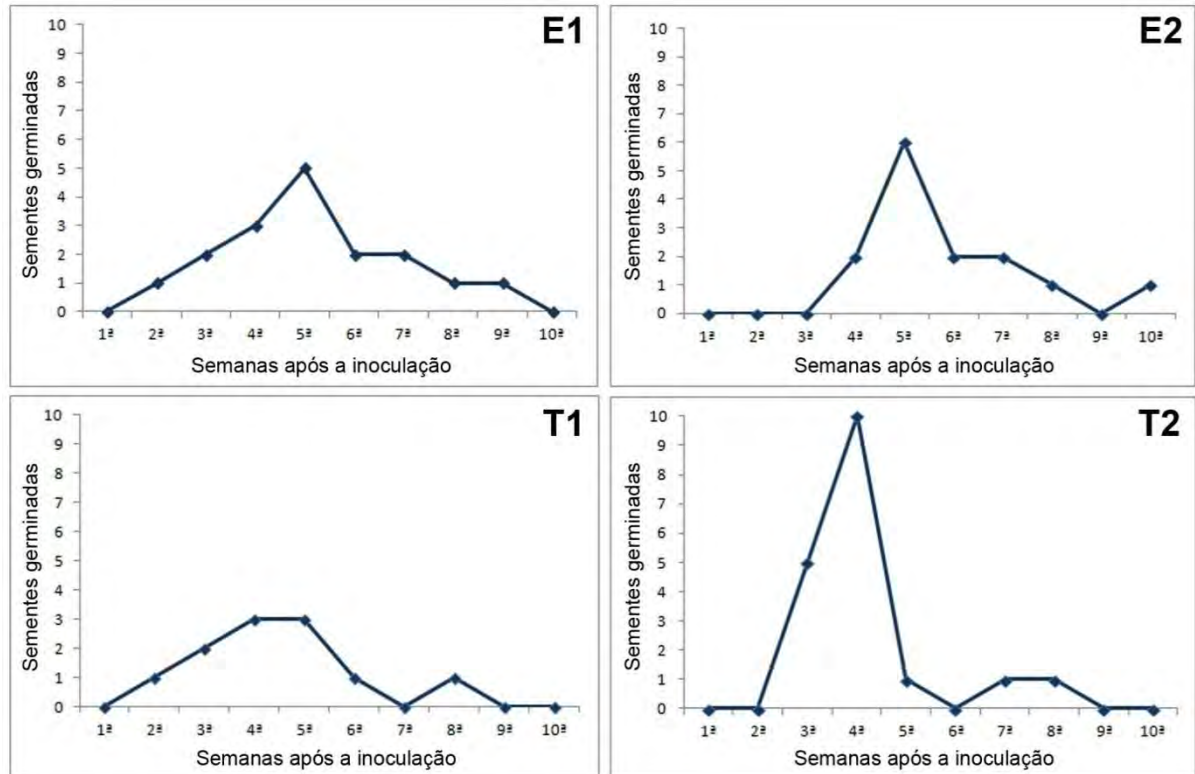


Legenda: A- Material botânico depositado em herbário com ramo contendo frutos em diferentes estágios de maturação; B- Frutos maduros; C- Sementes maduras coletadas a partir dos frutos. Barras=1 cm.

Todos os protocolos testados para a desinfestação das sementes mostraram-se eficientes, uma vez que não foi verificada contaminação fúngica ou bacteriana em nenhum dos tratamentos realizados. Nas sementes submetidas ao menor tempo de exposição ao NaOCl (tratamentos E1 e T1), o início do processo germinativo foi observado após uma semana de cultura, enquanto nos demais tratamentos a germinação ocorreu apenas a partir da terceira (T2) e da quarta semana (E2). Independentemente do tratamento de desinfestação ao qual as sementes foram submetidas, a maior porcentagem de germinação ocorreu entre a quarta e quinta semana, exceto para o tratamento T2, onde a maior parte das sementes germinou entre a terceira e quarta semana após o início das culturas (Figura 9).

Após 10 semanas de cultivo, foi possível verificar que as sementes submetidas à desinfestação com solução de NaOCl a 2% acrescido de Tween 80 (0,05%) por 20 min. (tratamento T2) apresentaram a maior porcentagem de germinação (90,6%) e o maior valor de IVG (0,70), o qual mostrou-se estatisticamente diferente dos demais (Tabela 2). Por outro lado, o tratamento E2 (Etanol, 1 min + NaOCl a 1%, 20 min) mostrou-se o menos eficiente para germinação *in vitro* de *P. aculeata*, considerando os baixos valores obtidos na porcentagem e na velocidade de germinação (Tabela 2).

Figura 9 - Germinação *in vitro* de sementes *P. aculeata* submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação ao longo de 10 semanas de cultivo em meio MS0.



Legenda: E1- Etanol (1 min) + NaOCl 1% (10 min); E2- Etanol (1 min) + NaOCl 1% (20 min); T1- NaOCl 2% + Tween 80 (0,05%, 10 min); T2- NaOCl 2% + Tween 80 (0,05%, 20 min).

Tabela 2 - Valores da porcentagem de germinação, do índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *P. aculeata* submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação.

Tratamento	Porcentagem de germinação	IVG	Tamanho das plântulas (cm)		
			Raiz	Hipocótilo	Epicótilo
E1	85,0 ± 5,00 a	0,54 ± 0,01 b	9,57 ± 0,43 a	3,75 ± 0,29 a	0,69 ± 0,06 a
E2	53,3 ± 2,88 c	0,36 ± 0,01 d	9,00 ± 0,43 a	3,62 ± 0,38 a	0,60 ± 0,04 a
T1	70,0 ± 5,00 b	0,45 ± 0,05 c	9,70 ± 0,35 a	3,57 ± 0,44 a	0,68 ± 0,04 a
T2	90,6 ± 2,88 a	0,70 ± 0,03 a	10,25 ± 0,64 a	3,85 ± 0,37 a	0,80 ± 0,09 a

Legenda: Os dados representam a média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Entretanto, embora o protocolo de desinfestação das sementes tenha influenciado nos parâmetros citados anteriormente, não mostrou influência no desenvolvimento das plântulas

sob condições *in vitro*. Após cerca de 50 dias de cultura, as plântulas apresentaram um crescimento muito semelhante, não exibindo diferenças significativas em relação ao tamanho da raiz, do hipocótilo e do epicótilo, independentemente do tratamento realizado para assepsia das sementes (Tabela 2). Deste modo, considerando os resultados obtidos em relação à porcentagem de germinação e o IVG, a desinfestação com NaOCl a 2% + Tween 80 a 0,05% por 20 min. (tratamento T2) foi selecionado como o melhor protocolo para a assepsia de sementes de *P. aculeata* obtidas a partir do Sítio Flora Bioativas (Porto Belo-SC).

Plântulas com 50 dias foram consideradas adequadas como fonte de explantes para os experimentos de propagação *in vitro*. Neste período, as plântulas apresentavam raiz principal com $10,25 \pm 0,64$ cm, hipocótilo de $3,85 \pm 0,37$ cm, epicótilo com $0,80 \pm 0,09$ cm, um par de folhas cotiledonares expandidas e 1 a 2 pares de folhas (Figura 10).

Figura 10 - Germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de *P. aculeata* em meio básico MS sem fitorreguladores, ao longo de sete semanas de cultivo.



Legenda: Barra=1 cm.

3.3.2 Micropropagação

3.3.2.1 Indução de gemas e proliferação de brotos

A partir da segunda semana após o início das culturas foi possível observar a multiplicação de gemas a partir dos explantes nodais inoculados nos diferentes meios de

cultura, enquanto os explantes hipocotiledonares e foliares permaneciam verdes e mostravam-se intumescidos.

Ao longo do primeiro mês de cultura, os explantes de hipocótilo e folha não apresentaram resposta morfogênética, independentemente do meio de cultura básico e do fitorregulador testados. Contudo, a fim de induzir à organogênese, estes explantes foram subcultivados para novo meio de cultura de mesma composição. Após 60 dias de cultivo, os explantes mostravam-se levemente oxidados e permaneciam sem expressar qualquer tipo de resposta morfogênética. Neste período, os experimentos de indução de gemas a partir de segmentos de hipocótilo e de folha foram encerrados.

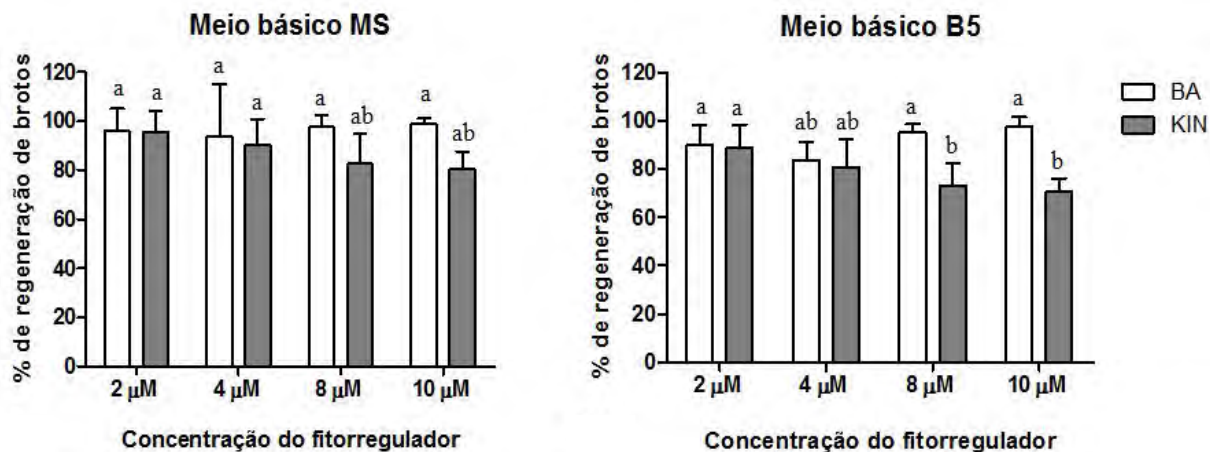
A proliferação de brotos a partir dos explantes nodais foi observada nos diferentes meios de cultura suplementados com os fitorreguladores BA e KIN, usados isoladamente, independentemente da composição do meio básico e da concentração do regulador de crescimento. Após 30 dias de cultura, verificou-se que a indução de gemas e a proliferação de brotos de *P. aculeata* ocorreram apenas em explantes nodais a partir da multiplicação de gemas axilares.

Os explantes nodais apresentaram alta porcentagem de regeneração de brotos quando mantidos em meios básicos MS ou B5, mas principalmente, quando cultivados em presença do fitorregulador BA. As culturas mantidas em meios suplementados com BA exibiram altas taxas de regeneração, sobretudo nas concentrações mais altas, enquanto nos meios contendo KIN, o aumento da concentração deste fitorregulador propiciou uma redução na porcentagem de regeneração de brotos (Figura 11).

Ao final de 120 dias, as culturas mantidas em meio básico MS ou B5 suplementado com 10 μM de BA alcançaram os maiores valores para a taxa de regeneração de brotos (98,75% e 97,33 %, respectivamente), porém sem diferença estatística dos demais tratamentos (Figura 11).

Ao longo do período de cultivo *in vitro*, foi possível observar que a composição de sais e de vitaminas do meio de cultura exerceu influência na produção de brotos de *P. aculeata*. Além disso, verificou-se que independentemente do meio básico, o aumento da concentração do fitorregulador (BA ou KIN) favoreceu a multiplicação de gemas axilares e a formação de brotos, especialmente em presença do regulador de crescimento BA (Figura 12).

Figura 11 - Porcentagem de regeneração de brotos de *P. aculeata* a partir de explantes nodais cultivados em meios básicos MS ou B5 suplementados com diferentes concentrações de BA ou KIN.

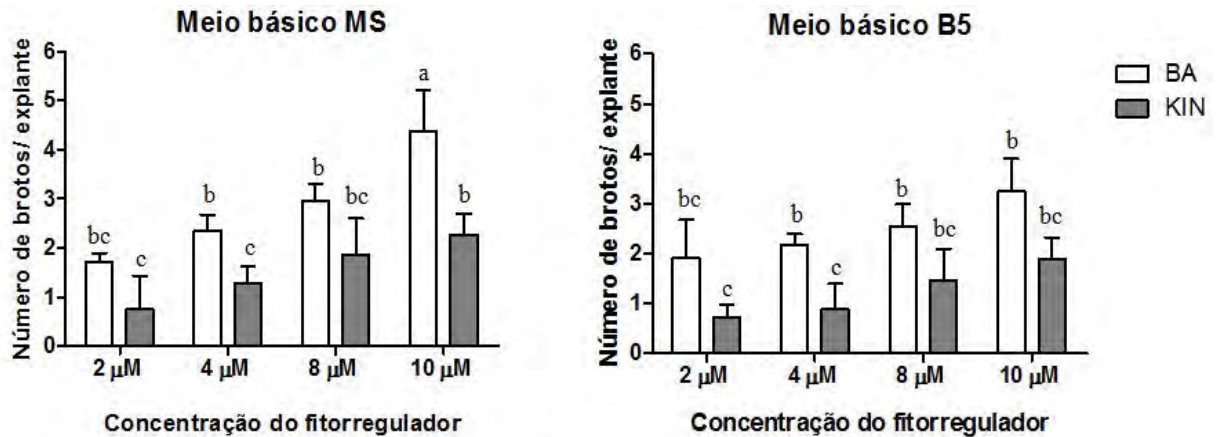


Legenda: Os dados representam a média \pm desvio padrão. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Deste modo, os maiores valores para o número médio de brotos produzidos por explante foram sempre obtidos nas concentrações mais elevadas do fitorregulador. A maior produção de brotos ($4,36 \pm 0,85$) foi alcançada a partir do cultivo de explantes nodais em meio básico MS suplementado com $10 \mu\text{M}$ de BA, após 60 dias de cultura. Nas culturas mantidas em meio MS contendo o fitorregulador KIN, o maior valor produzido foi de $2,27 \pm 0,42$ brotos por explante. Entretanto, apesar de favorecer a multiplicação de brotos, a presença de altas concentrações de citocinina no meio de cultura induziu o desenvolvimento de calos na base dos explantes. As culturas mantidas em meios MS suplementados com 8 ou $10 \mu\text{M}$ de BA ou KIN, exibiam a formação de uma massa calogênica compacta de coloração esverdeada na base dos explantes, a qual crescia ao longo do período de cultura.

Os explantes nodais cultivados em meio básico B5 apresentaram um comportamento similar às culturas mantidas em meios MS. Nas culturas mantidas em meio B5, as melhores respostas também foram observadas nos meios contendo BA, porém com valores inferiores de produção de brotos em relação ao meio MS (Figura 12). Independente da concentração de citocinina adicionada ao meio verificou-se que as culturas mantidas em meio básico B5 não apresentaram formação calogênica na base dos explantes.

Figura 12 - Número de brotos produzidos por explante nodal de *P. aculeata* cultivado em meios MS ou B5 suplementado com diferentes concentrações de BA ou KIN.



Legenda: Os dados representam a média \pm desvio padrão. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

A fim de identificar qual dos fatores analisados exerceu maior influência na propagação *in vitro* de *P. aculeata*, foi realizado o teste de variância ANOVA *two way*, no qual as diferentes variáveis foram avaliadas de forma independente. Na análise do efeito do tipo de meio básico (MS ou B5) e do tipo de fitorregulador (BA ou KIN), foi possível verificar que o tipo de regulador de crescimento constituiu a principal fonte de variação nos resultados obtidos para a taxa de regeneração de brotos e para o número de brotos produzidos por explante, com valores de 27,4 % e 62,23 %, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de variação da taxa de regeneração e do número de brotos de *P. aculeata* produzidos por explante em relação ao tipo de meio básico e tipo de fitorregulador adicionado ao meio de cultura.

Fonte de variação	Porcentagem de variação (%)	
	Taxa de regeneração	Número de brotos/explante
Interação	0,85	0,35
Meio básico (MS / B5)	10,57	3,62
Tipo de fitorregulador (BA / KIN)	27,4	62,23

Considerando que o tipo de fitorregulador utilizado exerceu maior efeito do que o tipo de meio básico, realizou-se uma nova análise de variância entre o tipo e a concentração do fitorregulador em relação aos meios básicos de cultura, visando identificar qual dos fatores é a

principal fonte de variação na micropropagação de *P. aculeata*. A partir desta análise, verificou-se que o tipo de fitorregulador exerceu maior influência na taxa de regeneração de brotos, tanto nas culturas em meios MS (13,87 %) quanto em meios B5 (31,07 %). Entretanto, em relação ao número de brotos produzidos por explante, a concentração do fitorregulador foi o componente principal de variação para os meios MS (44,20 %), enquanto para os meios B5 o tipo de fitorregulador continua sendo a principal fonte de variação (31,07 %) (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem de variação da taxa de regeneração e do número de brotos de *P. aculeata* produzidos por explante em relação ao tipo e à concentração do fitorregulador adicionado aos diferentes meios de cultura.

Fonte de variação	Porcentagem de variação (%)			
	Taxa de regeneração		Número de brotos/explante	
	MS	B5	MS	B5
Interação	9,19	22,73	3,90	22,73
Tipo de fitorregulador (BA / KIN)	13,87	31,07	31,48	31,07
Concentração (2, 4, 8, 10 μ M)	3,77	4,93	44,20	4,93

O tamanho dos brotos proliferados a partir da multiplicação de gemas axilares parece não ter sido influenciado pela composição do meio básico ou pelo fitorregulador adicionado ao meio de cultura. Ao final de 120 dias de cultivo, pode-se observar que os todos os brotos proliferados apresentaram um pequeno desenvolvimento, independentemente do meio de cultura ao qual estavam submetidos (Tabela 5). Os maiores valores para tamanho dos brotos ($1,15 \pm 0,09$ cm) foram obtidos aos 60 dias nas culturas mantidas em meio MS suplementado com 10 μ M de KIN, porém sem diferença estatística das culturas mantidas em meio MS contendo 8 μ M de KIN ou 10 μ M de BA (Tabela 5).

Tabela 5 - Comprimento dos brotos micropropagados de *P. aculeata* obtidos a partir da multiplicação de gemas axilares, após 60 dias de cultura.

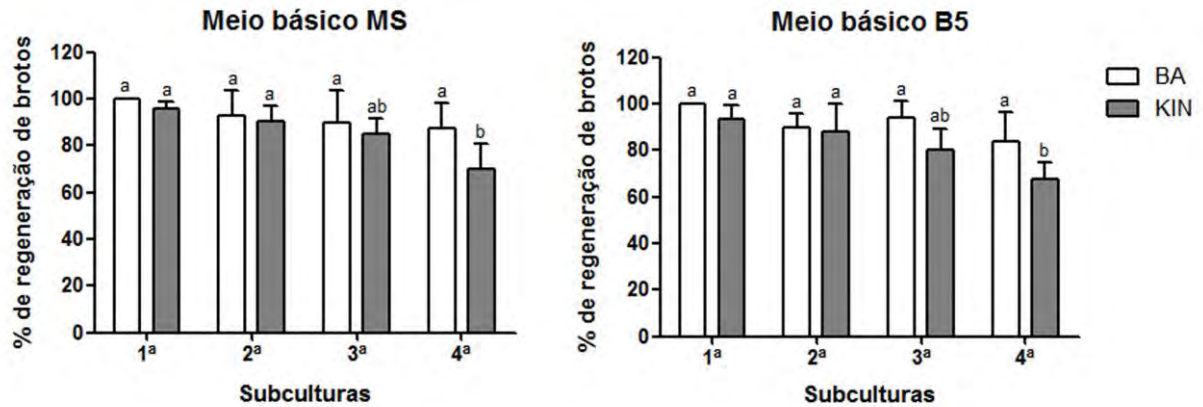
Meio básico	Fitorregulador	Concentração (μM)	Comprimento dos brotos (cm)
MS	BA	2	0,50 ± 0,13 bc
		4	0,59 ± 0,08 b
		8	0,78 ± 0,09 b
		10	0,96 ± 0,10 a
	KIN	2	0,55 ± 0,08 bc
		4	0,63 ± 0,05 b
		8	0,85 ± 0,07 a
		10	1,15 ± 0,09 a
B5	BA	2	0,45 ± 0,12 b
		4	0,53 ± 0,15 b
		8	0,58 ± 0,14 b
		10	0,65 ± 0,09 b
	KIN	2	0,47 ± 0,13 bc
		4	0,48 ± 0,21 bc
		8	0,65 ± 0,08 b
		10	0,58 ± 0,02 b

Legenda: Os dados representam a média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Ao longo do período de cultivo, foi possível observar que os brotos proliferados em meio básico MS mostravam-se mais vigorosos e de coloração verde intensa, características fenotípicas semelhantes àquelas encontradas na planta-mãe. Entretanto, nas culturas mantidas em meio básico B5, os brotos apresentavam-se menores e com folhas de coloração verde clara, exibindo uma alteração em relação ao seu fenótipo normal (dados não mostrados).

O subcultivo dos brotos para novo meio de mesma composição a cada 30 dias, durante 120 dias, não favoreceu a regeneração e a produção de brotos de *P. aculeata*. Estes resultados indicam a realização do subcultivo dos brotos até a segunda ou a terceira semana de cultivo, período em que se verificou um aumento dos valores dos parâmetros avaliados. As maiores taxas de regeneração de brotos (100%) foram obtidas no primeiro subcultivo nas culturas mantidas em meios de cultura suplementados com BA, independente da composição do meio básico (Figura 13).

Figura 13 - Taxa de regeneração de brotos de *P. aculeata* cultivados em meios básicos MS e B5 suplementados com BA ou KIN ao longo das quatro subculturas.

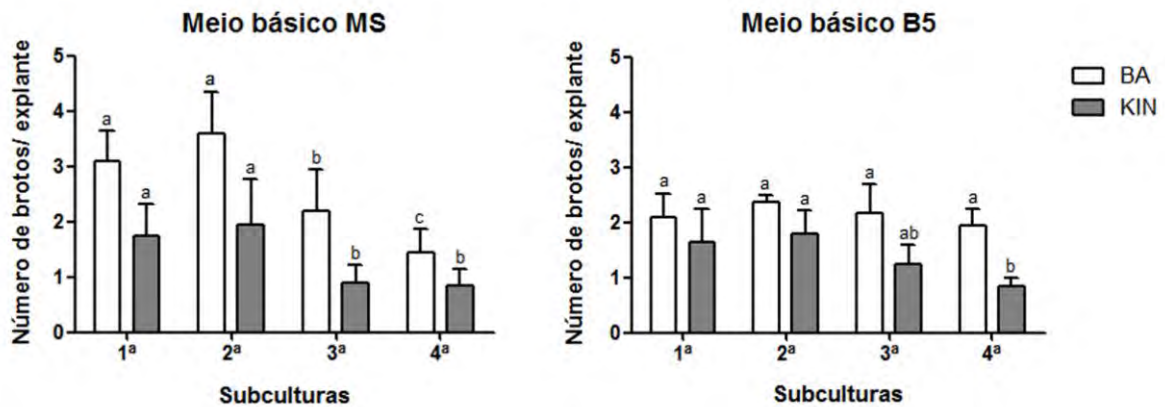


Na proliferação de brotos por explante, foi possível verificar que os maiores valores foram alcançados na segunda subcultura (60 dias), independentemente da composição do meio básico e do fitorregulador adicionado ao meio de cultura. A partir do terceiro subcultivo, observou-se uma redução na produção de brotos, especialmente nas culturas mantidas em meio básico MS, sobretudo suplementadas com a citocinina KIN.

A presença do fitorregulador BA favoreceu a multiplicação de gemas, resultando nos maiores valores de proliferação de brotos, independentemente do meio básico e do período de cultivo. Contudo, observou-se que as culturas mantidas em meio básico MS apresentaram uma grande variação na produção de brotos ao longo das subculturas, enquanto que a produção de brotos mais homogênea em meio básico B5 suplementados com a mesma citocinina, durante todo o período de cultura (Figura 14).

Uma análise geral das culturas suplementadas com BA e KIN, indica que a maior produção de brotos por explante nodal ($3,6 \pm 0,75$) foi obtida a partir da multiplicação de gemas axilares nas culturas mantidas em meio básico MS suplementado com BA, por ocasião da segunda subcultura (Figura 14). Nas culturas mantidas em meio básico B5, os maiores valores na produção de brotos ($2,37 \pm 0,12$) também foram alcançados após 60 dias de cultivo em meios contendo BA, porém este resultado não difere estatisticamente daqueles obtidos nas demais subculturas (Figura 14).

Figura 14 - Número de brotos produzidos a partir da multiplicação de gemas axilares em meios básicos MS e B5 suplementados com diferentes concentrações de BA e KIN ao longo das quatro subculturas.



Considerando os resultados obtidos em relação aos parâmetros avaliados (taxa de regeneração, número de brotos produzidos por explante e tamanho dos brotos) e aos aspectos morfológicos observados nos brotos proliferados *in vitro*, o meio básico MS suplementado com 10 μM de BA foi selecionado para a proliferação de brotos de *P. aculeata* a partir de explantes nodais. Deste modo, a fim de otimizar a multiplicação de brotos na espécie, novos experimentos foram realizados adicionando-se a auxina ANA ao meio de cultura selecionado anteriormente, em diferentes concentrações (0,1; 0,2 e 0,3 μM). Duas semanas após o início das culturas, observou-se que a presença deste regulador de crescimento não favoreceu a multiplicação de brotos de *P. aculeata*, independente da concentração testada. Após 30 dias de cultivo, a associação entre os fitoreguladores ANA e BA reduziu a taxa de regeneração e suprimiu a proliferação de brotos a partir dos explantes nodais. Além disso, foi possível observar a presença de massas calogênicas compactas na base dos explantes, as quais se mostravam maiores na maior concentração de ANA testada. Por esta razão, devido ao aspecto apresentado pelas culturas, as avaliações deste experimento foram encerradas após 30 dias de cultivo.

3.3.2.2 Alongamento, Enraizamento e Aclimatização das plantas

Os brotos proliferados em meio MS contendo 10 μM de BA foram selecionados para os experimentos de alongamento e enraizamento *in vitro* e posterior aclimatização das plantas.

Após uma semana da transferência dos brotos micropropagados para o meio de cultura MS0, foi possível observar o desenvolvimento de raízes adventícias, por organogênese direta, a partir da base do eixo caulinar.

Inicialmente, as raízes formadas apresentaram coloração branca, a qual se tornou bege ao longo do período de cultura. O alongamento e o enraizamento *in vitro* foram verificados em 100% dos brotos cultivados durante 30 dias em meio MS0. Neste período, as plantas enraizadas *in vitro* exibiam eixo caulinar com $3,75 \pm 0,12$ cm de comprimento e produção de três a cinco raízes adventícias por broto, as quais apresentavam $4,81 \pm 0,33$ cm de comprimento (Figura 15 B).

Figura 15 - Micropropagação de *Pereskia aculeata*.



Legenda: A- Multiplicação de gemas axilares a partir de explantes nodais cultivados em meio MS + $10 \mu\text{M}$ de BA; B- Enraizamento *in vitro* em meio MS0; C- Plantas aclimatizadas em substrato de terra vegetal, após 3 meses em ambiente natural; D- Manutenção das culturas *in vitro* em meio MS0 solidificado com 10 g.L^{-1} de ágar. Barras=1 cm.

As plantas enraizadas *in vitro* apresentaram uma plena adaptação à condição autotrófica, uma vez que 100% das plantas transferidas para vasos contendo terra vegetal e mantidas em sala ambiente foram aclimatizadas com sucesso. Ao final de três meses de

cultivo, as plantas apresentavam eixo caulinar de $11,75 \pm 1,05$ cm de comprimento e mostravam-se fenotipicamente idênticas à planta matriz (Figura 15 C).

3.3.3 Avaliação da abscisão foliar

Os brotos enraizados em meio MS0 foram subcultivados visando à formação de um estoque de plantas saudáveis, homogêneas e em condições fitossanitárias ideais. Entretanto, após a segunda subcultura, os brotos começaram a exibir senescência foliar, principalmente nos órgãos mais antigos, resultando em abscisão foliar. Este fato continuou sendo observado nas subculturas subsequentes, tornando-se a abscisão foliar cada vez mais intensa ao longo do tempo. Considerando-se que este fato poderia estar relacionado à grande disponibilidade de água para a planta cultivada *in vitro*, avaliou-se o efeito do aumento da concentração do agente solidificante no meio de cultura sobre a senescência e queda foliar de plantas micropropagadas de *P. aculeata* mantidas em meio MS0.

Após 60 dias de cultura, foi possível observar uma redução da abscisão foliar nos brotos mantidos em meios MS sem fitorreguladores, solidificados com concentrações mais elevadas de ágar (Tabela 6). Embora tenha sido observada uma pequena queda foliar, os brotos mantidos em meio MS0 contendo 12 g.L^{-1} de ágar apresentaram uma redução no enraizamento *in vitro*, provavelmente devido ao aspecto compacto apresentado pelo meio de cultura, o qual dificulta o desenvolvimento das raízes. Dessa forma, as plantas estoque de *P. aculeata* foram mantidas *in vitro* em meio básico MS sem reguladores de crescimento e solidificado com 10 g.L^{-1} de ágar (Figura 15 D).

Tabela 6 - Efeito da concentração de ágar sobre a abscisão foliar de plantas de *P. aculeata* mantidas *in vitro* em meio MS sem fitorreguladores.

Ágar (g.L^{-1})	Número de folhas caídas
8	$11,91 \pm 2,42$ a
10	$5,95 \pm 1,58$ b
12	$3,42 \pm 1,23$ b

Legenda: Os dados representam a média \pm desvio padrão.
Letras iguais na coluna indicam não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

3.3.4 Quantificação de proteínas totais

A análise da quantidade de proteínas totais presentes nas folhas de *P. aculeata* obtidas de plantas de campo e de plantas aclimatizadas foi realizada a partir de uma análise

colorimétrica utilizando o teste do biureto. A determinação de proteínas nas amostras de *P. aculeata* foi determinada utilizando a equação da reta ($y = 0,00446x + 0,003159$; $R^2 = 0,997$) obtida a partir da curva de calibração do BSA.

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que ambas as amostras apresentaram alto teor proteico, com destaque para as folhas obtidas de plantas cultivadas a campo que apresentaram $15,21 \pm 1,72$ mg.mL⁻¹ de proteínas totais (equivalente à albumina) em 25 mg.mL⁻¹ de amostra, porém sem diferença significativa do extrato foliar obtido de plantas aclimatizadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Quantificação de proteínas totais em folhas de *P. aculeata* obtidas de plantas de campo e plantas aclimatizadas.

Órgão vegetal	Fonte de material botânico	Equivalente a albumina (mg.mL⁻¹ extrato)
Folhas	Plantas de campo	$15,21 \pm 1,72$ a
	Plantas aclimatizadas	$12,59 \pm 1,49$ a

Legenda: Os dados representam a média \pm desvio padrão. Letras iguais na coluna indicam não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Com base nos resultados alcançados neste ensaio, pode-se concluir que o processo de propagação *in vitro* da espécie não influenciou no conteúdo total de proteínas presentes nas folhas. Assim, a micropropagação pode ser empregada como fonte de produção de biomassa foliar rica em proteínas, a qual pode ser explorada comercialmente pela indústria alimentícia.

3.4 Discussão

A germinação consiste na retomada do crescimento e desenvolvimento do embrião, o qual foi interrompido ou retardado durante a maturação e a dispersão das sementes (RAVEN et al., 2001). Segundo Fosket (1994), durante esta etapa é reassumida a transcrição dos genes, reativada a síntese de enzimas para a hidrólise das reservas, acompanhado de um acentuado aumento do metabolismo e das taxas de respiração. A análise do processo germinativo, além de fornecer dados sobre as diferentes fases do desenvolvimento pós-seminal, desempenha um papel fundamental nos estudos biogeográficos, uma vez que a distribuição geográfica e as preferências ecológicas de muitas espécies são determinadas pela faixa de condições

ambientais toleradas pela germinação de suas sementes (CASTRO, 2001).

Neste estudo optou-se pela germinação sob condições *in vitro* a fim de garantir um contínuo fornecimento de plantas matrizes em bom estado fisiológico e fitossanitário para serem utilizadas como fonte de explantes na cultura de tecidos vegetais. Esta metodologia tem sido aplicada para diferentes espécies de cactos e possui muitas vantagens, uma vez que além de eliminar a etapa de desinfestação, a qual pode danificar os tecidos vegetais e comprometer a iniciação das culturas, o material em estado juvenil apresenta um maior potencial às respostas morfogênicas (BALCH; FIGUEROA, 2002; SANTOS-DÍAZ et al., 2003).

A desinfestação das sementes constitui uma etapa fundamental no processo de germinação *in vitro*, uma vez que os agentes desinfestantes precisam garantir a assepsia das sementes, sem prejudicar o desenvolvimento do embrião. Na desinfestação do material botânico podem ser utilizadas diversas substâncias de ação germicida, como o etanol, o hipoclorito de sódio e o de cálcio, além dos detergentes de cozinha ou Tween 80, os quais podem ser aplicados na solução desinfestante, com o objetivo de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o tecido, por reduzir a tensão superficial (TORRES et al., 1998). O detergente deve ser adicionado em teor muito baixo, enquanto a concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição pode variar, de acordo com o tamanho e a natureza do explante (CARVALHO et al., 2006).

No presente trabalho, a ausência de contaminação nas culturas, indica que os tratamentos com etanol e/ou NaOCl garantiram uma desinfestação eficiente para as sementes de *P. aculeata* obtidas do Sítio Flora Bioativas (Porto Belo-SC). Entretanto, a concentração e o tempo de exposição ao NaOCl influenciaram na porcentagem e na velocidade de germinação das sementes, embora não tenham exibido efeito no desenvolvimento das plântulas. Sementes desinfestadas com solução de NaOCl a 2% + Tween 80 a 0,05% por 20 min. (tratamento T2) apresentaram os maiores valores relativos à taxa de germinação e ao índice de velocidade de germinação, superiores estatisticamente aos demais tratamentos. Estes resultados indicam que as sementes de *P. aculeata* não apresentam tegumento impermeável e necessitam de uma leve escarificação química para estimular o desenvolvimento embrionário.

Em ambiente natural, os frutos e sementes de cactáceas constituem uma valiosa fonte de alimento em locais desérticos, onde muitos pássaros e mamíferos atuam como importantes agentes dispersores de sementes. Em *P. aculeata*, os frutos carnosos de coloração alaranjada atraem muitos animais frugívoros, que realizam a dispersão a partir da planta matriz geralmente através da regurgitação ou defecação das sementes (endozoocoria), favorecendo a germinação e o estabelecimento de uma nova planta (ROJAS-ARECHIGA; VAZQUEZ-

YANES, 2000). De fato, em estudos de Pedroni e Sanchez (1997), as sementes de *P. aculeata* coletadas a partir das fezes de macacos apresentaram uma germinação mais eficiente do que as sementes obtidas diretamente de frutos intactos, provavelmente devido à escarificação química promovida pela ação das enzimas ao longo do trato digestório.

A germinação de *P. aculeata* sob condições *in vivo* tem sido obtida com sucesso tanto em substrato papel de filtro como em casca de arroz carbonizada e solo orgânico, sendo alcançadas altas taxas de germinação (cerca de 90% e 98%, respectivamente) (HIGA et al., 2009; ARAÚJO; MOREIRA, 2010). Neste estudo, as sementes de *P. aculeata* submetidas ao tratamento T2 e cultivadas em meio básico MS sem fitorreguladores, apresentaram uma elevada taxa de germinação (90,6%), após 10 semanas de cultivo. Resultados positivos na germinação *in vitro* também foram obtidos por Higa e colaboradores (2009), os quais alcançaram 100% de germinação de sementes de *P. aculeata* cultivadas em meio básico MS com 50% da composição salínica. Entretanto, neste trabalho a desinfestação das sementes com etanol (1 min) e NaOCl (1%, 10 min) resultou em 11% de contaminação fúngica.

De modo geral, a temperatura favorável à germinação das sementes de cactos varia entre 17 e 34°C, com valores ótimos de resposta geralmente em torno de 25°C (NOBEL, 1988). Nos estudos *in vitro* citados anteriormente, a germinação das sementes de *P. aculeata* ocorreu de modo muito satisfatório em uma faixa de temperatura entre 25 e 28°C, sob um fotoperíodo de 16 h. Segundo Pedroni e Sanchez (1997), o desenvolvimento pós-seminal de *P. aculeata* é indiferente à luz e ocorre sob uma ampla faixa de temperatura, embora Dau e Labouriau (1974) tenham estabelecido a temperatura ótima de 33°C para a obtenção de 90% de germinação sob condições *in vivo*.

O desenvolvimento pós-seminal de *P. aculeata* em meio MS0 não foi influenciado pelo tratamento de desinfestação no qual as sementes foram submetidas. Após sete semanas de cultivo, os maiores valores obtidos no tamanho das plântulas foram $10,25 \pm 0,64$ cm de raiz, $3,85 \pm 0,37$ cm de hipocótilo e $0,80 \pm 0,09$ cm de epicótilo, porém sem diferença significativa entre os tratamentos de desinfestação. Nos estudos de Higa e colaboradores (2009), a germinação em meio MS com 50% da composição salínica não estimulou o desenvolvimento radicular das plântulas, as quais apresentavam 3,68 cm de raiz principal e eixo caulinar com 2,61 cm de comprimento, após 28 dias de cultura.

Segundo Nonogaki e colaboradores (2010), a germinação é caracterizada pela capacidade do embrião, inserido no interior da semente, de retomar sua atividade metabólica de forma orientada e sequencial, visando ao desenvolvimento das plântulas. Do ponto de vista fisiológico, o processo germinativo é influenciado tanto pelas condições intrínsecas da

semente, como impermeabilidade do tegumento, dormência e controle hormonal, quanto pelos fatores externos, como disponibilidade de água, luz e temperatura, uma vez que as sementes são sensíveis às variações do ambiente que determinam a época adequada para a germinação (DONOHUE et al., 2010). Mihalte e colaboradores (2011) reportam que as sementes de cactos apresentam diversas características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas que favorecem a germinação em condições áridas, como a presença de complexos proteicos na cutícula da semente, que aumentam a capacidade de absorção de água (BREGMAN; GRAVENA, 1997). Contudo, nos estudos de germinação *in vitro*, as características inerentes às sementes tornam-se mais relevantes, uma vez que as condições físicas e químicas são controladas.

A maturidade fisiológica nem sempre é alcançada sincronicamente em todas as sementes, fazendo com que em muitas espécies, em um único indivíduo e em um mesmo fruto, possam ser encontradas sementes em diferentes estágios de maturação (PREVIERO et al., 1996). Neste trabalho, as sementes submetidas ao tratamento T2, que considerava o uso de NaOCl 2% + Tween 80 (0,05%) por 20 min., apresentaram um maior sincronismo no processo germinativo, o qual ocorreu preferencialmente entre a terceira e a quarta semana de cultivo, resultando em um alto índice de velocidade de germinação (0,77), significativamente superior aos demais tratamentos. A germinação sincrônica do lote de sementes é fundamental para a obtenção de mudas homogêneas, em uma mesma fase de maturação fisiológica, especialmente quando se objetiva o uso das plântulas como fonte de explantes para experimentos de cultura de tecidos.

Na família Cactaceae, a micropropagação consiste em uma valiosa ferramenta para a rápida produção de mudas, especialmente para espécies ameaçadas, de valor econômico ou ornamental, cuja propagação a partir de sementes ou estacas é insuficiente, seja pela limitada produção de sementes ou pelo crescimento lento de muitas espécies (OROZCO-VILLAFUERTE et al., 2005). Neste trabalho, a capacidade de proliferação *in vitro* de *P. aculeata* foi avaliada a partir de segmentos de hipocótilo, epicótilo e folha, obtidos de plântulas com 50 dias desenvolvidas em meio MS0. Os diferentes explantes foram inoculados em meios básicos MS ou B5 suplementados com as citocininas BA ou KIN, em diferentes concentrações, e mantidos sob condições controladas de luz, temperatura e fotoperíodo. A obtenção de explantes assépticos a partir de plântulas desenvolvidas *in vitro* tem sido empregada em diversos protocolos de micropropagação de cactos, dada as vantagens da desinfestação de sementes sobre os demais órgãos vegetais (QUIALA et al., 2009; GARCÍA-RUBIO; MALDA-BARRERA, 2010).

Altas taxas de regeneração de brotos foram obtidas a partir de explantes nodais, independente do meio básico, do fitorregulador e da sua concentração no meio de cultura. Em todos os ensaios realizados não foi possível induzir a formação de brotos adventícios diretamente a partir de explantes foliares e hipocotiledonares (organogênese direta), nem a partir da formação de calos (organogênese indireta). Portanto, a proliferação *in vitro* de *P. aculeata* ocorreu apenas a partir da multiplicação de gemas axilares. De modo geral, os maiores valores de regeneração de brotos foram obtidos nas culturas mantidas em meio básico MS suplementados com BA, especialmente nas maiores concentrações de BA, porém sem diferença estatística entre os diferentes meios de cultura.

O tipo de explante exerce forte influência nas respostas morfogênicas obtidas na cultura *in vitro*. Em geral, são preferidos explantes jovens, obtidos de sementes ou órgãos juvenis, que tenham sido retirados a partir de plantas saudáveis e em crescimento ativo (TEIXEIRA, 2005). Ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados para iniciar a micropropagação, uma vez que a presença de gemas pré-existentes reduz as chances de variação somaclonal, garantindo o estabelecimento de culturas com alta fidelidade genética (FAISAL et al., 2006; WU et al., 2012).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura foi fundamental para a propagação *in vitro* de *P. aculeata* a partir da multiplicação de gemas axilares, uma vez que a produção adicional de brotos não foi observada nas culturas mantidas sem fitorreguladores. A proliferação de brotos ocorreu independentemente do meio básico e em todas as concentrações de BA e KIN testadas. Segundo Fay e Gratton (1992), a adição de citocininas ao meio de cultura é determinante para romper a dormência das aréolas influenciadas pela dominância apical. Nas cactáceas, os meristemas se localizam em estruturas denominadas aréolas, as quais podem originar folhas, flores, espinhos ou novos ramos (OROZCO-VILLAFUERTE et al., 2005). Contudo, na espécie em estudo, cada explante nodal geralmente apresentava apenas uma gema axilar, visto que *P. aculeata* apresenta folhas alternas com espinhos na base, não havendo aréolas dispersas ao longo do eixo caulinar.

Na avaliação da produção de brotos por explante, os maiores valores foram obtidos em presença do fitorregulador BA, independente na composição de sais e vitaminas do meio básico. Durante todo o período de cultivo, foi possível observar que as culturas mantidas em meios contendo BA apresentaram resultados superiores às aquelas suplementadas com KIN, em todas as concentrações testadas. No presente estudo, a maior produção de brotos por explante ($4,36 \pm 0,45$) foi alcançada em meio básico MS suplementado com $10 \mu\text{M}$ de BA, a partir da multiplicação de gemas axilares, após 60 dias de cultura.

Muitas espécies da família Cactaceae têm sido propagadas *in vitro* a partir do cultivo de explantes em meio MS suplementado com a citocinina BA. Em *Hylocereus costaricensis*, o maior número de brotos ($5 \pm 0,8$) foi produzido nas culturas mantidas por 80 dias em meio MS com $30 \mu\text{M}$ BA (VIÑAS et al., 2012), enquanto em *Opuntia ficus-indica*, o cultivo de segmentos de cladódios contendo uma aréola em meio MS contendo 5 mg.L^{-1} de BA induziu a formação de 15 brotos por explante, após 6 semanas de cultivo (EL FINTI et al., 2012). Martinez-Vázquez e Rublo (1989), utilizando explantes nodais obtidos da parte basal, média e apical de plântulas *in vitro* de *Mammillaria sp.*, obtiveram melhores resultados nos explantes excisados da porção mediana da plântula, provavelmente devido ao balanço hormonal mais favorável, uma vez que os demais explantes produziram calos. Deste modo, uma vez que as respostas das plantas para a cultura *in vitro* são altamente dependentes do genótipo, não há um protocolo geral disponível para as cactáceas (MACHAKOVA et al. 2008).

A partir da análise de duas variáveis independentes (ANOVA *two way*), como o tipo de meio básico (MS/B5) e o tipo de fitorregulador (BA/KIN), foi possível observar que o tipo de citocinina adicionada ao meio constituiu a principal fonte de variação para a taxa de regeneração (27,4 %) e o número de brotos produzidos por explante (62,73 %). A escolha do tipo de meio básico adequado é essencial para o sucesso da micropropagação, uma vez que a composição de sais e vitaminas do meio de cultura altera a disponibilidade de elementos essenciais ao metabolismo vegetal. Neste estudo, embora os maiores valores tenham sido alcançados nas culturas mantidas em meio básico MS, não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos em meio MS em comparação ao meio B5.

Contudo, apesar de não ter influenciado na proliferação de brotos, a composição de sais e vitaminas do meio básico promoveu significativas diferenças no crescimento dos brotos produzidos. Em geral, os brotos proliferados em meio básico MS apresentaram um maior comprimento do eixo caulinar, principalmente nas culturas mantidas em meio contendo KIN, enquanto os brotos produzidos em meio B5 exibiam folhas pequenas e de coloração verde clara. O maior crescimento dos brotos foi obtido nas culturas mantidas em meio MS suplementado com $10 \mu\text{M}$ de KIN, onde os brotos alcançaram $1,15 \pm 0,09 \text{ cm}$, durante o período de cultura, sem apresentar diferenças significativas ao longo dos subcultivos.

Diversos meios de cultura têm sido utilizados com sucesso em muitos protocolos de cultura de tecidos, onde o meio básico desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) é o mais empregado nos ensaios de propagação *in vitro* na família Cactaceae. Na análise da composição dos meios MS e B5, verifica-se que o meio MS apresenta concentrações mais elevadas da maioria dos elementos minerais e das vitaminas em relação ao meio básico B5.

Os microelementos boro e zinco, por exemplo, em menores taxas no meio B5, estão relacionados ao metabolismo das auxinas, sendo o zinco, estreitamente envolvido na síntese do aminoácido triptofano, precursor do AIA (ácido indolacético) (CALDAS et al., 1998). Neste caso, é possível sugerir que o pequeno desenvolvimento dos brotos em meio B5 pode estar relacionado à síntese de auxinas, hormônios vegetais que estimulam o alongamento, a divisão e a diferenciação celular.

A hipótese de que o meio básico B5 poderia propiciar respostas positivas na micropropagação de *P. aculeata*, deve-se ao fato das cactáceas serem caracterizadas como espécies resistentes e que se desenvolvem em solos pobres em nutrientes. Entretanto, considerando o elevado potencial nutricional da espécie, recentes estudos de Mazia e Sartor (2012), sugerem o aumento de macro e micronutrientes precursores de aminoácidos presentes no solo para a produção de biomassa foliar com altos teores proteicos. No presente trabalho, considerando a proliferação obtida, aliada aos aspectos morfológicos dos brotos micropropagados, a composição de sais e vitaminas do meio básico MS foi selecionada como a mais adequada à propagação *in vitro* de *P. aculeata*.

Analisando a capacidade proliferativa da espécie ao longo de todo período de cultivo *in vitro*, é possível inferir que a prorrogação do tempo de cultura não favoreceu a multiplicação de brotos da espécie, uma vez que a maior produção de brotos foi obtida ao final da segunda subcultura, comparando aos resultados obtidos na quarta subcultura, independentemente do meio utilizado. Segundo Vujović e colaboradores (2012), o efeito das subculturas sobre a multiplicação de brotos varia de acordo com a espécie, o tipo e a concentração de fitorregulador e o período de cultivo. Na maioria das vezes, brotos subcultivados durante longos períodos em meio contendo a mesma suplementação hormonal, tendem a reduzir o potencial de proliferação *in vitro* (VARDJA; VARJDA, 2001; HAMAD; TAHA, 2008). Na proliferação de brotos de *Sterculia urens*, verificou-se uma rápida redução do número de brotos a partir da segunda subcultura (HUSSAIN et al., 2007), enquanto em *Rubus pubescens*, a multiplicação de brotos foi reduzida a partir da terceira subcultura, mantendo-se constante nas demais (DEBNATH, 2004).

A adição de ANA ao meio MS suplementado com 10 μM BA não propiciou resultados positivos em nenhuma das concentrações testadas, suprimindo a proliferação de brotos e induzindo a formação de calos na base dos explantes, especialmente na maior concentração desse fitorregulador (0,3 μM). Segundo Aliyu e Mustapha (2007), em espécies de cactáceas, a multiplicação de gemas axilares requer pouca ou nenhuma concentração de auxina, porém altos níveis de citocininas, conforme reportado nas culturas de *Nopalea cochenillifera*

(BRASIL et al., 2005), *Opuntia ficus-indica* (KHALAFALLA et al., 2007) e de espécies de *Mammillaria* (RAMIREZ-MALAGON et al., 2007).

Neste estudo, a formação de massas calogênicas na base dos explantes também foi observada nas culturas suplementadas apenas com as citocininas BA ou KIN, independentemente da concentração. Respostas similares também foram observadas nas culturas de outras cactáceas como *Hylocereus costaricensis* (VINÃS et al., 2012), *Stenocereus gummosus* e *Ferocactus peninsulae* (SHISHKOVA et al., 2007). De acordo com Clayton e colaboradores (1990), considerando que os cactos cultivados *in vitro* apresentam a capacidade de sintetizar auxina, geralmente a adição de auxina exógena estimula a produção de calos na base dos explantes. Entretanto, tais respostas podem promover alterações somaclonais nas plantas, as quais não são vantajosas à micropropagação de *P. aculeata*.

A transferência dos brotos propagados em meio MS contendo 10 μ M de BA para meio sem fitorreguladores propiciou o alongamento dos brotos e a formação de raízes adventícias, por organogênese direta, a partir da base dos explantes. Ao final de 30 dias de cultivo em meio MS0, a regeneração de raízes *in vitro* foi verificada em 100% dos brotos micropropagados, os quais apresentaram eixo caulinar com $3,75 \pm 0,12$ cm de comprimento com produção de cerca de 3 a 5 raízes adventícias finas e de coloração branca a bege. O enraizamento *in vitro* na ausência de reguladores de crescimento tem sido reportado para diferentes espécies de cactos como *Coryphantha elephantidens* (WAKHLU; BAHU, 2000), *Turbincarpus spp.* (D'AVILA-FIGUEROA et al., 2005), *Notocactus magnificus* (DE MEDEIROS et al., 2006) e *Pilosocereus robinii* (QUIALA et al., 2009). Entretanto, em algumas espécies, a rizogênese somente foi observada após a adição de auxinas ao meio básico (GARCÍA-SAUCEDO et al., 2005; EL FINTI et al., 2013), ou ocorreu espontaneamente no meio de propagação de brotos, após a redução da taxa de citocinina nas culturas (VINÃS et al., 2012).

O sucesso da aclimatização de plantas propagadas *in vitro* está diretamente relacionado ao sistema radicular formado, ao vigor apresentado pelo vegetal e às condições de cultivo (EL FINTI et al., 2013). Plantas enraizadas em meio MS0 foram transplantadas para vasos de plásticos contendo como substrato terra vegetal adubada, os quais foram mantidos em sala ambiente, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sob iluminação natural. Após três meses de cultivo, as plantas de *P. aculeata* apresentaram uma boa adaptação à condição autotrófica com taxa de 100% de sobrevivência das plantas. Nesta ocasião, as plantas apresentavam eixo caulinar de $11,75 \pm 1,05$ cm e mostravam-se vigorosas e fenotipicamente normais. Segundo De Kerk (2002),

plantas enraizadas sob condições *in vitro* geralmente são mais desenvolvidas e suas raízes apresentam uma melhor absorção de água no início do processo de aclimatização, favorecendo a adaptação às condições ambientais. Altas taxas de aclimatização de brotos enraizados *in vitro* também foram observadas em muitos estudos de micropropagação de cactáceas (QUIALA et al., 2009; EL FINTE et al., 2012 e 2013).

Parte dos brotos enraizados em MS0 foram subcultivados em meio fresco de mesma composição, visando à manutenção de um estoque de plantas *in vitro* para futuros experimentos de cultura de tecidos. Nesta etapa, o eixo caulinar foi seccionado em 2,0 cm a partir da sua base, as raízes formadas foram retiradas e os brotos reinoculados em meio MS0 a cada 30 dias. A formação de um estoque de plantas cultivadas *in vitro* garante um fornecimento contínuo de explantes saudáveis e assépticos para diversos ensaios biotecnológicos, além de evitar a coleta excessiva de material botânico no campo. Entretanto, após o segundo subcultivo, observou-se uma intensa senescência e queda foliar, que permaneceu durante a terceira subcultura.

Na busca de soluções para reduzir a queda foliar das plantas mantidas *in vitro* em meio MS0, foi possível constatar a partir de observação direta que as plantas de *P. aculeata* mantidas *in vivo* apresentam intensa queda foliar quando hidratadas em excesso. Nesta ocasião, as folhas tornavam-se amareladas, flácidas até se tornarem completamente oxidadas próximo ao momento da abscisão foliar. Deste modo, foi realizado um experimento onde diferentes concentrações de ágar foram adicionadas ao meio de cultura, a fim de reduzir a disponibilidade de água para as plantas e assim diminuir a queda foliar de *P. aculeata*.

A escolha do agente solidificante e sua concentração no meio de cultura também são fatores fundamentais para uma eficiente propagação *in vitro*, uma vez que este irá atuar como suporte para os explantes, modulando o contato do material botânico com os nutrientes do meio (KAÇAR et al., 2010). Diferentes agentes solidificantes como a agarose, o gelrite e o phytigel têm sido empregados com sucesso na cultura de tecidos vegetais. Contudo, o ágar, polissacarídeo extraído principalmente de algas do gênero *Gelidium*, constitui o agente solidificante mais amplamente empregado na micropropagação (GEORGE, 2008). Neste estudo, após 60 dias de cultivo em meios MS0 solidificados com maiores concentrações de ágar, observou-se uma redução na queda foliar dos brotos cultivados *in vitro*. A adição de 10 g.L⁻¹ de ágar no meio de cultura favoreceu a formação de brotos mais vigorosos, reduziu a queda foliar, porém não prejudicou o enraizamento *in vitro*.

A concentração da substância gelificante irá influenciar no potencial hídrico do meio de cultura, que no caso dos meios semissólidos, será determinado pelo potencial mátrico do

gel. Neste caso, quanto maior o potencial hídrico do meio em relação à planta, maior será o fluxo de água para o interior das células vegetais (GEORGE, 2008). Segundo Berrios e colaboradores (1999), o meio de cultura deve ser firme o suficiente para suportar os explantes, mas se a rigidez for muito alta, pode dificultar um contato adequado entre os brotos e o meio de cultura. Enquanto baixas taxas de ágar facilitam a difusão dos componentes do meio de cultura para brotos, resultando em um melhor crescimento vegetal (CASANOVA et al., 2008), o aumento da concentração de ágar reduz a disponibilidade de água e inibe o crescimento dos brotos (SELBY et al., 1989).

Em *P. aculeata*, o estabelecimento de plantas estoque sob condições *in vitro* em boas condições fisiológicas foi alcançado a partir cultivo em meio básico MS sem fitorreguladores, solidificado com 10 g.L⁻¹ de ágar. A manutenção das culturas é realizada a cada 30 dias, a partir do subcultivo das plantas para meio fresco de igual composição. Plantas de *P. aculeata* micropropagadas a partir de gemas axilares estão sendo mantidas nestas condições há três anos, sem apresentar variações fenotípicas.

Proteínas constituem as biomoléculas mais abundantes de todas as células e representam a expressão da informação genética do organismo. Estas moléculas desempenham funções estruturais e apresentam diferentes propriedades biológicas, atuando como enzimas, hormônios, anticorpos, receptores e transportadores de membrana, dentre outros (LEHNINGER et al., 2005). Neste sentido, a determinação do conteúdo proteico nos fluidos biológicos e nos alimentos tem sido alvo de diversas pesquisas na área clínica, favorecendo o diagnóstico de doenças (HÜTTENHAIN et al., 2012; MERTINS et al., 2014), e de tecnologia de alimentos, contribuindo para a geração de produtos de maior relevância nutricional (HERRERO et al., 2012; MOJICA; MEJÍA, 2015).

Diversos métodos espectrofotométricos têm sido empregados na quantificação de proteínas totais presentes em uma amostra, tais como o teste do biureto (GORNALL et al., 1949), de Lowry (LOWRY et al., 1951), do “Coomassie brilliant blue” BG-250 ou reagente de Bradford (BRADFORD, 1976), do BCA ou reagente de Smith (SMITH et al., 1985) e o de absorção de proteínas no ultravioleta (STOSCHECK, 1990). Segundo Zaia e colaboradores (1998), todos estes ensaios apresentam vantagens e desvantagens em relação à sensibilidade e à quantidade de substâncias interferentes. Deste modo, a seleção do método mais adequado irá depender da amostra que será analisada.

O elevado valor nutritivo de *P. aculeata* tem sido descrito na literatura por diversos autores, ratificando um dos seus nomes populares, “carne de pobre” (MARTINEWISK et al., 2013), bem como a importância deste vegetal não-convencional na culinária regional

(PEREIRA et al., 2007; BRASIL, 2010; ALMEIDA; CORRÊA, 2012). Neste sentido, estudos anteriores apontaram para a presença de 19,6 a 25,5% (p/p) de proteínas totais nas folhas de *P. aculeata*, valores superiores aos observados na couve (1,6%), alface (1,3%), milho comum (7,6 - 10,0%) e em feijões (18 - 20%) (MERCÊ et al., 2001; GIRÃO et al., 2003; TAKEITI et al., 2009). Adicionalmente, tais pesquisas mostraram que as folhas da espécie também são ricas em aminoácidos essenciais, apresentando cerca 20,46% de triptofano (TAKEITI et al., 2009) e cerca de 2 a 23 vezes a quantidade de lisina (5,4%) encontrada nos vegetais supracitados (MERCÊ et al., 2001).

Deste modo, considerando que a cultura *in vitro* pode influenciar nas rotas metabólicas alterando de modo qualitativo e quantitativo a produção de biomoléculas (SREELAKSHMI et al., 2007; MADHAVI et al., 2012), avaliou-se o conteúdo total de proteínas nas folhas obtidas a partir de plantas de campo e aclimatizadas. Para tal, foi empregado o método do biureto (GORNALL et al., 1949), que embora não seja muito sensível, consiste em um teste simples, rápido, de baixo custo, o qual tem sido aplicado para a quantificação de proteínas totais em extratos vegetais de diferentes espécies (ALI et al., 2010; AGBAIRE; EMOYAN, 2012; AKANNI et al., 2015; SAJID; AFTAB, 2014).

Neste ensaio, verificou-se que a quantidade de proteínas totais presentes no extrato foliar de plantas aclimatizadas ($12,59 \pm 1,49 \text{ mg.mL}^{-1}$ equivalente à albumina) não diferiu significativamente do conteúdo proteico verificado nas plantas de campo ($15,21 \pm 1,72 \text{ mg.mL}^{-1}$ equivalente à albumina), utilizadas como matrizes deste estudo. Estes resultados foram similares aos verificados por Ghaffari e colaboradores (2013), onde a concentração de proteínas na cactácea *Opuntia ficus-indica* não apresentou diferença estatística entre as plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*. Do mesmo modo, em *Carpobrotus edulis* (Aizoaceae), o mesmo padrão eletroforético de proteínas foi observado nas plantas de campo e nas aclimatizadas, o que aponta para a ausência de variação genética durante a propagação *in vitro* (KHATTAB; EL SHERIF, 2011). Contudo, em recente revisão sobre metaboloma vegetal, Parida e Misra (2015) indicam que a ocorrência de poliploidia, seja de origem natural ou artificial, induzida pelo cultivo *in vitro*, promove o aumento do metabolismo primário e secundário, estimulando a produção de diversas biomoléculas.

3.5 Conclusões

Do que foi analisado nesta parte do trabalho, em relação à germinação, propagação e dosagem de proteínas de *P. aculeata* é possível concluir que:

- O tratamento com solução de NaOCl a 2% durante 20 min mostrou-se o mais adequado à desinfestação de sementes;
- A germinação sob condições *in vitro* foi alcançada com sucesso em meio MS0;
- O uso de segmentos nodais de plântulas desenvolvidas *in vitro* em meio MS0 com 50 dias mostrou-se adequado ao processo de propagação *in vitro*;
- Tanto o meio básico MS quanto B5 propiciaram a multiplicação de gemas axilares em presença dos fitorreguladores BA ou KIN, sendo os melhores resultados para proliferação de brotos alcançados em meio MS contendo 10 μ M de BA, após 60 dias de cultivo;
- A inoculação dos brotos propagados *in vitro* em meio sem fitorreguladores viabilizou a formação de raízes, após 30 dias de cultivo;
- O protocolo de micropropagação proposto permitiu a formação de plantas fenotipicamente normais, aclimatizadas com sucesso em substrato de terra vegetal;
- O conteúdo total de proteínas presente nas folhas não variou estatisticamente entre as plantas de campo e às aclimatizadas, confirmando o êxito no processo de propagação *in vitro* desta importante espécie.

4 PRODUÇÃO DE BETALAÍNAS A PARTIR DA CULTURA DE CALOS E DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *Pereskia aculeata* MILL. (CACTACEAE)

4.1 Introdução

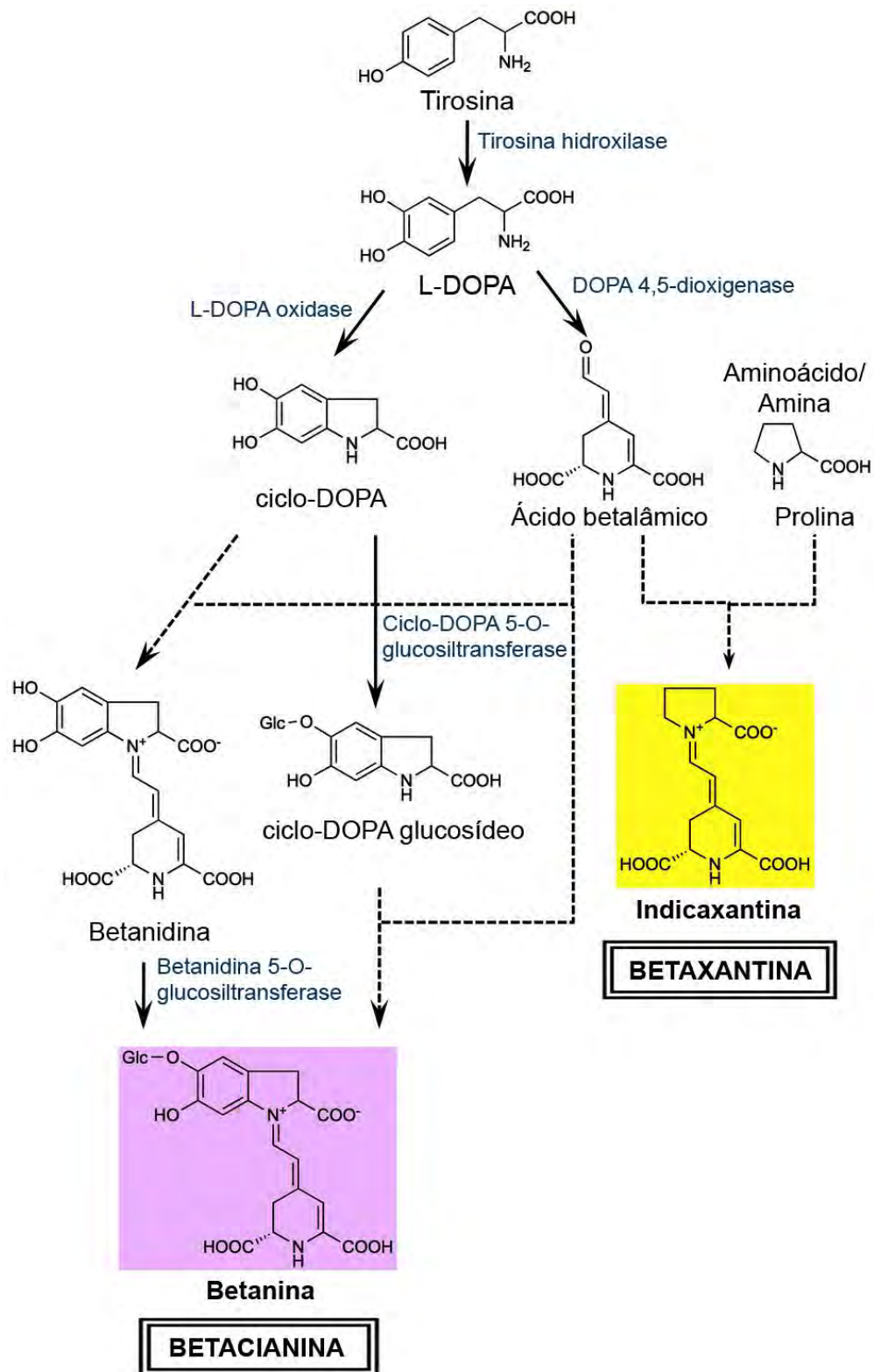
A utilização de pigmentos naturais de origem vegetal para o tingimento de roupas, uso em pinturas e corantes alimentares data de aproximadamente 1.500 anos a.C, porém somente após a Revolução Industrial seu uso tornou-se difundido (MEGGOS, 1995). Entretanto, com os avanços na síntese química, muitos corantes sintéticos passaram a ser utilizados nos alimentos, os quais foram apontados posteriormente como responsáveis por diversos problemas na saúde humana (KUMAR; SINHA, 2004).

Os corantes naturais apresentam algumas desvantagens em relação aos sintéticos, como maior custo de produção e menor estabilidade (AZEREDO, 2009). Entretanto, nos últimos anos, a maior preocupação com a saúde mudou a preferência do consumidor, levando à proibição de um grande número de corantes sintéticos e favorecendo a criação de normas mais rigorosas para a produção de alimentos naturais e orgânicos (GEORGIEV et al., 2008). Atualmente, torna-se cada vez maior a demanda pelo uso de pigmentos vegetais como corantes naturais na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (PAVOKOVIC; KRSNIK-RASOL, 2011). Segundo Fletcher (2006), o mercado mundial de corantes movimenta cerca de US\$ 1 bilhão por ano, no qual 25% correspondem aos corantes naturais, que vem crescendo sua participação ao longo dos anos.

As betalaínas constituem uma classe de pigmentos vacuolares que conferem cores a uma ampla variedade de raízes, flores e frutos (STRACK et al., 2003; KLUGER et al., 2007). São restritas a treze famílias de angiospermas da ordem Caryophyllales e apresentam exclusividade mútua com as antocianinas, sendo, portanto, de grande importância taxonômica (CLEMENT; MABRY, 1996). Além disso, as betalaínas também podem ser encontradas em fungos Basidiomicetos como as espécies do gênero *Amanita* e *Hygrocybe* (ZRÝD; CHRISTINET, 2004).

Betalaínas são substâncias nitrogenadas, solúveis em água, que absorvem radiação visível na faixa de 476 - 600 nm, compreendendo as betacianinas, de coloração vermelho-violeta, e as betaxantinas, de cor amarelo-laranja (AZEREDO, 2009). A síntese de betalaínas ocorre a partir do aminoácido tirosina pela condensação do ácido betalâmico com derivados de dihidroxifenilalanina (DOPA), resultando na formação de betacianinas, ou pela condensação do ácido betalâmico com aminoácidos ou derivados, propiciando a formação de betaxantinas (NAKATSUKA et al., 2013) (Figura 16).

Figura 16 - Biossíntese de betalaínas.



Fonte: Modificado de Nakatsuka e colaboradores, 2013.

Diversas propriedades medicinais têm sido reportadas para as betalaínas, como atividade anti-inflamatória (ALLEGRA et al., 2005; CAMPOS et al., 2006), hepatoprotetora (GALATI et al., 2005), quimioprotetora do câncer (KAPADIA et al. 1997, 2003), bem como a

capacidade para reduzir o stress oxidativo (TESORIERE et al., 2004a) e proteger as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) de oxidação (TESORIERE et al., 2004b). Estudos realizados em mamíferos mostraram que as betalaínas não apresentam efeito hepatocarcinogênico (SCHWARTZ; VON ELBE, 1983) nem mutagênico (VON ELBE; SCHWARTZ, 1981). Adicionalmente, Sreekanth e colaboradores (2007) relataram que a betanina induz apoptose em células humanas com leucemia crônica mieloide.

Atualmente, estes pigmentos são obtidos na forma de pós e/ou concentrados produzidos a partir da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* - Chenopodiaceae), com protocolos bem estabelecidos para a sua produção e extração (SAJILATA; SINGHAL, 2006; CHETHANA et al., 2007; STINTZING; CARLE, 2008). As diversas tentativas para a síntese química de betalaínas não têm sido satisfatórias, uma vez que as inúmeras etapas de síntese do ácido betalâmico acarretam no baixo rendimento do produto final (GANDÍA-HERRERO et al., 2006). Assim, a cultura *in vitro* apresenta-se como uma fonte alternativa e promissora para a produção de metabólitos de interesse comercial, permitindo uma alta produtividade de forma contínua, sem interferir nas populações naturais (MEYER et al., 2002).

Técnicas biotecnológicas consistem em valiosas ferramentas para o estudo de células, tecidos, órgãos ou plantas inteiras a partir da manipulação do meio nutritivo e das condições físicas da cultura. Além disso, permitem a produção de metabólitos secundários de interesse de forma homogênea, com alto rendimento e sob condições controladas (RAO; RAVISHANKAR, 2002; VANISREE et al., 2004). Segundo Amaral e Silva (2003), a manipulação das culturas *in vitro* pode interferir nas diferentes rotas metabólicas influenciando quantitativa e qualitativamente na produção de metabólitos especiais, tornando possível a síntese de moléculas não encontradas normalmente na planta de campo.

Dentre as técnicas de cultivo vegetal *in vitro*, a cultura de calos destaca-se na produção de metabólitos. Consiste na indução e proliferação de massas celulares desorganizadas a partir do cultivo de explantes em meio nutritivo adequado, em um processo denominado calogênese (TORRES et al., 2000). Neste sistema, o genótipo da planta-matriz, o tipo e o tamanho do explante cultivado e a composição do meio de cultura empregado irão direcionar as diferentes respostas morfogênicas observadas *in vitro* (TERMIGNONI, 2005). Segundo George (2008), embora constituam tecidos não organizados, a massa calogênica não é indiferenciada, apresentando células com diferentes graus de diferenciação, tanto em nível morfológico, quanto fisiológico.

O processo de calogênese pode induzir a formação de calos compactos, os quais se apresentam muito lignificados com alta coesão celular. Estes geralmente apresentam

pigmentação verde e são caracterizados como calos organogênicos, ou seja, capazes de regenerar brotos e raízes. Por outro lado, a produção de calos friáveis é mais indicada para a produção de metabólitos especiais, uma vez que a pouca coesão entre as células facilita o cultivo em meio líquido, favorecendo a proliferação celular e a produção de substâncias bioativas (SADO, 2009).

A produção de metabólitos especiais *in vitro* geralmente é otimizada quando linhagens celulares de calos friáveis são cultivadas em meio líquido e mantidas sob agitação contínua (GEORGE, 2008). As culturas de células em suspensão (CCS) se caracterizam como um sistema mais homogêneo, onde as células encontram-se dispersas no meio de cultura, propiciando maior produção de biomassa e de metabólitos quando comparadas às culturas de calos (BOONSNONGCHEEP et al., 2010; SIMÕES-GURGEL et al., 2011). Adicionalmente, uma das principais vantagens do cultivo de células em suspensão, consiste na facilidade de isolamento e purificação do metabólito de interesse, principalmente se este for secretado no meio de cultura (CAI et al., 2012).

Culturas de células em suspensão podem ser mantidas em um sistema de cultivo fechado ou contínuo. No sistema fechado, conhecido como “batch cultures”, a proliferação celular é acompanhada até atingir o seu limite máximo, devido ao esgotamento dos nutrientes do meio de cultura ou ao acúmulo de metabólitos. Nas culturas contínuas, o meio nutritivo é constantemente resposto, garantindo a manutenção do crescimento das culturas (CHATTOPADHYAY et al., 2002).

A produção de betalainas *in vitro* a partir de diferentes técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido alcançada em diversas espécies da família Chenopodiaceae, Cactaceae e Amaranthaceae (MOBHAMMER et al., 2005; CASTELLAR et al., 2006; MORENO et al., 2008). No trabalho de Georgiev e colaboradores (2008), os autores apresentam alguns exemplos dos diferentes sistemas *in vitro* empregados para a produção de betalainas a partir de diferentes espécies, cultivares e linhagens celulares (Tabela 8).

Considerando a necessidade da descoberta de novas substâncias bioativas, aliada ao crescente interesse da população pelo uso de produtos naturais torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos que visem identificar e otimizar a produção de novas substâncias de origem vegetal. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo o estabelecimento de um eficiente protocolo de cultura de calos e de células em suspensão de *P. aculeata*, visando à alta produção de biomassa fonte de betalainas naturais sob condições *in vitro*.

Tabela 8 - Produção de betalainas a partir de diferentes sistemas biotecnológicos.

Species	In vitro culture	Pigment	Content	References
<i>B. vulgaris</i> var. Boltardy	Hairy root	Betacyanins	0.7 mg g ⁻¹ FW	Hamill et al. (1986)
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	Hairy root	Betaxanthins	1.3 mg g ⁻¹ FW	Taya et al. (1992)
		Betanin	6.1 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	Hairy root	Vulgaxanthin-I	9.3 mg g ⁻¹ DW	Weathers and Zobel (1992)
		Betalains	2.9 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> var. lutea	Hairy root	Portulaxanthin-II	–	Hempel and Böhm (1997)
<i>B. vulgaris</i> var. Mahyco Red	Hairy root	Vulgaxanthin-I	–	Mukundan et al. (1998)
		Betalains	7.34 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	Hairy root	Betacyanins	18.5 mg g ⁻¹ DW	Shin et al. (2002)
<i>B. vulgaris</i> var. Ruby Queen	Hairy root	Betalains	11.4 mg g ⁻¹ FW	Thimmaraju et al. (2003)
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	Hairy root	Betacyanins	10 mg g ⁻¹ DW	Pavlov et al. (2003)
		Betaxanthins	14.7 mg g ⁻¹ DW	
		Total betalains	24.7 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	Callus cultures			Girod and Zryd (1991)
	Yellow phenotype	Vulgaxanthin-II	1.813 µmol g ⁻¹ DW	
		Miraxanthin-V	1.177 µmol g ⁻¹ DW	
		Total betaxanthins	4.278 µmol g ⁻¹ DW	
	Orange phenotype	Vulgaxanthin-II	5.519 µmol g ⁻¹ DW	
		Miraxanthin-V	3.061 µmol g ⁻¹ DW	
		Total betaxanthins	12.210 µmol g ⁻¹ DW	
	Red phenotype	Betanin	8.688 µmol g ⁻¹ DW	
		Isobetanin	0.721 µmol g ⁻¹ DW	
		Total betacyanins	11.222 µmol g ⁻¹ DW	
	Violet phenotype	Betanin	22.629 µmol g ⁻¹ DW	
		Isobetanin	2.903 µmol g ⁻¹ DW	
		Total betacyanins	28.016 µmol g ⁻¹ DW	
<i>G. marocephala</i> St.-Hil.	Callus culture	Betalains	–	Vieira et al. (1995)
<i>Mammillaria candida</i>	Callus culture	Modified betaxanthins	–	Santos-Díaz et al. (2005)
<i>Portulaca</i> sp. Jewel	Callus culture	Betalains	8.5 ng g ⁻¹ FW	Kishima et al. (1995)
<i>Chenopodium rubrum</i> L.	Cell suspension	Betacyanins (80 % Amaranthin)	55 µmol g ⁻¹ DW	Berlin et al. (1986)
<i>C. album</i> L.	Cell suspension	Betacyanins	–	Rudat and Göring (1995)
<i>B. vulgaris</i>	Cell suspension	Betanin	2.6 µmol g ⁻¹ DW	Bokern et al. (1991)
		Iampranthin-II	5.1 µmol g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	Cell suspension			Leathers et al. (1992)
	Orange phenotype	Vulgaxanthin-I	10 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	Violet phenotype	Betanin	28 mg g ⁻¹ DW	Khlebnikov et al. (1995)
		Betalains	12 ÷ 35 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	Cell suspension	Betalains	4.2 mg g ⁻¹ DW	Rodríguez-Monroy et al. (1994)
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	Cell suspension	Betacyanins	7.9 mg g ⁻¹ DW	Akita et al. (2000)
<i>Portulaca</i> sp. Jewel	Cell suspension	Betacyanins	5.3 mg g ⁻¹ FW	Bhuiyan and Adachi (2003)
<i>Phytolacca americana</i> L.	Cell suspension	Betanidin 5-O-[(5'-O-E-feruloyl)-2'-O-β-D-apiofuranosyl]-β-D-glucopyranoside	–	Schliemann et al. (1996)
<i>P. acinosa</i> Roxb.		Iampranthin-II		
<i>Portulaca grandiflora</i> Hook	Cell suspension	Betaxanthins	–	Böhm et al. (1991)
<i>P. americana</i> L.	Cell suspension	Betacyanins	–	Sakuta et al. (1991)

Fonte: Retirado de Georgiev e colaboradores, 2008.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Cultura de calos de *P. aculeata* Mill.

4.2.1.1 Material botânico

Sementes de *P. aculeata* Mill. obtidas de frutos doados pelo Sítio Flora Bioativas (Porto Belo - SC) foram submetidas à desinfestação com solução de NaOCl (hipoclorito de sódio) a 2 % contendo Tween 80 (0,05%), por 20 min, e em seguida, lavadas três vezes em água destilada estéril. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 8,0 g.L⁻¹ de ágar (Merck), os quais foram mantidos em câmara de crescimento a 26 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 h. As plântulas desenvolvidas *in vitro*, com 50 dias, foram utilizadas com fonte de explantes para os experimentos de calogênese.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) e no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

4.2.1.2 Estabelecimento da cultura de calos

Segmentos de lâmina foliar e folhas cotiledonares (1 cm²) e de hipocótilo (1 cm) obtidos de plântulas desenvolvidas em meio MS sem fitorreguladores, foram seccionados com o auxílio de bisturi, em placas de Petri contendo 20 mL de água destilada estéril.

Os explantes de hipocótilo foram inoculados na posição vertical e os foliares com a face abaxial em contato com o meio. As culturas foram realizadas em frascos de vidro (65 mm x 85 mm) contendo 30 mL de meio básico MS, contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose e suplementados com ANA (ácido α -naftalenoacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) em diferentes concentrações (2, 4, 10 ou 20 μ M). Estes fitorreguladores foram adicionados ao meio isoladamente ou em associação com baixas taxas das citocininas BA (6-benzilaminopurina) ou KIN (cinetina). O pH dos meios foi ajustado em 5,8 e estes solidificados com ágar (8,0 g.L⁻¹, Merck), antes da autoclavagem (121°C, 104 KPa), por 15 min.. Os frascos de cultura, contendo quatro explantes em cada, foram vedados com tampa de polipropileno e mantidos em câmara de crescimento a 26 ± 2°C, na ausência e na presença de luz (45 μ mol m⁻²s⁻¹), sob fotoperíodo de 16 h.

Os calos induzidos a partir dos diferentes explantes foram subcultivados, a cada três semanas, para meio de cultura fresco de igual

composição. Ao final de três subcultivos, os calos foram avaliados quanto à produção de biomassa, coloração e consistência. A biomassa calogênica foi obtida a partir da aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS) dos calos, após secagem em estufa a 45 °C.

4.2.1.3 Manutenção da cultura de calos

A partir dos resultados alcançados, foi realizada a manutenção das culturas que apresentaram maior produção de biomassa, com formação de calos de consistência e pigmentação desejadas. Nas culturas selecionadas, os calos foram transferidos para meio fresco de mesma composição na qual foram proliferados.

Contudo, no segundo subcultivo dos calos mantidos em estoque, estes foram transferidos para meio básico MS contendo a metade da concentração salínica (MS ½), 30 g.L⁻¹ de sacarose e a mesma suplementação do fitorregulador que induziu a calogênese. As culturas foram mantidas nas mesmas condições físicas descritas anteriormente. O subcultivo dos calos ocorreu a cada três semanas, onde a massa calogênica era criteriosamente selecionada e transferida para meio de cultura fresco de igual composição.

4.2.1.4 Identificação inicial dos pigmentos

A identificação inicial do pigmento produzido pelas culturas de calos de *P. aculeata*, foi realizada submetendo pequenas porções de biomassa calogênica pigmentada à atmosfera saturada de vapor de ácido clorídrico (pH ácido) e de hidróxido de amônio (pH básico). Considerando que antocianinas e betalaínas apresentam exclusividade mútua, esta metodologia permite a identificação de betalaínas a partir da manutenção da coloração, independentemente da variação do pH. Neste ensaio, os calos de *Cleome rosea* produtores de antocianinas (SIMÕES et al., 2009) foram usados como controle.

4.2.1.5 Modulação da produção de pigmentos

Com o objetivo de aumentar a produção de pigmentos a partir da biomassa calogênica obtida, os calos mantidos em estoque em meio MS ½ foram transferidos para diferentes meios

básicos, contendo modificações apenas na composição e na concentração de sais minerais, vitaminas e aminoácidos presentes no meio de cultura.

No primeiro experimento, os calos mantidos em estoque foram transferidos para o meio básico proposto por Akita e colaboradores (2002), intitulado meio HB (*High betalain*), estabelecido a partir de modificações do meio básico LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965). Em relação ao meio básico LS, o meio HB apresenta uma redução na concentração de nitrogênio inorgânico (30 mM), alteração na proporção amônio: nitrato (1:14), redução na concentração de zinco e ausência de cobre e cobalto. A composição mineral e orgânica dos meios básicos MS, LS e HB estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição e concentração (mM) dos diferentes nutrientes minerais e orgânicos presentes nos meios básicos de cultura MS, LS e HB.

Nutrientes minerais e orgânicos	Meios de cultura (mM)			
	MS	LS	HB	
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	20,6	20,6	2,0
	KNO ₃	18,8	18,8	18,8
	CaCl ₂ . 2 H ₂ O	3,0	3,0	3,0
	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1,5	1,5	1,5
	KH ₂ PO ₄	1,25	1,25	1,25
Micronutrientes	MnSO ₄ . 4 H ₂ O	0,100	0,100	0,100
	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,030	0,03	0,0003
	H ₃ BO ₃	0,100	0,100	0,100
	KI	0,005	0,005	0,005
	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,001	0,001	0,001
	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0001	0,0001	-
	CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,0001	0,0001	-
FeEDTA	NA ₂ EDTA. 2 H ₂ O	0,100	0,100	0,100
	FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,100	0,100	0,100
Vitaminas e Aminoácidos	Ácido nicotínico	0,004	-	-
	Piridoxina.HCl	0,0024	-	-
	Tiamina.HCl	0,0003	0,0012	0,0012
	Glicina	0,027	-	-
	Mio-inositol	0,55	0,55	0,55

Fonte: Modificado de Caldas e colaboradores, 1998.

Em outro experimento, os calos mantidos em estoque foram transferidos para meio básico MS contendo alterações apenas na concentração de nitrogênio total e na proporção de amônio e nitrato. A produção e a pigmentação dos calos foram avaliadas a partir do cultivo em meio MS contendo a metade da concentração de nitrogênio (30 mM) e uma razão de amônio: nitrato de 1: 4 (Meio C4) e 1: 8 (Meio C8), em comparação ao 1: 2 encontrados no meio MS (Meio C).

Os calos foram subcultivados a cada três semanas para meio de igual composição, sendo avaliados ao final de três subcultivos em reação ao acúmulo de biomassa e o conteúdo de betalaínas.

4.2.2 Culturas de células em suspensão de *P. aculeata* Mill.

Calos friáveis proliferados a partir de explantes hipocotiledonares mantidos em meio MS $\frac{1}{2}$ + 10 μ M de Picloram, assim como os calos produzidos nos meios com maior proporção de nitrato (meios C4 e C8) foram utilizados para iniciar as culturas de células em suspensão (CCS), visando à produção de betalaínas. Para este objetivo, porções de massa calogênica foram transferidas para meio de cultura líquido de igual composição.

Inicialmente, a fim de estabelecer a quantidade de massa calogênica mais adequada para o início das CCS, foram testados inóculos de 1 e 2 g. Sob condições assépticas, os calos foram colocados em placas de Petri e levemente macerados com o auxílio de uma espátula. Em seguida, pequenas porções de massa calogênica foram colocadas em frascos de vidro estéreis, os quais foram vedados e levados à balança de precisão para obtenção do inóculo desejado. Os inóculos foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura líquido com a mesma composição salínica e do fitorregulador presentes no meio de manutenção dos calos. Os frascos Erlenmeyer foram vedados com tampas de papel alumínio e mantidos em câmara de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 h ($45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sob movimentação constante em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), com velocidade de 114 rpm.

Após quatro semanas, a capacidade de crescimento do inóculo foi avaliada a partir da aferição do peso de matéria fresca (PF) e seca (PS) das células cultivadas. Em câmara de fluxo laminar, as culturas de células em suspensão foram filtradas a vácuo com filtro de nylon (45 μm) e acondicionadas em frascos de vidro estéreis para pesagem em balança de precisão. Após aferição do PF, as células foram colocadas em placas de alumínio e secas em estufa (45°C) para aferição do PS. Para verificar a taxa de crescimento, as culturas foram subcultivadas durante três meses. A cada quatro semanas, parte da mesma porção de inóculo

inicial era colocada em frascos contendo meio fresco de igual composição. O inóculo ideal para iniciar as culturas foi considerado como a menor quantidade de massa calogênica necessária para uma alta produção de células em suspensão.

Visando estabelecer o período adequado para o subcultivo das culturas foi realizada a curva de crescimento das células em suspensão. Para tal, o crescimento das CCS foi acompanhado durante 40 dias, onde a cada três dias, três frascos de cultura eram retirados aleatoriamente para avaliação do acúmulo de biomassa, a partir da aferição do PF e PS das células produzidas. Após o estabelecimento da curva de crescimento, o subcultivo das culturas passou a ser realizado na fase exponencial de crescimento, objetivando a manutenção de uma grande produção de biomassa.

Todas as suspensões celulares foram avaliadas durante três subculturas para determinação do acúmulo de biomassa e do conteúdo de betalaínas.

4.2.3 Extração e quantificação de betalaínas

Calos e culturas de células em suspensão mantidos em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 10 μM de Picloram (meio C) e em meio MS modificado na proporção amônio: nitrato (meios C4 e C8) foram submetidos à extração e quantificação de betalaínas. Adicionalmente, o conteúdo de betalaínas nas CCS em meio C também foi avaliado ao longo da curva de crescimento, a fim de estabelecer o período de maior produção de pigmentos. Todo material biotecnológico foi extraído com metanol a 80 % durante 30 min, sob agitação constante, posteriormente filtrados e centrifugados a 4.000 RPM por 10 min. Após este processo, o extrato concentrado de betalaínas foi obtido.

A quantificação de betalaínas totais presente nos extratos foi realizada segundo o protocolo descrito por Von Elbe (2001), no qual o conteúdo de betacianina e betaxantina é avaliado por meio de espectrofotômetro. Neste método, a absorção de luz a 538 nm é utilizada para calcular a concentração de betanina (principal betacianina), enquanto a absorção a 476 nm refere-se ao conteúdo de vulgaxantina-I (principal betaxantina). Deste modo, a concentração de betalaínas totais é obtida a partir da soma da concentração de betacianinas e betaxantinas presentes nos extratos.

O cálculo da absorção de luz pela betanina e vulgaxantina-I foi realizado de acordo com as seguintes equações:

$$x = 1,095 \cdot (a - c)$$

$$z = a - x$$

$$y = b - z - x/3,1$$

Onde:

a = absorção de luz da amostra a 538 nm.

b = absorção de luz da amostra a 476 nm.

c = absorção de luz da amostra a 600 nm.

x = absorção de luz de betanina sem as impurezas.

y = absorção de luz da vulgaxantina-I corrigido pela contribuição da betanina e das impurezas.

z = absorção de luz das impurezas.

Para a determinação das concentrações de betanina e vulgaxantina-I foi aplicado o valor de absorvidade ($A^{1\%}$) de cada pigmento, que representa o coeficiente de extinção em 1% de solução. Segundo Wyler e Dreiding (1957) e Piattelli e Minale (1964), a absorvidade da betanina corresponde a 1120 e da vulgaxantina-I, 750.

A concentração de betalaínas totais a partir da quantificação de betanina e vulgaxantina-I foi estabelecida a partir da Lei de Beer-Bourguier-Lambert, a qual relaciona a absorvância (A) com a concentração (c) da substância absorvente, de acordo com $A = a \cdot b \cdot c$.

Onde:

a = absorvidade

b = comprimento do percurso óptico (1 cm)

c = concentração da substância absorvente (g/L)

4.2.4 Análise estatística

Os resultados referentes à produção de biomassa e à quantificação de betalaínas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.

4.3 Resultados

4.3.1 Cultura de calos de *P. aculeata* Mill.

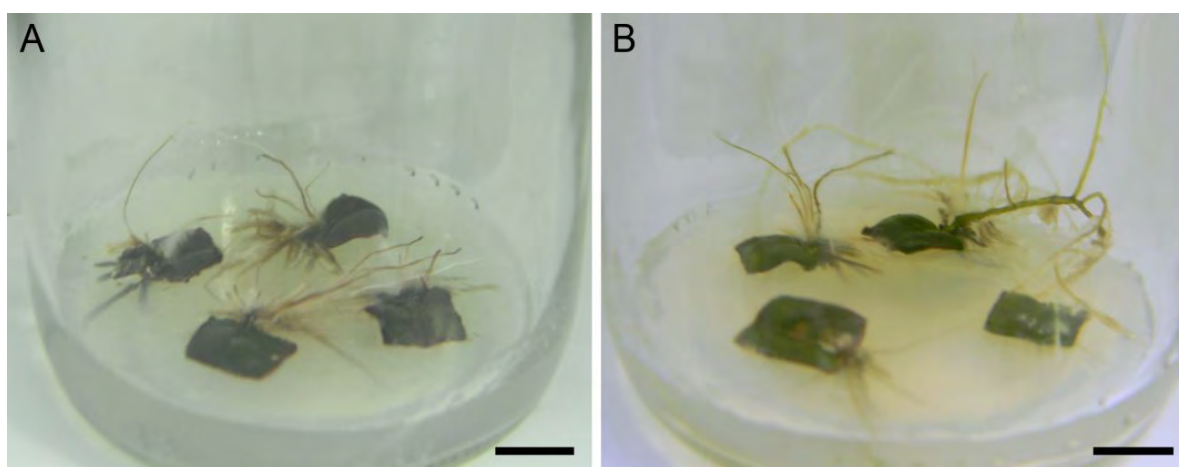
4.3.1.1 Estabelecimento da calogênese

Ao longo das primeiras três semanas de cultivo, os explantes inoculados em meios de cultura contendo os reguladores de crescimento 2,4-D e ANA mostravam-se verdes e sem resposta morfogênica. Entretanto, nas culturas mantidas em meios suplementados com Picloram os explantes hipocotiledonares tornaram-se rosados e intumescidos, enquanto os

explantes de lâmina foliar e folha cotiledonar exibiam coloração verde, porém com as bordas levemente oxidadas. Após o primeiro subcultivo, verificou-se a formação de raízes adventícias a partir de segmentos de folha cotiledonar cultivados em meios suplementados com baixas concentrações de 2,4-D e altas taxas de ANA. Neste período, os explantes foliares mantidos em presença de ANA e 2,4-D não exibiam resposta morfogênica, enquanto aqueles inoculados em meio com Picloram mostravam-se oxidados. Todos os explantes foram subcultivados três vezes, totalizando 63 dias de cultura.

Ao final do período de cultura, foi possível observar que os reguladores de crescimento 2,4-D e ANA não foram adequados à formação calogênica em *P. aculeata*, independente do tipo de explante cultivado. Nas culturas contendo ANA, os explantes de hipocótilo e folha não apresentaram resposta morfogênica, enquanto os segmentos de folha cotiledonar inoculados em 10 e 20 μM de ANA apresentaram a formação de raízes adventícias por organogênese direta a partir da nervura foliar (Figura 17).

Figura 17 - Proliferação de raízes adventícias a partir de explantes de folha cotiledonar de *P. aculeata* cultivados em meio MS suplementado com ANA, após três subcultivos.

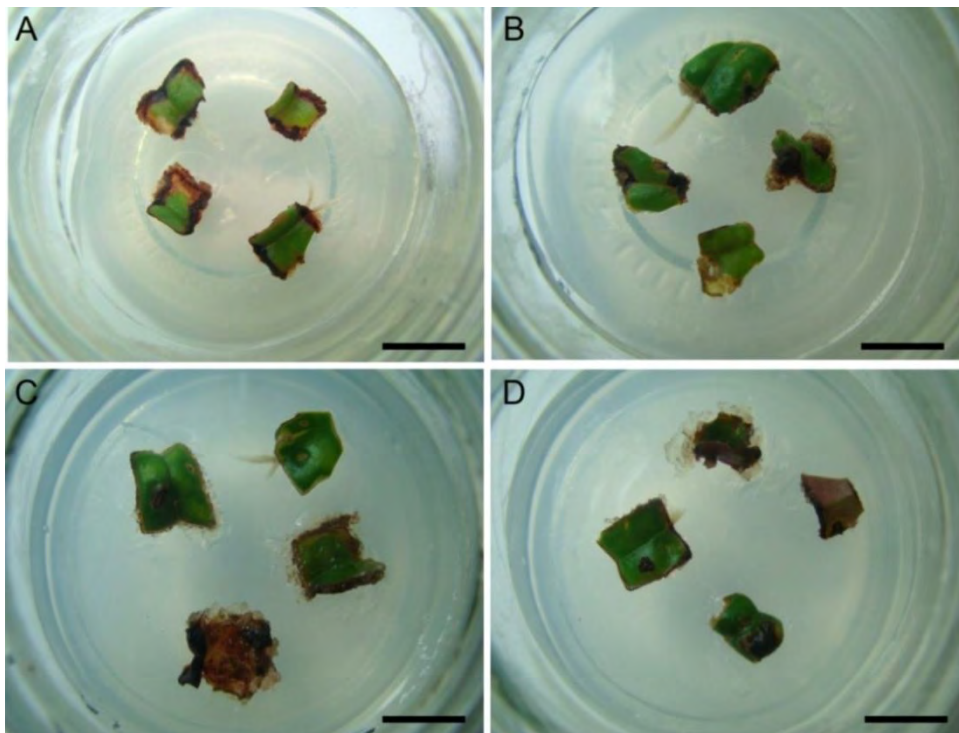


Legenda: A- 10 μM ; B- 20 μM de ANA. Barras=1 cm.

Independentemente da concentração testada, a presença do fitorregulador 2,4-D também não foi capaz de induzir a calogênese nos explantes foliares de *P. aculeata*. Após três subcultivos, a maioria dos explantes mostrava-se verde, sendo verificado o início da formação de raízes adventícias a partir da nervura foliar em todas as concentrações testadas (Figura 18). Nos segmentos de hipocótilo, foi observada uma pequena formação calogênica a partir da base dos explantes, principalmente na concentração de 10 μM de 2,4-D (Figura 19). Os pequenos calos formados apresentaram consistência friável e coloração bege. Porém, devido à baixa produção de biomassa estes não foram avaliados.

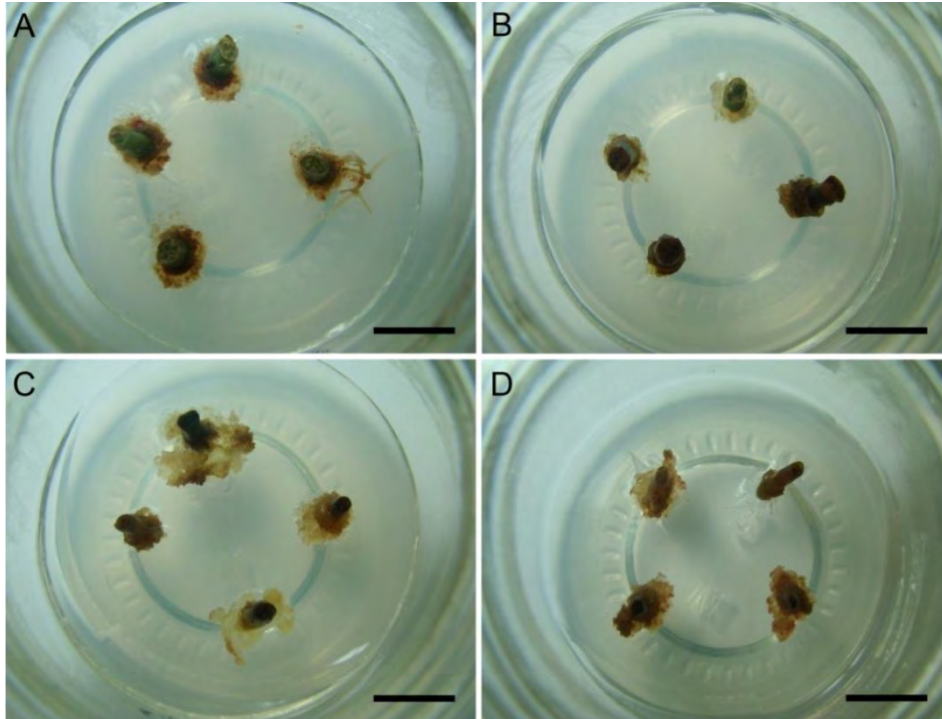
Os explantes de folha cotiledonar mantidos em meios de cultura contendo 2 e 4 μM de 2,4-D apresentaram a formação de raízes adventícias a partir da nervura foliar, especialmente na menor concentração do fitorregulador (Figura 20 A e B). Os segmentos cultivados nas concentrações mais altas de 2,4-D tornaram oxidados e exibiram uma pequena formação calogênica na borda dos explantes (Figura 20 C e D).

Figura 18 - Explantes foliares de *P. aculeata* após 63 dias de cultivo em meio básico MS contendo diferentes concentrações de 2,4-D.



Legenda: A- 2 μM ; B- 4 μM ; C- 10 μM e D- 20 μM . Barras=1 cm.

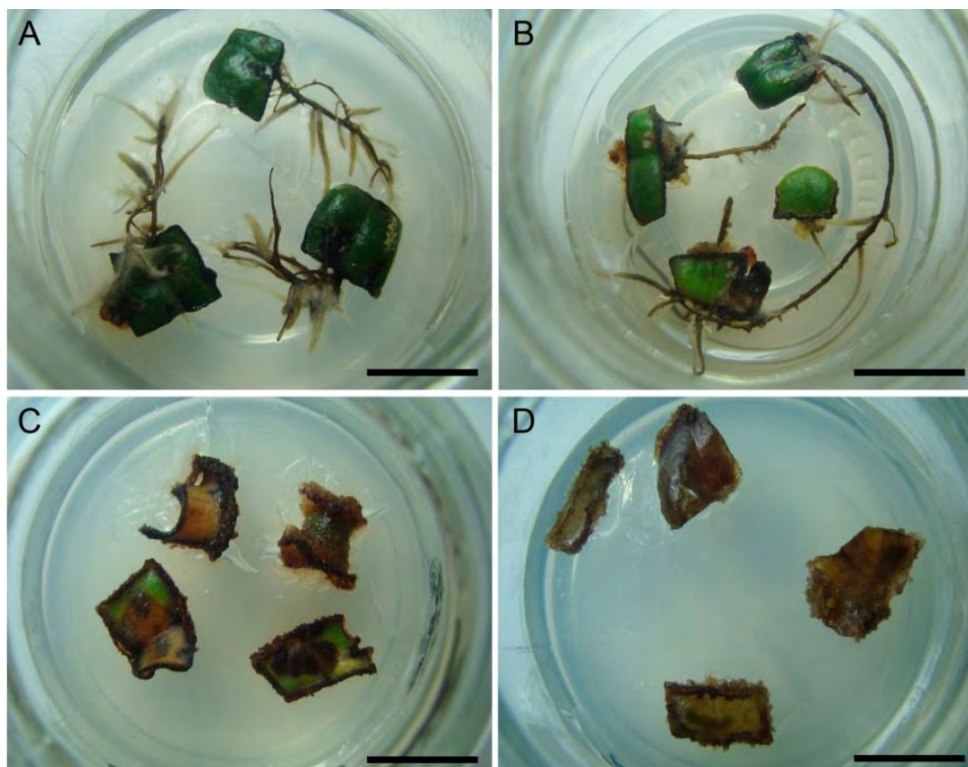
Figura 19 - Pequena formação de calos frágeis a partir da base dos explantes hipocotiledonares de *P. aculeata* cultivados em meios contendo 2,4-D, após três subculturas.



Legenda: A- 2 μ M; B- 4 μ M; C- 10 μ M e D- 20 μ M. Barras=1 cm.

Em relação às raízes adventícias produzidas a partir dos explantes de folha cotiledonar, foi possível observar que as raízes induzidas em meios suplementados com ANA mostravam-se mais claras e finas (Figura 17 A e B), enquanto às raízes proliferadas em meios contendo 2,4-D apresentavam-se mais espessas, com coloração mais escura, além de exibirem a presença de pelos absorventes na concentração de 2 μ M (Figura 20 A e B).

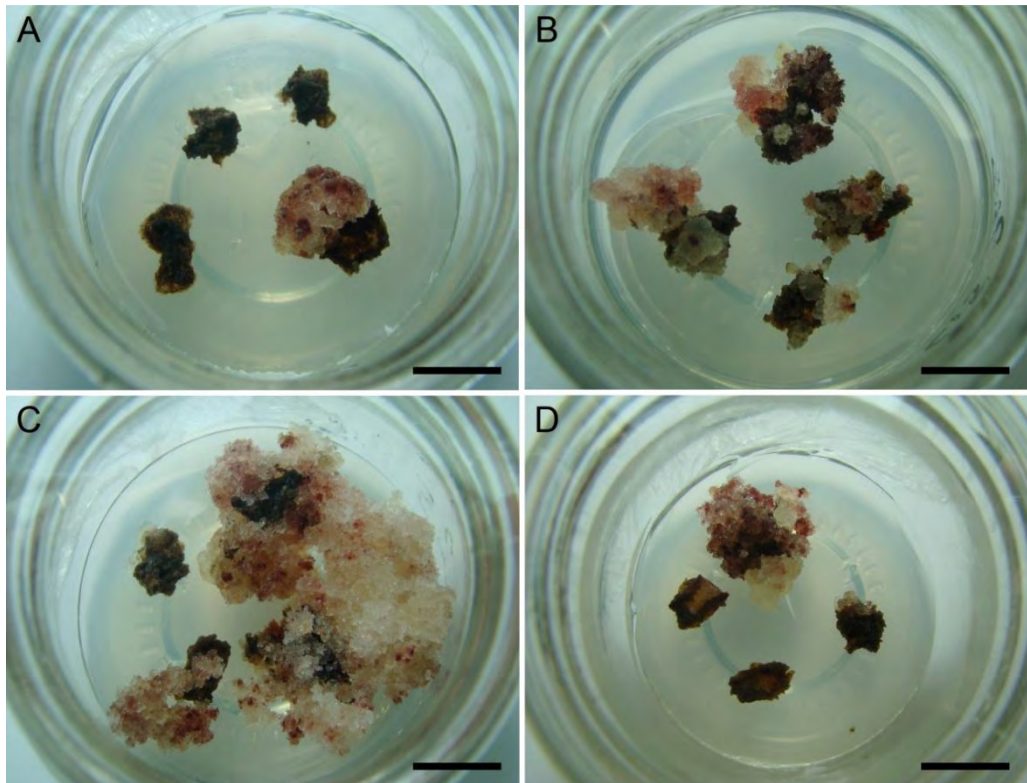
Figura 20 - Respostas morfogênicas apresentadas pelos segmentos de folha cotiledonar de *P. aculeata* cultivados em meios de cultura MS contendo 2,4-D, após três subculturas.



Legenda: A- 2 μM ; B- 4 μM ; C- 10 μM ; D- 20 μM . Barras=1 cm.

A produção calogênica foi verificada em todos os tipos de explantes cultivados em meios MS contendo o fitorregulador Picloram, principalmente nas concentrações mais elevadas. Ao final do terceiro subcultivo, os explantes foliares mostravam muito oxidados, porém com formação de calos friáveis de coloração bege clara e presença de muitas regiões com pigmentação rosada em todas as concentrações de Picloram testadas (Figura 21). Nestas culturas, a maior proliferação calogênica foi verificada nos explantes mantidos em meio contendo 10 μM Picloram, embora não tenha sido aferido o peso de matéria fresca e seca dos calos produzidos, devido à baixa porcentagem de explantes responsivos.

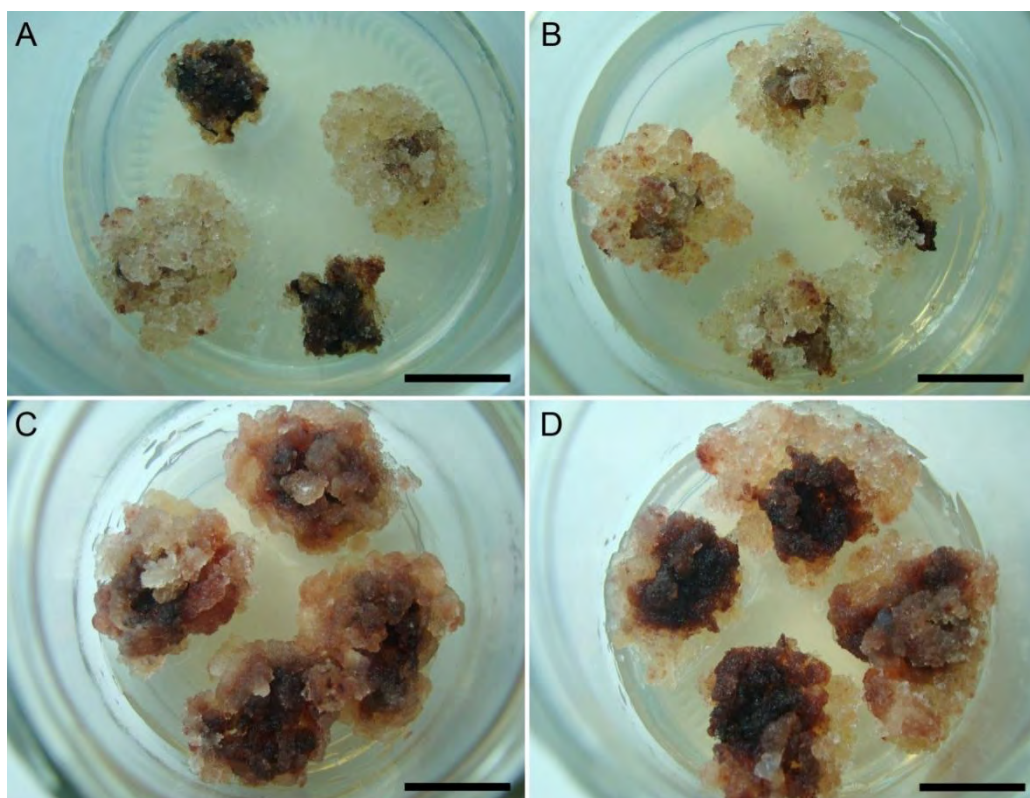
Figura 21 - Formação de calos friáveis pigmentados a partir de explantes foliares de *P. aculeata* cultivados em meios MS suplementados com diferentes concentrações de Picloram, após 63 dias de cultivo.



Legenda: A- 2 μM ; B- 4 μM ; C- 10 μM e D- 20 μM . Barras=1 cm.

Embora oxidados, os segmentos de folha cotiledonar cultivados em meio MS contendo Picloram apresentaram a formação de massas calogênicas friáveis nas diferentes concentrações testadas. As culturas mantidas em meios suplementados com 2 ou 4 μM de Picloram apresentaram cerca de 50% de resposta calogênica, com formação de calos de coloração bege clara com poucas regiões pigmentadas, enquanto nas concentrações mais altas de Picloram (10 e 20 μM), a produção de calos friáveis e pigmentados foi verificada em 100% dos explantes (Figura 22). Entretanto, foi possível observar que a produção calogênica foi baixa, independente da concentração de Picloram adicionada ao meio de cultura. O maior valor de produção de biomassa ($1,15 \pm 0,28$ g) foi alcançado nas culturas mantidas em meio MS contendo 10 μM de Picloram, porém sem diferença estatística para os demais tratamentos (Tabela 10).

Figura 22 - Calogênese em explantes de folha cotiledonar de *P. aculeata* cultivados durante 63 dias em meios MS suplementados com Picloram.



Legenda: A- 2 μM ; B- 4 μM ; C- 10 μM ; D- 20 μM . Barras=1 cm.

Tabela 10 - Produção de biomassa calogênica a partir de explantes de hipocótilo e folha cotiledonar de *P. aculeata* cultivados em meios MS contendo diferentes concentrações do fitorregulador Picloram, após 63 dias de cultura.

Meios de cultura	Picloram (μM)	Produção de biomassa (g)			
		Hipocótilo		Folha cotiledonar	
		PF	PS	PF	PS
M1	2	1,022 \pm 0,17 c	0,093 \pm 0,14 c	0,679 \pm 0,23 a	0,054 \pm 0,14 a
M2	4	2,368 \pm 0,08 b	0,198 \pm 0,12 b	0,753 \pm 0,33 a	0,086 \pm 0,19 a
M3	10	3,922 \pm 0,33 a	0,406 \pm 0,10 a	1,150 \pm 0,28 a	0,109 \pm 0,22 a
M4	20	4,496 \pm 0,56 a	0,431 \pm 0,09 a	0,914 \pm 0,30 a	0,082 \pm 0,11 a

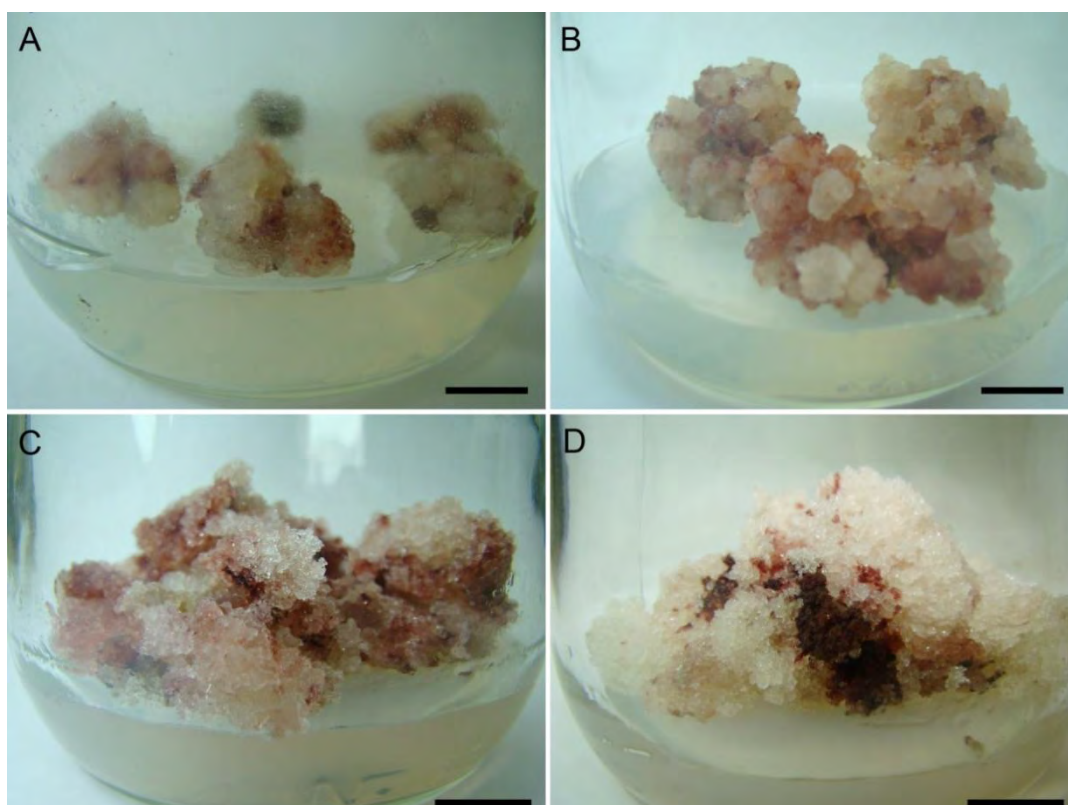
Legenda: Os dados representam a média \pm desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

A calogênese em *P. aculeata* a partir de explantes de lâmina foliar e folha cotiledonar ocorreu de modo incompleto, independente da concentração de Picloram adicionada ao meio de cultura. Foi possível observar que a regeneração de calos friáveis teve início a partir do explante oxidado, porém a proliferação da massa calogênica ocorria a partir dos calos pré-

existentes, fazendo com que o explante permanecesse praticamente intacto. Neste caso, tais explantes não se mostraram adequados à indução da calogênese na espécie.

A completa desdiferenciação dos tecidos apenas foi observada nas culturas iniciadas a partir de explantes hipocotiledonares mantidos em meios suplementados com Picloram. Nestas culturas, observou-se a formação de calos friáveis de coloração bege muito clara contendo regiões com pigmentação rosada, em todas as concentrações testadas. Após três subcultivos, a maior produção de biomassa ($4,496 \pm 0,56$ g) foi obtida nas culturas mantidas em meio MS contendo $20 \mu\text{M}$ de Picloram (meio M4), porém sem diferença significativa para os calos proliferados em meio com $10 \mu\text{M}$ de Picloram (meio M3) ($3,922 \pm 0,33$ g) (Tabela 10). Nesta ocasião, pode-se observar que embora a massa calogênica produzida em ambos os meios apresentasse uma consistência muito friável, os calos proliferados em meio M3 eram muito pigmentados, exibindo coloração rosada, os calos proliferados em meio M4 eram predominantemente não pigmentados, apresentando uma coloração bege clara (Figura 23).

Figura 23 - Produção de calos friáveis pigmentados a partir de explantes hipocotiledonares de *P. aculeata* mantidos em meios MS suplementados com Picloram, após três subculturas.



Legenda: A- $2 \mu\text{M}$; B- $4 \mu\text{M}$; C- $10 \mu\text{M}$; D- $20 \mu\text{M}$ Picloram. Barras=1 cm.

A fim de aumentar a produção de biomassa a partir dos explantes de hipocótilo,

avaliou-se a influência da presença de baixas taxas de citocinina em associação às concentrações de 2, 4, 10 e 20 μM de Picloram. Neste experimento, os reguladores de crescimento BA e KIN foram utilizados em doses dez vezes menores que a concentração de Picloram adicionada nos diferentes meios de cultura.

Ao longo do período de cultivo, verificou-se que a presença de baixas taxas de citocinina em associação com Picloram não superou o acúmulo de biomassa alcançado em meio contendo apenas o fitorregulador Picloram. Contudo, comparando a influência das duas citocininas sobre a produção de biomassa em *P. aculeata*, pode-se observar que a combinação entre Picloram e BA propiciou as melhores respostas calogênicas, especialmente nas concentrações mais baixas dos fitorreguladores (Tabela 11). Após a terceira subcultura, os maiores valores de produção de biomassa ($3,701 \pm 0,55$ g) foram obtidos em meio contendo 10 μM de Picloram + 1 μM de BA (meio M7), porém sem diferença significativa dos resultados alcançados nos meios M5 (2 μM Picloram + 0,2 μM BA) e M6 (4 μM Picloram + 0,4 μM BA). Entretanto, independente da combinação de fitorreguladores testada, a calogênese a partir de explantes de hipocótilo em meios contendo Picloram e BA não ocorreu em toda superfície do explante, com formação de calos friáveis de coloração bege mais escura nos meios M5 e M6, e apresentando coloração mais rosada nas concentrações mais elevadas dos fitorreguladores (meios M7 e M8) (Figura 24).

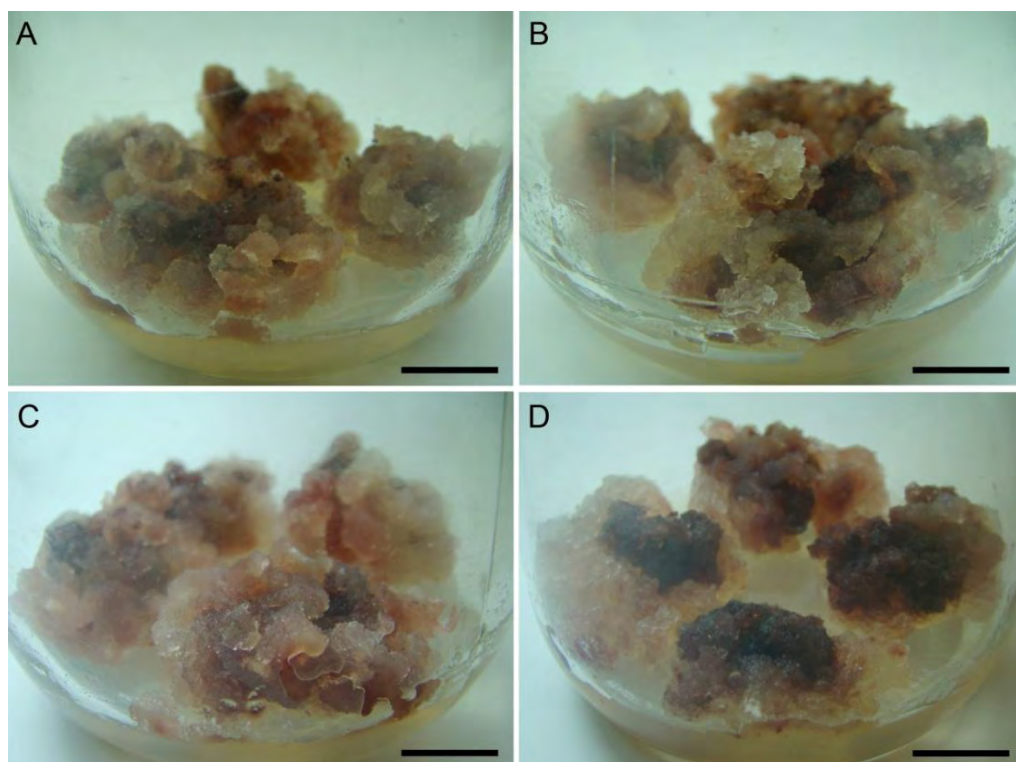
Tabela 11- Efeito da associação entre o fitorregulador Picloram e as citocininas BA ou KIN sobre a produção de massa calogênica em *P. aculeata* a partir de explantes hipocotiledonares, após três subcultivos.

Meios de cultura	Reguladores de crescimento (μM)			Produção de biomassa (g)	
	Picloram	BA	KIN	PF	PS
M5	2	0,2		$3,191 \pm 0,27$ a	$0,281 \pm 0,14$ a
M6	4	0,4		$3,318 \pm 0,38$ a	$0,314 \pm 0,33$ a
M7	10	1,0		$3,701 \pm 0,55$ a	$0,380 \pm 0,21$ a
M8	20	2,0		$2,305 \pm 0,24$ b	$0,192 \pm 0,30$ b
M9	2		0,2	$0,942 \pm 0,36$ c	$0,077 \pm 0,25$ c
M10	4		0,4	$1,214 \pm 0,38$ c	$0,108 \pm 0,08$ c
M11	10		1,0	$1,232 \pm 0,26$ c	$0,113 \pm 0,13$ c
M12	20		2,0	$1,410 \pm 0,14$ c	$0,136 \pm 0,20$ c

Legenda: Os dados representam a média \pm desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 24 - Influência da associação entre os fitorreguladores Picloram e BA

sobre a calogênese em *P. aculeata*, após 63 dias de cultura.



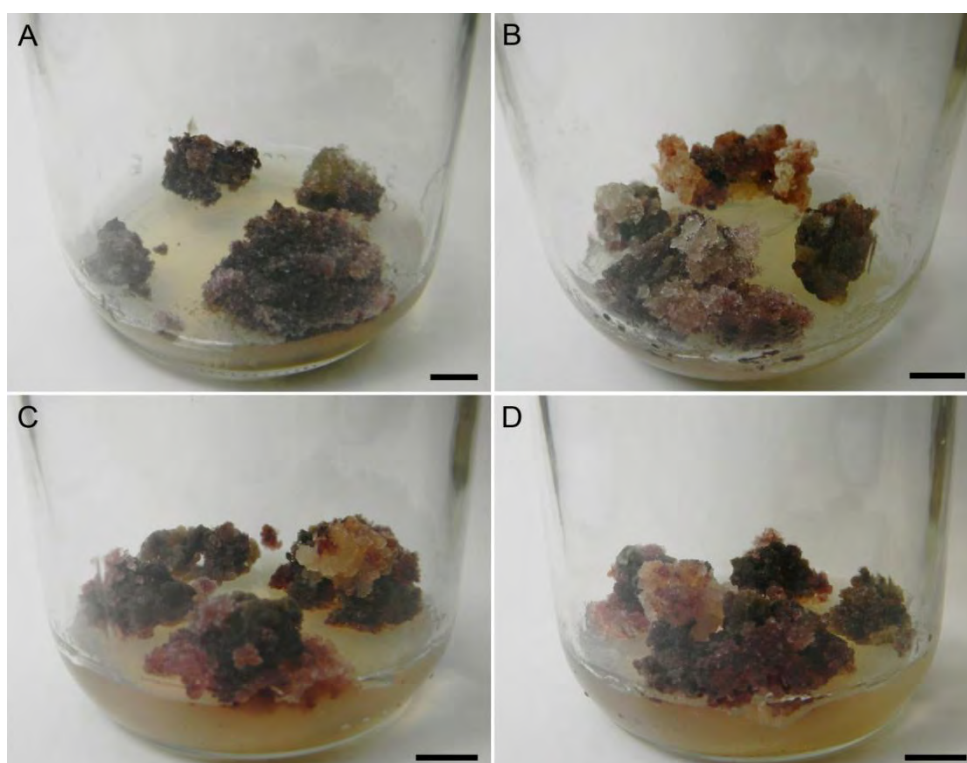
Legenda: A- MS + 2 μM Picloram + 0,2 μM BA; B- MS + 4 μM Picloram + 0,4 μM BA; C- MS + 10 μM Picloram + 1 μM BA e D- MS + 20 μM Picloram + 2 μM BA. Barras=1 cm.

A associação entre o fitorregulador Picloram e a citocinina KIN promoveu uma intensa oxidação dos explantes e uma baixa porcentagem de formação calogênica (Figura 25). Diferente do observado nas culturas suplementadas com Picloram e BA, a presença de concentrações mais elevadas de ambos fitorreguladores induziu o aumento da calogênese (Tabela 10). O maior valor de produção de biomassa ($1,41 \pm 0,14$ g) foi obtido em meio M12 (20 μM Picloram + 2 μM BA), porém sem diferença significativa para os demais tratamentos. Contudo, apesar da grande oxidação das culturas, foi possível observar a formação de calos friáveis de coloração bege e rosada a partir de calos oxidados pré-formados, principalmente nos meios M10, M11 e M12 (Figura 25).

Deste modo, considerando a produção de biomassa e os aspectos morfológicos dos calos obtidos em *P. aculeata*, as culturas mantidas em meios MS suplementados com 10 e 20 μM de Picloram foram selecionadas e permaneceram em estoque para experimentos posteriores.

Figura 25 - Calogênese em *P. aculeata* a partir de explantes de hipocótilo

cultivados em meios MS contendo a associação entre Picloram e KIN em diferentes concentrações, após três subculturas.



Legenda: A- MS + 2 μ M Picloram + 0,2 μ M KIN; B- MS + 4 μ M Picloram + 0,4 μ M KIN; C- MS + 10 μ M Picloram + 1 μ M KIN e D- MS + 20 μ M Picloram + 2 μ M KIN. Barras=1 cm.

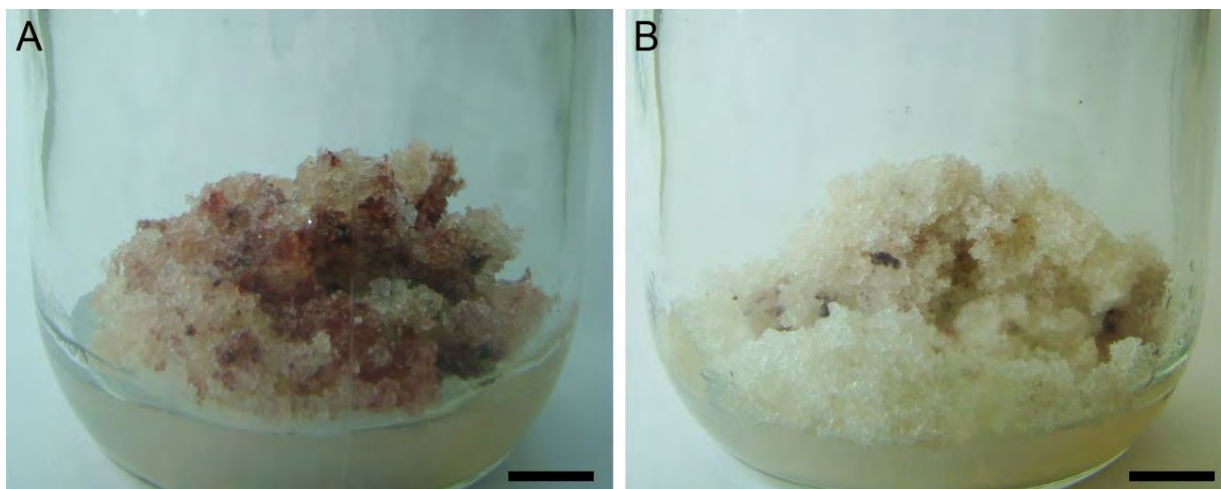
4.3.1.2 Manutenção da cultura de calos

Após 63 dias de cultura, os calos proliferados em meio básico MS suplementado com 10 e 20 μ M de Picloram (meios M3 e M4) foram subcultivados para meio fresco de igual composição, visando à manutenção de culturas estoque. Nesta ocasião, a massa calogênica foi selecionada em ambas as culturas, valorizando as regiões pigmentadas presentes no meio M3 e as regiões mais claras no meio M4. Ao final de 21 dias, observou-se a formação de uma massa calogênica mais homogênea tanto em meio M3 como em M4 (Figura 26).

Entretanto, ao longo das primeiras semanas de manutenção, verificou-se que os calos apresentavam um crescimento mais expressivo na semana anterior ao próximo subcultivo, ou seja, após o consumo de nutrientes do meio. Deste modo, durante a segunda subcultura em meio de manutenção, os calos foram transferidos para meio de igual composição, porém com a metade da concentração de sais minerais presentes no meio MS (MS $\frac{1}{2}$).

Figura 26 - Massas calogênicas selecionadas a partir de calos proliferados em meios MS

suplementados com Picloram, mantidas por três semanas em culturas estoque.

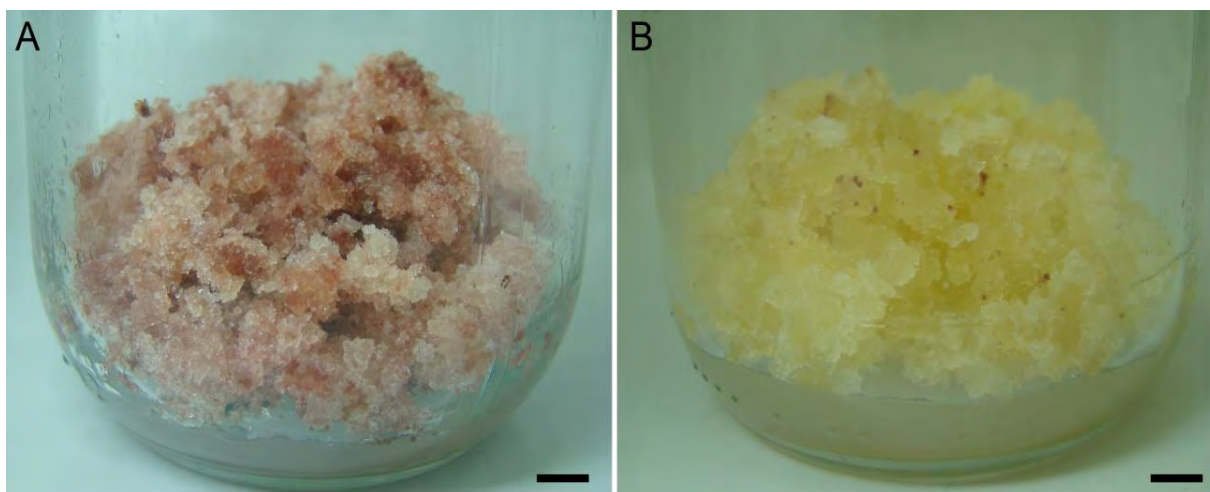


Legenda: A- Calos pigmentados em meio contendo 10 μM de Picloram; B- Calos não pigmentados em meio contendo 20 μM de Picloram. Barras=1cm.

Ao longo de cinco subculturas em meio de manutenção MS $\frac{1}{2}$, os calos proliferados em suplementado com 20 μM de Picloram, tornaram-se gradativamente rosados. A partir do terceiro subcultivo, observou-se a formação de pontos pigmentados em diferentes regiões da massa calogênica, os quais aumentaram ao longo do tempo. Deste modo, após a quinta subcultura, a biomassa calogênica produzida nos meios MS $\frac{1}{2}$ contendo com 10 e 20 μM de Picloram apresentava o mesmo aspecto, com formação de calos muito friáveis e com pigmentação rosada. Neste caso, considerando a relação custo/ benefício, as culturas mantidas em presença de 10 μM de Picloram foram selecionadas para permanecerem em estoque.

A cada subcultura, as regiões mais pigmentadas dos calos eram selecionadas, visando à formação de uma massa calogênica com pigmentação cada vez mais homogênea. Entretanto, a partir da sexta subcultura, foi possível verificar a presença de alguns calos bem mais claros, de coloração bege, produzidos a partir da massa calogênica pigmentada. Deste modo, visando o estabelecimento de duas linhagens celulares a partir das culturas em meio MS $\frac{1}{2}$ contendo 10 μM de Picloram, estes calos mais claros foram selecionados e reunidos em frascos de cultura individualizados. Os novos calos foram mantidos e subcultivados conforme o estabelecido para os calos pigmentados. Após mais três subculturas, verificou-se que a massa calogênica individualizada de coloração bege apresentava consistência friável e presença de alguns pontos pigmentados de cor rosa, porém com crescimento inferior ao observado nas culturas de calos pigmentados (Figura 27).

Figura 27 - Culturas de calos pigmentados e não pigmentados de *P. aculeata* mantidas em meio básico MS $\frac{1}{2}$ suplementadas com 10 μM de Picloram, após oito subculturas.



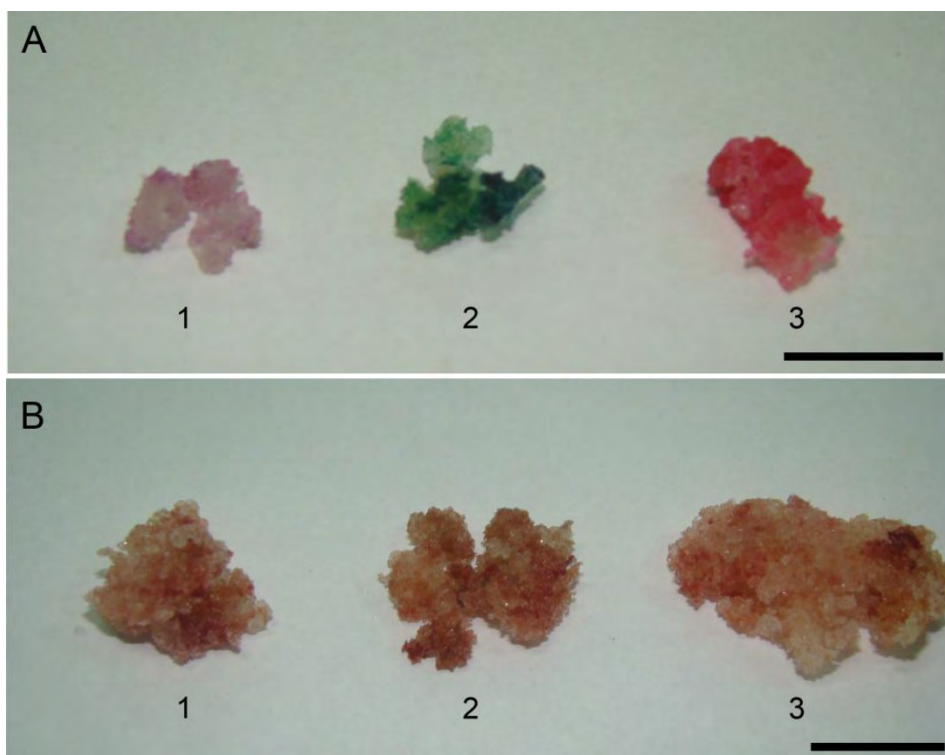
Legenda: A- Calos pigmentados; B- Calos não pigmentados. Barras=1 cm.

A pigmentação rosada dos calos friáveis produzidos a partir de explantes hipocotiledonares ocorreu de maneira espontânea nas culturas iniciadas em meio básico MS suplementados com Picloram, especialmente na concentração de 10 μ M.

4.3.1.3 Identificação inicial dos pigmentos

Após alguns segundos em contato com a atmosfera ácida e básica, os calos de *C. rosea* produtores de antocianinas, alteraram sua coloração, tornando-se vermelhos e verdes, respectivamente. Já os calos de *P. aculeata* mantiveram sua coloração rosada, independente da variação do pH do meio (Figura 28). Desta forma, considerando que as betalaínas possuem maior estabilidade em relação à acidez do meio e que estes pigmentos são restritos à ordem Caryophyllales, como as espécies da família Cactaceae, é possível sugerir que as culturas de calos de *P. aculeata* são produtoras de betalaínas. Neste caso, novos experimentos foram realizados a fim de identificar e otimizar a produção destes importantes pigmentos nas culturas de calos de *P. aculeata*.

Figura 28 - Alterações na coloração de pigmentos em massas calogênicas submetidas a atmosferas com variação de pH.

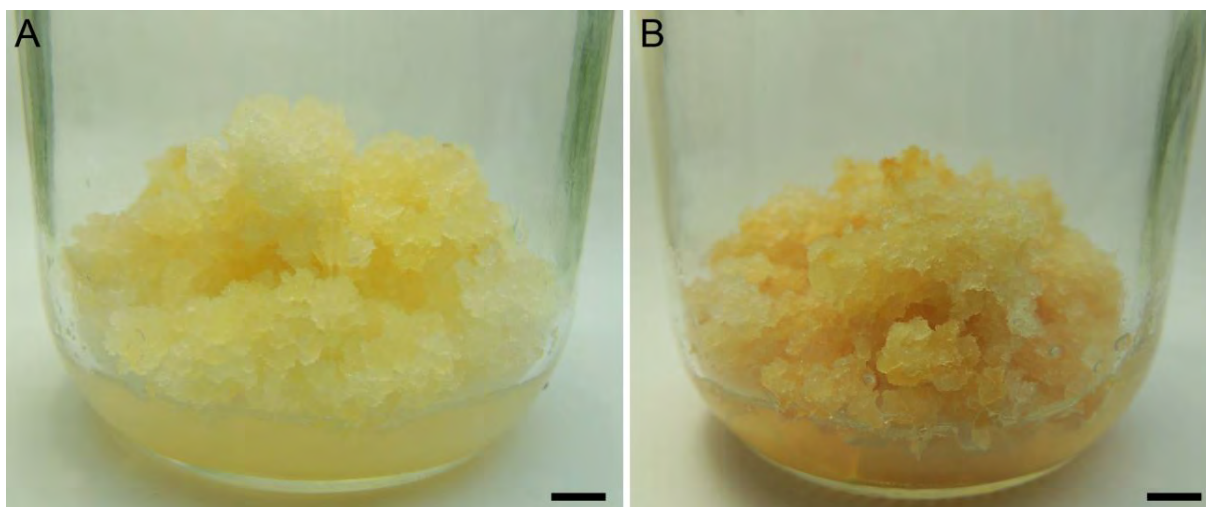


Legenda: A- Calos de *C. rosea*; B- Calos de *P. aculeata*. 1- Vapor de água; 2- pH alcalino; 3- pH ácido. Barras=1cm.

4. 3. 1. 4 Modulação da produção de pigmentos

Calos pigmentados e não pigmentados mantidos em estoque em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 10 e 20 μM de Picloram foram transferidos para um novo meio de cultura, meio HB, contendo modificações na composição de sais minerais, vitaminas e aminoácidos, porém com a mesma composição hormonal. Ao longo do período de três subculturas em meio HB, foi possível observar uma redução no crescimento dos calos, que permaneceram com a textura bastante friável. Entretanto, os calos pigmentados cultivados em meio HB com 10 μM de Picloram tornaram-se gradativamente mais claros, enquanto os não pigmentados passaram a apresentar regiões mais amareladas. Após 63 dias de cultura, a massa calogênica mantida em meio HB suplementado com 10 μM de Picloram, perdeu totalmente a pigmentação rosada, tornando-se de coloração bege, enquanto os calos cultivados em meio HB com 20 μM de Picloram exibiam diversas regiões alaranjadas (Figura 29). Além disso, foi possível observar que embora os calos tenham mantido a consistência friável, as culturas apresentaram um menor crescimento quando comparadas às culturas mantidas em meio MS com a metade da concentração salínica, principalmente na suplementação mais alta de Picloram.

Figura 29 - Calos cultivados de *P. aculeata* em meio HB suplementados com Picloram, após 63 dias de cultivo.

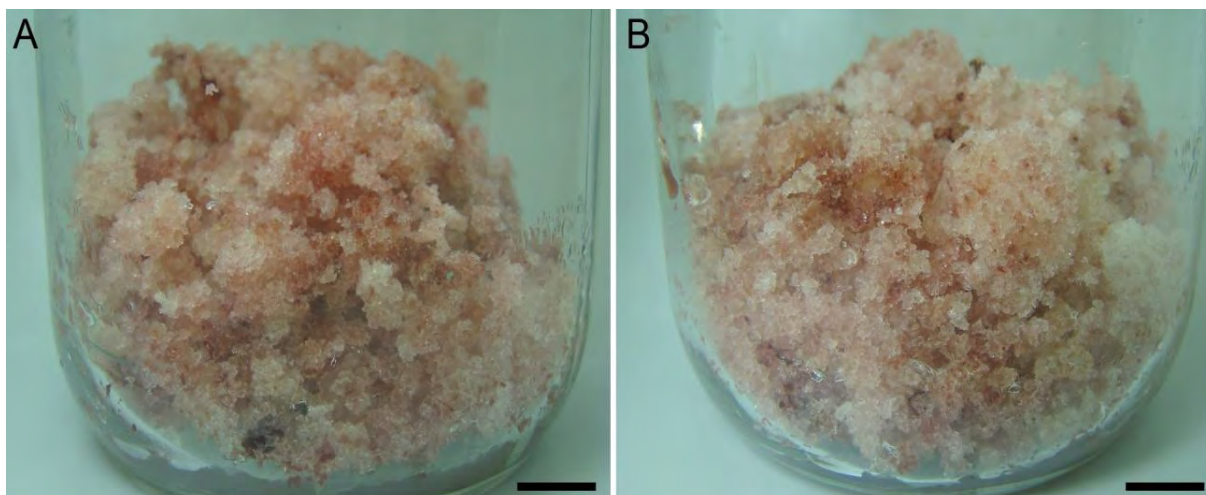


Legenda: A- 10 μ M de Picloram; B- 20 μ M de Picloram. Barras=1 cm.

Deste modo, considerando que o objetivo do experimento era aumentar a produção de betalaínas rosadas em calos de *P. aculeata*, novos ensaios foram realizados para este fim. Os calos pigmentados mantidos em estoque foram transferidos para meio básico MS modificado, contendo a metade da concentração de nitrogênio inorgânico (30 mM) e alterações na proporção entre os íons amônio e nitrato (1: 4 e 1: 8), porém com a mesma suplementação hormonal (10 μ M de Picloram).

Ao longo do período de cultivo, os calos mantidos nos meios MS modificados mantiveram a pigmentação rosada e a consistência friável, independente da razão entre o amônio e o nitrato presente no meio nutritivo. Contudo, a partir do primeiro subcultivo foi possível observar que as culturas mantidas em meios MS modificados apresentavam uma produção de biomassa calogênica superior aos calos cultivados em meio de manutenção (MS $\frac{1}{2}$). Esta grande proliferação celular continuou sendo verificada durante os subcultivos posteriores, sem interferir na qualidade da massa calogênica formada. Em relação à pigmentação, os calos produzidos permaneceram bem pigmentados, porém sem grandes alterações na intensidade da coloração observada em comparação às culturas mantidas em estoque (Figura 30).

Figura 30 - Alta produção de biomassa calogênica pigmentada de *P. aculeata* nas culturas mantidas em meios MS suplementados com 10 μ M de Picloram, contendo 30 mM de nitrogênio total e alterações na razão amônio e nitrato, após três subculturas.



Legenda: A- 1: 4 de NH_4^+ e NO_3^- ; B- 1: 8 de NH_4^+ e NO_3^- . Barras=1 cm.

4.3.2 Cultura de células em suspensão de *P. aculeata* Mill

Culturas de células em suspensão foram iniciadas a partir de calos friáveis mantidos em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 10 μM de Picloram. Inicialmente, avaliou-se a quantidade de inóculo mais adequada ao estabelecimento das CCS de *P. aculeata*, a partir da aferição do peso de matéria fresca (PF) das culturas iniciadas com 1 e 2 g de calos.

Após três semanas de cultivo, foi possível observar que as CCS iniciadas com 1 ou 2 g de inóculo apresentavam um alto crescimento celular com valores de PF muito próximos (Tabela 12). Após 14 dias do início das culturas, as CCS apresentavam exatamente o mesmo PF, independente da quantidade de inóculo. Os maiores valores de PF foram obtidos nas culturas iniciadas com 2 g de calos, porém sem diferença estatística daquelas iniciadas com a metade de inóculo. Deste modo, considerando a alta produção celular a partir de uma pequena quantidade de massa calogênica, optou-se pelo início das CCS de *P. aculeata* a partir do inóculo de 1 g de calos friáveis em 30 mL de meio de cultura.

A curva de crescimento das CCS estabelecida a partir do inóculo de 1 g apresentou uma fase lag muito curta, uma vez que após 3 dias de cultivo, foi possível observar o aumento do peso de matéria seca das culturas (Figura 31 A). Esta fase caracteriza-se pela adaptação das células ao meio de cultivo e à condição de estresse gerada pela agitação das culturas, sendo um período de preparação à divisão celular. A partir do 3º dia de cultivo, as CCS entraram na fase exponencial e apresentaram um rápido crescimento, alcançando peso de matéria seca de $0,238 \pm 0,06$ g e $0,297 \pm 0,07$ g no 8º e 13º dia, respectivamente. Na fase log, as células se encontram em crescimento ativo, com metabolismo acelerado, sintetizando diversas substâncias. O período de maior proliferação celular ocorreu a partir 13º dia de

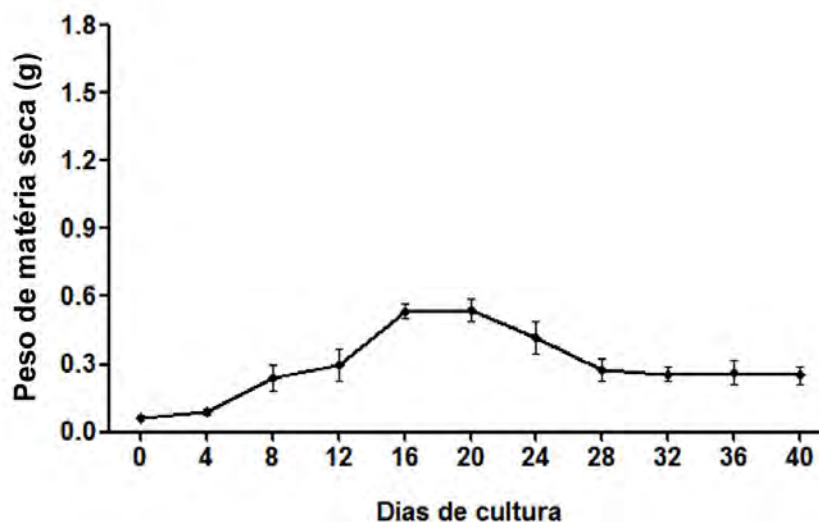
cultivo, onde os maiores valores de PS foram obtidos entre o 17º ($0,534 \pm 0,03$ g) e o 20º dia ($0,539 \pm 0,48$ g) de cultivo (Figura 31).

Tabela 12 - Acúmulo de biomassa a partir das CCS de *P. aculeata* iniciadas com diferentes inóculos.

Peso do inóculo	Peso de matéria fresca (g)		
	Início das culturas	Após 14 dias	Após 21 dias
1 g	$1,025 \pm 0,068$	$11,562 \pm 0,300$ a	$15,517 \pm 0,378$ a
2 g	$2,036 \pm 0,044$	$11,562 \pm 0,300$ a	$16,877 \pm 0,429$ a

Legenda: Os dados representam a média \pm desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 31 - Acúmulo de biomassa ao longo do crescimento das culturas de células em suspensão de *P. aculeata* mantidas em meio MS $\frac{1}{2}$ + 10 μ M de Picloram.



A partir do 20º dia de cultivo, as CCS apresentaram uma redução na proliferação celular, caracterizando o início da fase estacionária. Nesta fase, as células se encontram com baixa capacidade de divisão celular, representando um decréscimo no crescimento das culturas. A rápida diminuição no PS das culturas foi observada até o 31º dia, período a partir do qual as CCS passaram a apresentar um crescimento linear até o 40º dia, quando as avaliações foram encerradas (Figura 31). Deste modo, após o estabelecimento da curva de crescimento, o subcultivo das CCS passou a ser realizado entre o 15º e o 17º dia de cultivo, visando à manutenção das células na fase exponencial de crescimento.

Culturas de células em suspensão também foram iniciadas a partir de calos friáveis produzidos em meio MS + 10 μM de Picloram contendo metade da taxa de nitrogênio total e modificados na razão amônio/ nitrato (meios C4 e C8). As CCS foram iniciadas a partir de cerca de 1 g de inóculo, os quais foram cultivados em meio líquido de mesma composição utilizada para a produção calogênica. Independentemente da composição do meio de cultura, foi possível observar que após uma semana de cultivo em meio líquido e sob agitação constante, a biomassa celular tornou-se mais pigmentada, exibindo pigmentos de coloração vinho. Além disso, a pigmentação das células ocorreu de forma intensa e homogênea, uma vez que todas as células em cultura apresentavam a mesma coloração (Figura 32).

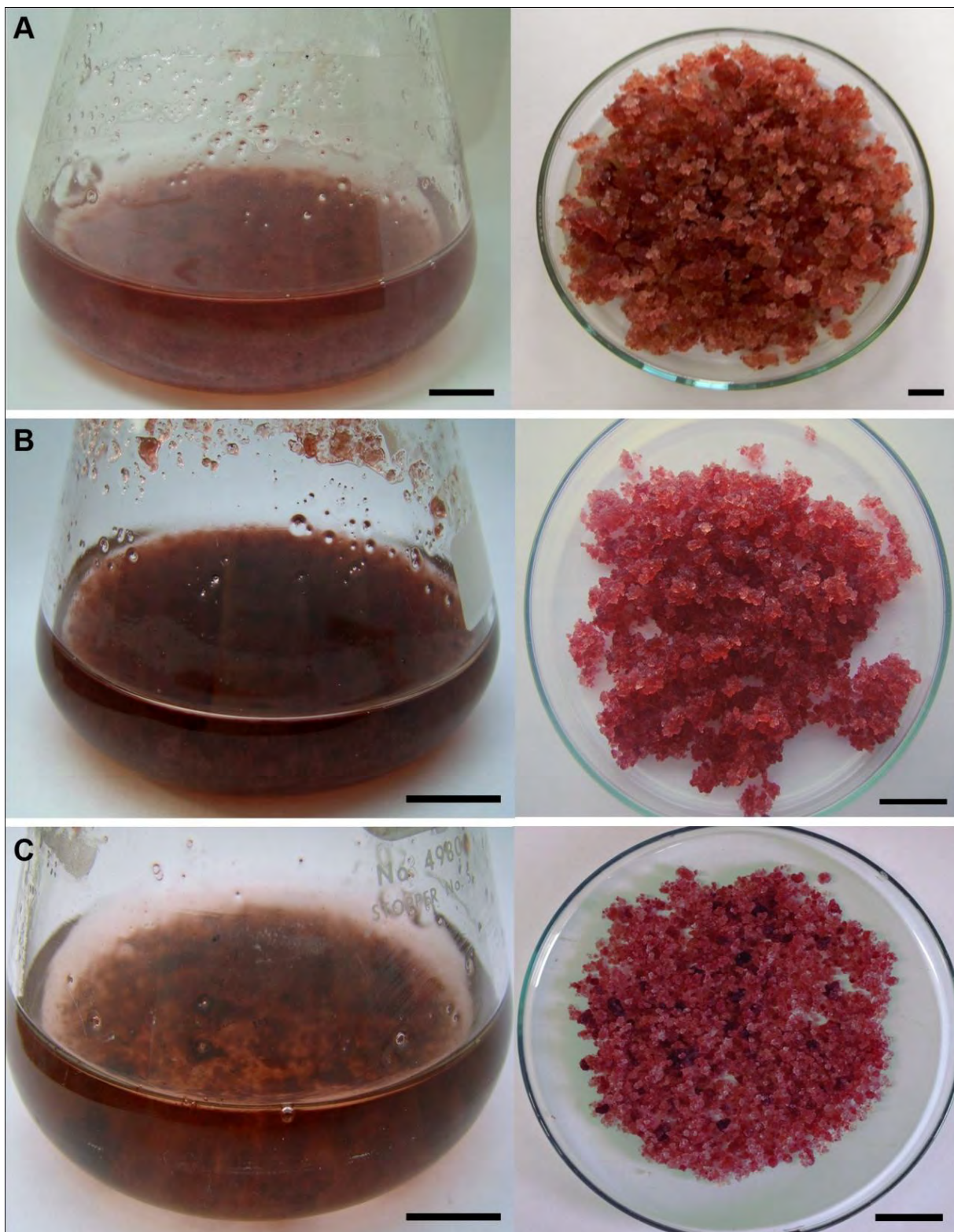
Todas as CCS foram subcultivadas a cada 15 dias, onde estas eram filtradas e cerca de 1 g de células inoculado em meio de cultura fresco de igual composição. Ao longo do período de cultivo, observou-se que as subculturas favoreceram a proliferação celular das CCS de *P. aculeata*. No final da segunda subcultura, foi verificado que a produção de biomassa celular alcançou quase o dobro do peso de matéria fresca obtido no primeiro subcultivo, sendo esta alta proliferação mantida também na terceira subcultura (Tabela 13). Durante os subcultivos, foi possível observar que independente do período e do meio de cultura, as CCS permaneceram com o mesmo aspecto e coloração.

Tabela 13 - Acúmulo de biomassa a partir das CCS de *P. aculeata* em diferentes meios MS suplementados com 10 μM de Picloram, ao longo de três subcultivos.

$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	Acúmulo de biomassa (g)					
	1ª subcultura		2ª subcultura		3ª subcultura	
	Peso fresco	Peso seco	Peso fresco	Peso seco	Peso fresco	Peso seco
1 : 2	11.56 \pm 0.30 a	0.36 \pm 0.18 a	21.44 \pm 0.12 a	0.57 \pm 0.19 a	19.86 \pm 0.29 a	0.51 \pm 0.23 a
1 : 4	13.20 \pm 0.83 a	0.37 \pm 0.67 a	23.84 \pm 0.27 a	0.58 \pm 0.45 a	23.25 \pm 0.37 a	0.57 \pm 0.29 a
1 : 8	13.53 \pm 0.62 a	0.37 \pm 0.43 a	23.56 \pm 0.34 a	0.59 \pm 0.38 a	22.71 \pm 0.54 a	0.56 \pm 0.32 a

Legenda: Os dados representam a média \pm desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 32 - Cultura de células em suspensão de *P. aculeata* em meio MS suplementado com 10 μM de Picloram, após 15 dias de cultivo.



Legenda: A- CCS em meio MS $\frac{1}{2}$; B- CCS em meio MS com 30 mM de nitrogênio total e 1:4 de amônia/nitrato; C- CCS em meio MS com 30 mM de nitrogênio total e 1:8 de amônia/nitrato. Barra=1 cm.

4.3.3 Quantificação de betalaínas

A metodologia aplicada para a quantificação de betalaínas totais baseia-se na

quantificação de duas betalaínas específicas, a betanina e a vulgaxantina-I. Enquanto a primeira representa a principal betacianina, betalaína de coloração avermelhada, a segunda representa uma betaxantina, betalaína de coloração amarelada.

Calos e CCS mantidos em meio básico MS ½ em presença de 10 µM de Picloram (meio C) e em meios modificados na proporção amônio/nitrato (meios C4 e C8) foram submetidos à quantificação de betalaínas totais. A massa calogênica foi quantificada ao final de 21 dias de cultivo, enquanto as CCS foram avaliadas ao final de duas semanas de cultura. Nesta ocasião, foi possível observar que a produção de betalaínas nas culturas de células em suspensão foi bem maior do que na cultura de calos, confirmando a coloração mais intensa observada nas CCS (Tabela 14). Entretanto, embora as culturas de calos apresentassem pigmentação rosada e as CCS uma coloração vinho, a quantidade de betaxantinas foi superior à de betacianinas, em todos os meios nutritivos analisados.

Em ambos os sistemas biotecnológicos, foi verificado que a modificação na proporção entre o amônio e o nitrato presentes no meio de cultura influenciou positivamente a produção de betalaínas em *P. aculeata*. Nas culturas de calos, a quantidade de betalaínas totais tornou-se maior na medida em que a razão entre amônio e nitrato diminuía, uma vez que os maiores valores ($1,14 \pm 0,18$ mg/100 mL) foram alcançados em meio C8, contendo uma proporção amônio e nitrato de 1 : 8, porém diferença estatística da produção em meio C4 (Tabela 14).

Tabela 14 - Produção de betalaínas totais a partir de cultura de calos e de células em suspensão de *P. aculeata* em meio MS ½ suplementado com 10 µM de Picloram (meio C) e meio MS modificados em relação à quantidade e à fonte de nitrogênio (meios C4 e C8).

Sistemas <i>in vitro</i>	Meios de cultura	Produção de betalaínas (mg/100 mL)		
		Betanina	Vulgaxantina-I	Betalaínas totais
Calos	C	0,17 ± 0,04 b	0,49 ± 0,06 c	0,65 ± 0,10 b
	C4	0,28 ± 0,09 ab	0,63 ± 0,11 b	0,91 ± 0,21 ab
	C8	0,34 ± 0,12 a	0,80 ± 0,09 a	1,14 ± 0,18 a
CCS	C	0,59 ± 0,06 b	1,10 ± 0,16 b	1,60 ± 0,22 c
	C4	1,10 ± 0,11 a	2,70 ± 0,35 a	4,10 ± 0,47 a
	C8	0,91 ± 0,08 a	1,30 ± 0,09 b	2,21 ± 0,19 b

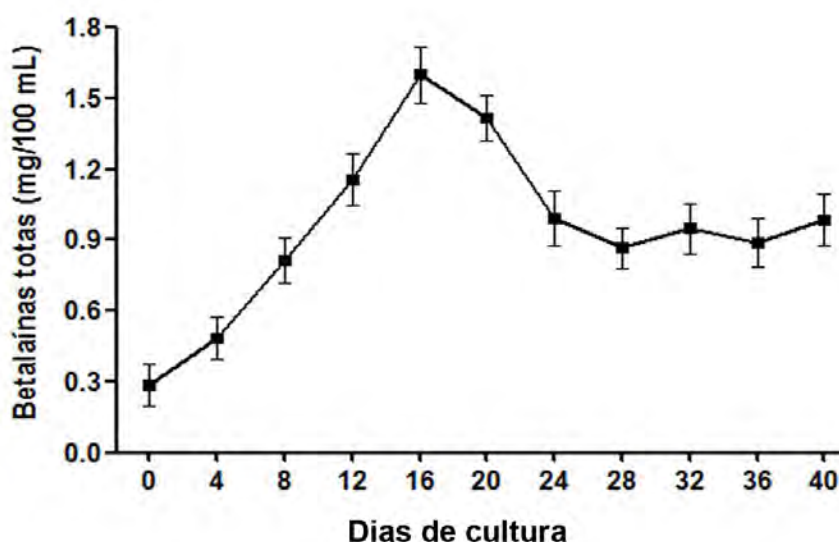
Legenda: Os dados representam a média ± desvio padrão. Em cada coluna, a mesma letra indica não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Nas culturas de células em suspensão, a modificação na fonte de nitrogênio também favoreceu o acúmulo de betalaínas nas culturas, porém a maior produção de betalaínas totais ($4,10 \pm 0,47$ mg/100mL) foi alcançada em meio nutritivo C4. Entretanto, conforme descrito

anteriormente, a produção de biomassa nestas culturas foi muito baixa, sendo observada uma estreita relação entre o alto rendimento de metabólitos e o baixo crescimento celular.

A produção de betalaínas totais a partir das CCS mantidas em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 10 μM de Picloram (meio C) ocorreu durante a fase exponencial de crescimento das culturas (Figura 33). Deste modo, o maior conteúdo de betalaínas foi verificado após 12 dias de cultura. Após este período, o acúmulo de betalaínas mostrou uma ligeira redução e, em seguida, manteve-se estável ao longo do 40º dia de cultura (Figura 33).

Figura 33 - Produção de betalaínas totais ao longo do crescimento das culturas de células em suspensão de *P. aculeata* mantidas em meio MS $\frac{1}{2}$ + 10 μM de Picloram.



4.4 Discussão

A produção de corantes naturais a partir da cultura *in vitro* oferece diversas vantagens em relação ao cultivo tradicional de plantas inteiras, como a manutenção da assepsia das culturas e a alta produtividade, independentemente das variações climáticas e das condições do solo (VANISREE et al., 2004). Neste contexto, dentre as diferentes ferramentas biotecnológicas, a cultura de calos constitui um excelente modelo para a produção de substâncias especiais sob condições *in vitro*, favorecendo a síntese de diversos metabólitos e pigmentos em diferentes espécies de plantas (EL-BELTAGI et al., 2011; LEGHA et al., 2012; VERMA et al., 2012).

No presente estudo, a calogênese em *Pereskia aculeata* foi estabelecida a partir de

explantes foliares, cotiledonares e hipocotiledonares, obtidos de plântulas axênicas, cultivados em meio MS contendo diferentes concentrações de Picloram. Embora a presença de auxinas no meio de cultura seja necessária à proliferação calogênica na maioria das espécies (SIMÕES et al., 2009; KUO et al., 2012), este processo pode ser induzido pela suplementação apenas de auxina ou de citocinina (WU et al., 2003) ou pela adição de ambos os fitorreguladores (BERNABÉ-ANTONIO et al., 2010). Geralmente, apenas os tecidos tumorais apresentam uma alta taxa de crescimento, sem a presença de reguladores de crescimento (NEELWARNE, 2012; STILES; LIU, 2013).

Segundo Benjamins e Scheres (2008), a atividade dos diferentes reguladores de crescimento sobre as culturas *in vitro* irá depender do transportador ou receptor proteico sintetizado pelos explantes. Desta forma, as diversas respostas observadas nas diferentes culturas estão diretamente relacionadas à sensibilidade daquele tipo de explante aos componentes do meio nutritivo. Em *P. aculeata*, a região hipocotiledonar mostrou-se a mais adequada como fonte de explantes visando ao estabelecimento de culturas de calos friáveis. Em meios MS suplementados com Picloram, os segmentos de hipocótilo apresentaram uma completa desdiferenciação dos seus tecidos, com alta produção de biomassa calogênica. Já nas culturas iniciadas a partir de lâmina foliar e folha cotiledonar, a proliferação de calos ocorreu a partir da borda dos explantes, os quais se tornaram completamente oxidados, após o segundo subcultivo.

Na família Cactaceae, o cultivo de explantes foliares em meio básico B5 (GAMBORG et al., 1968) com diferentes concentrações de 2,4-D induziu à formação de calos embriogênicos em *Pereskia grandiflora* (LENG; KENG, 2007). Em *Opuntia robusta* a suplementação de ANA e 2,4-D induziu à formação calos compactos verdes, enquanto calos friáveis foram obtidos em meio suplementado com AIA a partir de explantes de cladódios (ASTELLO-GARCÍA et al., 2013). A cultura de explantes caulinares de *Cereus jamacaru* e *C. hildmannianus* em meio MS contendo 2,4-D estimulou a proliferação de calos friáveis, enquanto a adição de altas taxas de KIN ao meio de cultura resultou na formação de calos de consistência compacta (KARIMI et al., 2010). Neste trabalho, a suplementação com as auxinas ANA ou 2,4-D não se mostrou eficiente para a produção de calos em *P. aculeata*, independentemente da concentração utilizada e do tipo de explante cultivado. Nos segmentos de folha cotiledonar, observou-se a formação de raízes adventícias nas culturas mantidas em meio MS contendo altas concentrações de ANA (10 e 20 μM) e baixas taxas de 2,4-D (2 e 4 μM). A adição deste último fitorregulador estimulou uma pequena formação calogênica na base dos explantes de hipocótilo, enquanto os segmentos foliares tornaram-se oxidados e não

responderam a nenhuma das concentrações de ANA e 2,4-D testadas.

A associação entre auxinas e citocininas tem promovido resultados positivos no aumento da produção de biomassa calogênica em muitas espécies da família Cactaceae (SHEDBALKAR et al., 2010). Segundo Ouelhazi e colaboradores (1994), a interação entre auxinas e citocininas é considerada complexa e envolve a modulação da resposta das citocininas pelas auxinas (efeitos sobre glicosilação ou velocidade de ribosilação), resultando em uma atividade sinérgica ou antagônica.

Em algumas espécies de cactos como *Cereus peruvianus*, a adição de concentrações iguais dos fitorreguladores 2,4-D e KIN no meio de cultura aumentou a proliferação calogênica a partir de explantes hipocotiledonares (OLIVEIRA; MACHADO, 2003). Entretanto, a associação entre a auxina 2,4-D e as citocininas BA ou KIN, não favoreceu a produção de calos em *Mammillaria candida* (SANTOS-DÍAZ et al., 2005). Esta ação antagônica entre os reguladores de crescimento também foi observada neste estudo, uma vez que as culturas de *P. aculeata* mantidas em meios suplementados com Picloram em combinação com baixas taxas de BA ou KIN apresentaram baixa produção calogênica com formação de calos muito oxidados, principalmente em presença de KIN.

As culturas iniciadas a partir de hipocótilo com maior produção de biomassa (10 e 20 μM de Picloram) foram selecionadas e mantidas em meio MS contendo a mesma suplementação hormonal. Nesta ocasião, os calos proliferados em meio com 10 μM de Picloram exibiam pigmentação rosada, enquanto aqueles produzidos em meio com 20 μM de Picloram apresentavam coloração bege clara, porém ambos com grande proliferação calogênica e elevada friabilidade. Em culturas de *Zaleya decandra*, a produção de calos pigmentados ocorreu a partir de explantes caulinares mantidos em meios suplementados com 2,4-D e TDZ em diferentes concentrações (RADFAR et al., 2012). Enquanto em *Amaranthus tricolor*, a produção de pigmentos foi estimulada após a transferência dos calos, induzidos em 2,4-D, para meios contendo BA e ANA (BISWAS et al., 2013). Nos estudos de Simões e colaboradores (2009), a pigmentação nos calos de *C. rosea* foi observada após 6 a 7 meses de cultura em meio MS + 0,9 μM de 2,4-D. Entretanto no presente estudo, a pigmentação das culturas de *P. aculeata* ocorreu de modo espontâneo e simultaneamente à proliferação da massa calogênica.

A manutenção das culturas em meio com metade da concentração salínica estimulou um aumento na proliferação de calos ao longo do período de cultivo. Devido ao rápido crescimento e a maior produção de pigmentos, as culturas mantidas em meio MS $\frac{1}{2}$

suplementados com 10 μM de Picloram (Meio C) foram selecionados para os demais experimentos. A cada subcultura, as regiões contendo pigmentos rosados foram sendo gradativamente selecionadas e separadas dos calos de coloração bege, formando dois tipos de massas calogênicas mantidas no mesmo meio de cultura. Contudo, foi possível observar que as culturas pigmentadas apresentaram um maior crescimento em relação aos calos não pigmentados, de coloração bege.

Pigmentos vegetais de coloração rosada podem pertencer à classe das antocianinas ou das betalaínas, pigmentos vacuolares, solúveis em água, mutuamente exclusivos. Os primeiros, caracterizadas como flavonoides, são amplamente distribuídos no Reino Plantae, sendo responsáveis pela coloração de órgãos vegetativos, flores e frutos, além de atuarem como protetor da radiação UV (SAKUTA, 2013). As betalaínas, embora apresentem funções similares às antocianinas, são pigmentos nitrogenados, restritos às espécies da ordem Caryophyllales, com exceção das famílias Caryophyllaceae e Molluginaceae (STRACK et al., 2003), sendo por isso, muito estudadas do ponto de vista taxonômico e evolutivo (BROCKINGTON et al., 2011).

A biossíntese dos flavonoides consiste em uma das vias mais estudadas no metabolismo secundário vegetal, com muitos genes já clonados e analisados (FORKMANN; MARTENS 2001; SHIRLEY, 2001; KOES et al., 2005). Porém, a bioquímica e a genética da via biossintética das betalaínas ainda permanecem relativamente pouco conhecidas (TANAKA et al., 2008; OZEKI et al., 2011; SAKUTA; OHMIYA, 2011). Segundo Shimada e colaboradores (2004), as plantas que produzem betalaínas podem expressar algumas enzimas da via biossintética dos flavonoides, podendo acumular quantidades significativas de flavonóis, flavonoides e, em certos casos, até mesmo proantocianidinas. Desta forma, sugere-se a que ausência de antocianinas em espécies de Caryophyllales ocorre devido a diferenças nas regiões promotoras dos genes que codificam a dihidroflavonol-4-redutase e a antocianidina sintase, enzimas que catalisam as primeiras etapas da biossíntese de antocianinas (SHIMADA et al., 2007).

De modo geral, todos os pigmentos vegetais são de grande interesse para pesquisas em biologia geral e aplicada, envolvendo a indústria alimentícia, de cosméticos, fármacos e de produção de flores (SAKUTA, 2013). Neste contexto, nas últimas décadas, tem sido observado um aumento no interesse pelo uso das betalaínas como corantes naturais, devido às suas propriedades químicas e farmacológicas. Segundo Tanaka e colaboradores (2008), enquanto as antocianinas alteram sua cor em resposta à acidez do meio, as betalaínas são mais estáveis e não modificam sua coloração em uma ampla faixa de pH. Adicionalmente, diversos

estudos fitoquímicos e farmacológicos revelam que estes pigmentos atuam como potentes antioxidantes, protegendo o organismo contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo celular, além de apresentarem elevada atividade anti-inflamatória e anticarcinogênica (WALLACE, 2011; CHRISTENSEN et al., 2012; HOBBS et al., 2012).

Desta forma, considerando que as espécies da família Cactaceae pertencem à ordem Caryophyllales e que os calos rosados produzidos no meio C não exibiram alteração na coloração quando submetidos à atmosfera saturada com vapor em pH ácido e em pH básico, sugere-se que betalaínas estão sendo produzidas a partir da cultura de calos de *P. aculeata*. A partir dessas observações, foram realizados novos experimentos, com alteração na composição de sais e vitaminas no meio de cultura, a fim de aumentar a produção *in vitro* destes importantes pigmentos. Até o presente momento, a produção de betalaínas a partir de culturas *in vitro* de *P. aculeata* não foi encontrada na literatura.

Atualmente, a espécie *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae), conhecida como beterraba, consiste na única fonte de material usado comercialmente para extração de betacianina como corante alimentar. Desta forma, diversos estudos tem sido realizados com esta espécie, visando otimizar a produção *in vitro* destes pigmentos. Inicialmente, nas CCS de *B. vulgaris* em meio básico LS, Akita e colaboradores (2000) verificaram que redução pela metade da concentração de nitrogênio total, associada a modificações da proporção amônio : nitrato (1 : 14), ao aumento em 20 vezes da concentração de Fe^{+2} e à alta concentração de sacarose (50 $g.L^{-1}$), favoreceu o aumento da produção de betacianina de 163 mg/L em meio LS para 248 mg/L, em meio modificado.

Muitos estudos apontam para um efeito inibitório da alta concentração de sacarose sobre a produção de betacianinas, embora este mecanismo inibitório não esteja completamente esclarecido. Em *B. vulgaris*, a maior produção de betacianinas em meio LS ocorreu em meio contendo 20 $g.L^{-1}$ de sacarose, sendo verificado uma redução da produtividade em concentrações acima de 30 $g.L^{-1}$ (AKITA et al., 2000), fato também observado nas culturas de *Phytolacca americana* (SAKUTA et al., 1987) e *Chenopodium rubra* (BERLIN et al., 1986).

Posteriormente, na avaliação da influência dos microelementos boro, iodo, manganês, molibdênio, cobre, cobalto e zinco sobre a produção de betacianinas em CCS de *B. vulgaris*, verificou-se que os quatro primeiros (B, I, Mn e Mo) são essenciais ao crescimento e à produção de betacianinas. Porém, enquanto a remoção de Cu e Co não afeta a produtividade das culturas, a ausência de zinco, aumenta a síntese de betalaínas, embora reduza a proliferação celular (AKITA et al., 2001). Segundo Brown e colaboradores (1993), o zinco

atua como um cofator funcional, estrutural ou regulatório para um grande número de enzimas.

Com base nos estudos supracitados, um novo meio de cultura denominado meio HB (“high betalain”) foi estabelecido a partir de modificações no meio básico LS (AKITA et al., 2002). O meio HB apresenta a mesma concentração de vitaminas e de sacarose do meio LS, porém contém metade da quantidade de nitrogênio total (30 mM), uma razão amônio/nitrato de 1 : 14 (frente a proporção de 1 : 2 do meio LS), redução em 100 vezes da taxa de zinco (0,0003 mM) e ausência dos elementos cobre e cobalto. Nestas condições, após 14 dias de cultura, as CCS de *B. vulgaris* alcançaram uma alta proliferação celular e uma produção de 550 mg.L⁻¹ de betacianina.

Desta forma, calos de *P. aculeata* mantidos em meio com MS ½ + 10 ou 20 µM de Picloram foram cultivados em meio básico HB, contendo a mesma suplementação hormonal de origem. A escolha deste meio de cultura específico ocorreu devido ao fato dos calos de exibirem a presença de pigmentos (betalaínas) rosados, caracterizados como betacianinas. Mesmo os calos de coloração bege mantidos em meio com 20 µM de Picloram apresentaram diversas regiões rosadas ao longo do seu crescimento.

Entretanto, após três subculturas, os calos proliferados em meio HB + 10 µM de Picloram perderam a pigmentação rosada e se tornaram bege, enquanto aqueles mantidos com o dobro da concentração de Picloram passaram a exibir massas calogênicas em tom mais amarelado com regiões de cor laranja. Além disso, pode-se observar que ambas as culturas apresentaram um crescimento mais reduzido em relação aos calos mantidos em meio MS ½, especialmente em meio HB suplementado com 20 µM de Picloram.

Analisando os resultados obtidos e considerando a via biossintética das betalaínas, é possível sugerir que a mudança na coloração observada nas culturas podem ter ocorrido devido a reações de conjugação com o ácido betalâmico, o principal intermediário na síntese de betalaínas. Segundo Sakuta (2013), enquanto a ligação do ácido betalâmico ao ciclo-DOPA propicia a formação da betanidina, a aglicona de todas as betacianinas, a conjugação com aminoácidos ou grupamentos amina, resulta na formação de betalaínas amarelas, as betaxantinas. Adicionalmente, de acordo com alguns autores, estas reações de conjugação com o ácido betalâmico ocorrem de modo espontâneo no metabolismo celular (SCHLIEMANN et al., 1999; STRACK et al., 2003).

Neste caso, sugere-se que os calos de *P. aculeata* tenham sofrido uma alteração na via metabólica de síntese de pigmentos e passaram a produzir betaxantinas. Contudo, é importante ressaltar que pigmentos vegetais com coloração amarelo-alaranjado também

podem ser classificados como carotenoides, que inclusive já foram descritos nos frutos de *P. aculeata* (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Entretanto, os carotenoides diferem das betaxantinas por serem pigmentos armazenados em plastos, com características lipossolúveis, diferentemente do que foi observado nos calos cultivados em meio HB.

Comparando o meio HB com o meio básico MS $\frac{1}{2}$ usado para manutenção dos calos foi possível observar que ambos possuem a mesma quantidade total de macro e microelementos, embora a proporção da fonte de nitrogênio seja diferente no meio HB. Porém, grandes diferenças são observadas na composição de vitaminas e aminoácidos presentes nestes meios de cultura. Enquanto no meio MS verificamos a presença de ácido nicotínico, piridoxina.HCl, tiamina.HCl, glicina e mio-inositol, em meio básico LS, encontramos apenas o mio-inositol e tiamina.HCl, este último em uma concentração quatro vezes maior do que o observado em meio MS. Segundo Caldas e colaboradores (1998), embora as respostas observadas para a adição de diferentes vitaminas sejam muito específicas e dependentes do tipo de explante cultivado, a presença de tiamina no meio nutritivo favorece ou é indispensável ao crescimento da maioria das culturas. Esta vitamina atua como um cofator essencial às reações do metabolismo energético, bem como na biossíntese de aminoácidos e de terpenoides. Já o ácido nicotínico e a piridoxina são vitaminas envolvidas na biossíntese de alcaloides (GOODWIN; MERCER, 1983). Desta forma, é possível inferir que o baixo crescimento das culturas mantidas em meio HB pode ter ocorrido em resposta à ausência de determinadas vitaminas e aminoácidos no meio de cultura.

A quantidade e a fonte de nitrogênio presentes no meio nutritivo podem influenciar tanto no crescimento das culturas (VELIKY; ROSE, 1973) como na produção de metabólitos secundários de interesse (SMETANSKA, 2008). Em nível molecular, o nitrogênio é incorporado aos aminoácidos, atuando na regulação da expressão de proteínas específicas a partir de mecanismos que interferem na transcrição e/ ou na estabilidade do RNA mensageiro (SUGIHARTO; SUGIYAMA, 1992). Neste contexto, visando ao aumento da produção de betacianinas em *P. aculeata*, os calos mantidos em estoque em meio MS $\frac{1}{2}$ + 10 μ M de Picloram (meio C) foram cultivados em meio MS com a mesma suplementação hormonal, porém contendo a metade da concentração de nitrogênio total (30 mM), além de modificações em relação à fonte de nitrogênio, sendo testadas as proporções de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ de 1 : 4 (meio C4) e 1 : 8 (meio C8).

Segundo Nagella e Murthy (2011), a redução dos nutrientes e da concentração de íons amônio e nitrato presentes no meio de cultura pode exercer diferentes efeitos sobre o metabolismo primário e secundário de plantas e tecidos vegetais cultivados *in vitro*. Nas

culturas de calos de *Rosa hybrida*, a produção de antocianinas foi estimulada pela redução do íon amônio (RAM et al., 2011), enquanto a completa ausência deste íon otimizou a síntese de carotenoides em *Calendula officinalis* (LEGHA et al., 2012). Nas culturas de calos de *C. rosea*, taxas de nitrogênio total acima de 60 mM promovem redução na produção de antocianinas, embora não tenham efeito sobre o crescimento das culturas (SIMÕES et al., 2009). Em concordância com os estudos anteriores, o cultivo dos calos de *P. aculeata* em meios com menores taxas de amônio e maiores quantidades de nitrato (meios C4 e C8) estimulou uma maior produção de biomassa, com proliferação de calos friáveis e pigmentados.

Calos friáveis e pigmentados mantidos nos meios C, C4 e C8 foram utilizados como fonte de inóculo para o estabelecimento das CCS de *P. aculeata*. Segundo Saito e Mizukami (2002), as CCS são caracterizadas como uma das técnicas biotecnológicas mais eficientes para a produção de metabólitos especiais *in vitro*, favorecendo a formação de um sistema mais homogêneo com alta proliferação celular. No presente estudo, foi possível observar uma rápida adaptação ao meio líquido e a agitação das culturas, uma vez que as células exibiram uma elevada taxa de proliferação, independentemente do inóculo inicial (1 ou 2 g). Além disso, após uma semana de cultura, a pigmentação das células tornou-se mais intensa e homogênea, principalmente nos meios com maior proporção de nitrato (meios C4 e C8).

Independentemente do meio nutritivo, todas as culturas de células em suspensão apresentaram uma grande multiplicação celular, sendo subcultivadas a cada 15 dias. Em pouco tempo, ambas as culturas tornaram-se imóveis devido ao rápido crescimento e consumo do meio nutritivo, acompanhado por uma redução na intensidade da coloração das células. Adicionalmente, a maior produção de betalaínas foi verificada durante a fase exponencial de crescimento, após 12 dias de cultivo. De acordo com Mastuti (2012), na maioria das células cultivadas, a produção de metabólitos secundários atinge o valor máximo durante a fase estacionária do crescimento celular, havendo poucos casos em que a produtividade é maior durante a fase logarítmica, de ativo crescimento.

Nos estudos de Hirose e colaboradores (1990), a produção de betacianinas nas culturas de células em suspensão de *Phytolacca americana* foi inibida após a adição de afidicolina (inibidor da síntese de DNA) no meio nutritivo, sugerindo uma positiva correlação entre a produção de betalaínas e o crescimento celular. No presente trabalho, também foi possível observar que o acúmulo de betalaínas nas CCS de *P. aculeata*, foi diretamente associado ao crescimento celular, conforme o verificado nas culturas de outras espécies produtoras de betalaínas como *Beta vulgaris* (LEATHERS et al., 1992; AKITA et al., 2000), *P. americana*

(SAKUTA et al., 1986) e *Chenopodium rubrum* (BERLIN et al., 1986) e *Phytolacca sp.* (BHUIYAN et al., 2002).

A avaliação da produção de betalaínas nas culturas de calos e de células em suspensão de *P. aculeata*, foi realizada a partir da quantificação de duas betalaínas amplamente distribuídas: a betanina, a principal betacianina e a vulgaxantina-I, uma betaxantina. Segundo Georgiev e colaboradores (2008), a síntese de betalaínas é controlada principalmente pela luz e pelos reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultura. Diversos estudos apontam que a ação reversível dos fitocromos (Fv/Fvl) promove um aumento na síntese de betalaínas nas culturas mantidas sob regime luminoso em relação àquelas cultivadas no escuro (BIANCO-COLOMAS, 1980; SPASIC et al., 1985; GIROD; ZRYD, 1987). Além disso, o tipo de luz utilizada também influencia na produtividade das culturas, uma vez que o aumento na produção de betalaínas totais foi observado nas culturas de calos de *Portulaca sp.* irradiadas com luz azul e ultravioleta (KISHIMA et al., 1995), bem como nas culturas de raízes transformadas de *B. vulgaris* cv. Detroit Dark Red iluminadas com luz azul e vermelho longo (SHIN et al., 2003). Por outro lado, a luz branca favoreceu a produção de betacianinas em segmentos nodais de *Alternanthera brasilienses* em relação à iluminação com luz UV-A (SILVA et al., 2005).

Apesar dos avanços na biologia molecular, poucos são os trabalhos sobre a influência dos reguladores de crescimento sobre a síntese de betalaínas *in vitro*, embora em muitas espécies, a produção de antocianinas tenha sido amplamente estudada ao longo dos anos (DEIKMAN; HAMMER, 1995; VANDENBUSSCHE et al., 2007). Neste caso, considerando que estes pigmentos desempenham funções fisiológicas semelhantes, alguns autores apontam que a produção de betalaínas pode ser induzida por um conjunto semelhante de sinais (DEIKMAN; HAMMER, 1995) e influenciada por fitorreguladores, principalmente os pertencentes à classe das citocininas (SAKUTA et al., 1991).

Em *P. aculeata*, a taxa de betalaínas totais produzida pelas culturas confirmou o aspecto visual apresentado por ambos os sistemas *in vitro*, uma vez que o acúmulo de betalaínas nas CCS foi cerca de três vezes maior do que o verificado nas culturas de calos. Entretanto, apesar dos calos apresentem coloração rosada e as culturas em suspensão uma pigmentação vinácea, a quantidade de betaxantinas produzida nas culturas foi superior a de betacianinas, independentemente do sistema *in vitro* analisado. Desta forma, considerando que a quantificação foi realizada a partir do coeficiente de extinção de duas moléculas específicas, pode-se sugerir que as culturas de *P. aculeata* estejam produzindo outras betacianinas, uma vez que a taxa de betanina obtida foi baixa. De acordo com Amaral e Silva

(2003), a cultura *in vitro* permite interferir nas vias metabólicas, sendo possível reduzir, aumentar ou biotransformar metabólitos especiais, bem como sintetizar moléculas novas não encontradas na planta de campo.

Segundo Rao e Ravishankar (2002), a produção de metabólitos secundários vegetais é fortemente influenciada pela concentração e pela fonte de nitrogênio presentes no meio de cultura. Na produção de betalaínas a partir do cultivo *in vitro*, diversos estudos indicam que a síntese destes pigmentos é inibida em meio com altas taxas de nitrogênio total. Nas culturas de *B. vulgaris*, quantidades de nitrogênio superiores a 30 mM resultaram em redução na concentração de betacianinas (AKITA et al., 2000), enquanto em *Phytolacca americana*, o aumento do nitrogênio total de 0 - 40 mM favoreceu a síntese de betacianinas, porém a produção permaneceu praticamente constante em concentrações entre 40 - 80 mM (SAKUTA et al., 1986).

Por outro lado, uma baixa razão amônio/nitrato tem promovido o acúmulo de pigmentos nas CCS de *B. vulgaris* (LEATHERS et al., 1992), *Phytolacca americana* (SAKUTA et al., 1986) e *Portulaca grandiflora* (BOHM et al., 1991). Nas culturas de *P. aculeata*, a variação na fonte de nitrogênio também contribuiu positivamente para a produção de betalaínas, seja a partir da cultura de calos ou da CCS. A modificação na proporção entre o amônio e o nitrato de 1 : 4 e 1 : 8, aumentou a síntese de pigmentos nas culturas, com destaque para as CCS em meio C4 que apresentaram uma produção de betalaínas de $4,10 \pm 0,47$ mg/100 mL. Desta forma, as CCS mantidas em meio C4 foram consideradas as mais adequadas para a produção de betalaínas em larga escala, considerando a grande produção de biomassa e o alto rendimento obtidos.

Parte dos resultados deste capítulo constituem o artigo “Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable”, publicado no periódico Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.122, p.341-350, 2015.

4.5 Conclusões

Diante dos resultados alcançados neste estudo, é possível concluir que:

- O fitorregulador Picloram mostrou-se o mais eficiente na indução da calogênese a partir de plântulas axênicas mantidas em meio MS0;
- O cultivo de explantes hipocotiledonares em meio MS suplementado com Picloram propiciou uma alta produção de biomassa, com proliferação de calos friáveis e pigmentados;
- Os pigmentos acumulados nas culturas de *P. aculeata* podem ser inseridos na classe das betalaínas, considerando a restrição taxonômica e a maior estabilidade destas substâncias em resposta a variações de pH;
- A redução da concentração de nitrogênio total associado a uma menor relação amônio/nitrato favoreceu o acúmulo de biomassa tanto nas culturas de calos como nas suspensões celulares;
- Culturas de células em suspensão foram iniciadas com pequena quantidade de inóculo, apresentando resultados superiores de proliferação celular e produção de betalaínas em relação às culturas de calos;
- Em todos os sistemas biotecnológicos avaliados a quantidade de betaxantinas acumulada foi superior à taxa de betacianinas, apesar da coloração rosada e vinácea apresentada pelas culturas de calos e de células em suspensão, respectivamente.
- Elevado rendimento de betalaínas foi alcançado nas CCS mantidas em meio MS com 30 mM de nitrogênio e proporção amônio/nitrato de 1:4 suplementadas com 10 µM de Picloram;
- Este estudo aponta para alto potencial biotecnológico da espécie *P. aculeata*, uma vez que a produção de betalaínas em escala comercial é de grande importância econômica e farmacológica.

5 ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE *Pereskia aculeata* MILL. CULTIVADA *IN VIVO*, *IN VITRO* E *EX VITRO*

5.1 Introdução

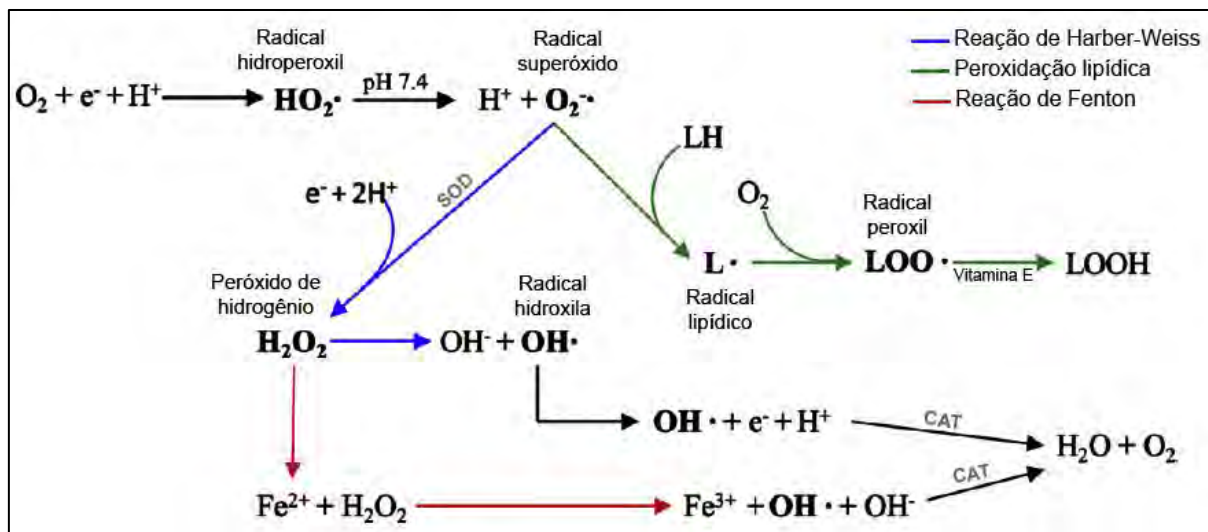
Há 2,4 bilhões de anos, a atividade fotossintética de cianobactérias permitiu a liberação e o acúmulo de gás oxigênio na atmosfera da Terra. Neste momento, os primeiros organismos que responderam a esta mudança no ambiente, apenas conseguiram tolerar o oxigênio, porém mais tarde, as células passaram a utilizar este gás no seu metabolismo e assim tornaram-se capazes de obter mais energia a partir dos nutrientes absorvidos (SCHOPF, 1978). Contudo, embora o oxigênio seja indispensável à produção de energia metabólica na maioria dos eucariotos, este atua como um importante fator de risco para a vida. Segundo DiGiuseppe e Fridovich (1984), inicialmente a toxicidade do oxigênio foi atribuída à inativação de enzimas, depois esta passou a ser resultado da formação de peróxido de hidrogênio e, somente mais tarde, concluiu-se que os efeitos tóxicos do oxigênio estão diretamente relacionados às suas formas reativas, conhecidas como radicais livres.

Os radicais livres são caracterizados como substâncias químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, o que faz com que estas moléculas sejam muito agressivas, uma vez que tendem a reagir com outras moléculas a fim de estabilizar sua configuração eletrônica (HALLIWELL, 2011). De acordo com o grupo funcional da molécula, os radicais livres são classificados principalmente em espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais são produzidas durante o metabolismo celular normal ou alterado (EREJUWA, 2012).

Diferentes fatores podem contribuir para uma maior formação de ERO na célula. Dentre as fontes endógenas de agentes oxidantes pode-se destacar a respiração aeróbica, na qual o oxigênio é reduzido na mitocôndria a superóxido; a ação fagocitária sobre células infectadas por vírus e bactérias, gerando um estresse oxidativo de óxido nítrico (NO), O_2^- , H_2O_2 e $OC1^-$ (ZUGHAIER et al., 2005); os peroxissomos, organelas que atuam na degradação de ácidos graxos, produzindo H_2O_2 , que é degradado pela enzima catalase; ou pela ativação das enzimas tipo citocromo P450, que nos animais agem na biotransformação de xenobióticos, porém com produção de agentes oxidantes que provocam lesões no DNA (RITTLE; GREEN, 2010). Como fontes externas de oxidantes destacam-se os óxidos de nitrogênio, presentes no cigarro, causando oxidação de macromoléculas e redução dos níveis de antioxidantes (LIU et al., 2012); os sais de ferro e cobre em excesso, que promovem a formação de radicais peróxidos na reação de Fenton Harber-Weiss (JOMOVA et al., 2012); e

certos compostos fenólicos ingeridos na alimentação, que podem levar à formação de oxidantes devido ao ciclo redox (PERRON et al., 2011). A Figura 34 ilustra as principais reações que levam a formação de ERO.

Figura 34 - Reações de produção de radicais livres na célula.



Legenda: SOD- Enzima superóxido dismutase; CAT- Enzima catalase.

Fonte: Adaptado de Ferreira e colaboradores, 2009 e Flora, 2009.

Ao longo da evolução, diversas substâncias antioxidantes foram sintetizadas ou obtidas pelos organismos a fim de reduzir ou retardar a produção de radicais livres, evitando a ocorrência de danos celulares (ANGAJI et al., 2012). Antioxidantes enzimáticos como a as enzimas superóxido desmutase, catalase e glutathiona peroxidase, podem ter a sua expressão induzida ou sua atividade inibida ou ativada, sendo por isso, consideradas agentes antioxidantes mais vantajosos (HARRIS, 1992). Já os antioxidantes de baixo peso molecular incluem vitaminas (C, A e E) e substâncias de origem vegetal como polifenóis, flavonoides, carotenoides e antocianinas, que atuam gerando substâncias menos nocivas à célula (BANDYOPADHYAY et al., 1999; CHIHUAILAF et al., 2002).

Neste sentido, Gach e colaboradores (2015) relatam que distúrbios no equilíbrio redox que induzem danos oxidativos estão relacionados com o desenvolvimento da maioria das patologias, incluindo o câncer. Estudos mostram que o aumento na produção de ERO e o estresse oxidativo são capazes de provocar modificações em lipídios, proteínas e DNA, aumentar a ocorrência de mutações e propiciar a formação de células tumorais, podendo levar à morte celular por apoptose (VALKO et al., 2007; VISCONTI; GRIECO, 2009; REUTER et al., 2010).

Antioxidantes naturais são obtidos facilmente de fontes na agricultura e horticultura (beterraba, cenoura, frutas cítricas e vermelhas, dentre outras), ou a partir de plantas medicinais, como sálvia, alecrim e outras (MATKOWSKI, 2008). Entretanto, apesar da grande disponibilidade e do rápido acesso a estas plantas, a produção de substâncias de interesse a partir de métodos biotecnológicos, tem sido amplamente empregada para espécies raras e/ou ameaçadas, de difícil cultivo, para compostos de alto valor econômico, e que apresentam um baixo rendimento na planta de campo (VERPOORTE et al., 2002). Neste contexto, uma vez que as células cultivadas *in vitro* são capazes de sintetizar, acumular e, em alguns casos, secretar metabólitos especiais, diferentes técnicas têm sido empregadas na produção de substâncias antioxidantes, seja a partir da cultura de calos (ANTOIGNONI et al., 2007; TADHANI et al., 2007), de células em suspensão (CHENG et al., 2005; VOGELSANG et al., 2006) e de raízes transformadas (*hairy roots*) (KUMAR et al., 2005; LEE et al., 2007).

Espécies da família Cactaceae são ricas em pectina, carotenos, betalaínas, ácido ascórbico e flavonoides, como o kaempferol e a quercetina, substâncias que apresentam alto potencial antioxidante (HARLEV et al., 2013). Deste modo, uma vez verificada a baixa incidência de neoplasias em nativos americanos que utilizavam cactáceas na alimentação (KAY, 1996; CORNETT, 2000), estudos sugerem a incorporação de derivados de cactos na dieta regular da população, principalmente nos grupos considerados de alto risco de desenvolvimento de câncer (ZOU et al., 2005).

Frutos produzidos pelas espécies do gênero *Opuntia*, conhecidos como pera espinhosa ou figo de cacto, são ricos em vitamina C e seu consumo regular afeta positivamente o balanço redox celular, reduzindo o dano oxidativo aos lipídios e favorecendo a condição antioxidante do organismo (SHETTY et al., 2011). Já em espécies do gênero *Pereskia*, a atividade antioxidante tem sido observada a partir de extratos foliares obtidos de *P. bleo* (SIM et al., 2010), *P. grandifolia* (ADIB et al., 2010).

Adicionalmente, algumas espécies de Cactaceae também já apresentaram resultados positivos na avaliação do potencial antitumoral. Extratos de *Pereskia grandifolia* (SRI NURESTRI et al., 2009; LIEW et al., 2012) e *P. bleo* (SRI NURESTRI et al., 2008; MALEK et al., 2009) exibiram atividade citotóxica frente a diversas linhagens tumorais, enquanto a indução de apoptose em diferentes células neoplásicas tem sido verificada a partir do tratamento com extratos de *Opuntia ficus-indica* (ZOU et al., 2005; SREEKANTH et al., 2007; FEUGANG et al., 2010), *O. humifusa* (HAHM et al., 2010; LEE et al., 2012) e *Pereskia bleo* (TAN et al., 2005; ER et al., 2007)

Pereskia aculeata é uma Cactaceae nativa caracterizada como uma hortaliça não

convencional, uma vez que possui folhas com alto teor nutritivo, sendo por isso, sugerida como uma alternativa simples e de baixo custo, para melhoria da qualidade da alimentação da população (BRASIL, 2010). Estudos de Mercê e colaboradores (2001) e Silva-Júnior (2008) apontam que o elevado conteúdo de fibras e arabinogalactanos torna a espécie economicamente importante como fonte alimentar. Além disso, seus frutos são ricos em polifenóis e carotenoides com atividade antioxidante e pró-vitamina A, como o β -caroteno (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

Atualmente, a utilização de *P. aculeata* está restrita a populações locais, com destaque para o estado de Minas Gerais, onde na cidade de Diamantina, por exemplo, estima-se que 77% da população consuma regularmente este vegetal (DIAS et al., 2005). Neste contexto, considerando a importância de estudos etnofarmacológicos na avaliação das propriedades medicinais e nutracêuticas de espécies vegetais, bem como a importância da biotecnologia na otimização da produção de metabólitos de interesse, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e antitumoral de *P. aculeata*, além de realizar uma caracterização do perfil fitoquímico dos extratos de obtidos de plantas cultivadas *in vivo*, *in vitro* e *ex vitro*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material botânico

Amostras de órgãos, tecidos e células de *Pereskia aculeata* cultivada a campo e em diferentes sistemas biotecnológicos foram avaliadas quanto à ação antioxidante e antitumoral *in vitro*. Folhas e segmentos caulinares foram obtidos a partir de plantas de campo adultas e plantas aclimatizadas com três meses de cultivo. As plantas de campo foram fornecidas pelo Sítio Flora Bioativas (Porto Belo - SC) e uma amostra encontra-se depositada no herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob o registro HRJ 11849. As plantas aclimatizadas foram micropropagadas em meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo a citocinina BA (benzilaminopurina), enraizadas sem fitorreguladores e mantidas em casa de vegetação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 35 A e B).

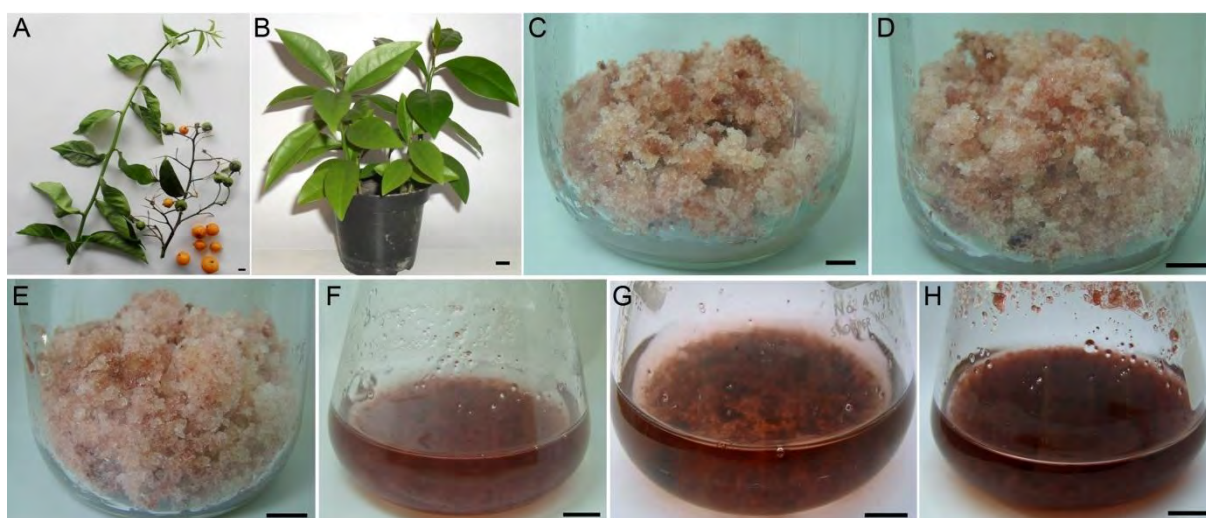
O material *in vitro* foi obtido a partir das culturas de calos e de células em suspensão (CCS) produtoras de betalainas, mantidas em meios de cultura MS, contendo diferentes concentrações salínicas e suplementados com o fitorregulador Picloram, sendo caracterizados como meios C, C4 e C8 (Tabela 15) (Figura 35 C - H).

Tabela 15 - Composição dos diferentes meios nutritivos utilizados na cultura

de calos e de células em suspensão de *P. aculeata*.

Meios de cultura	Composição básica	Nitrogênio total	NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	Picloram (μM)
C	MS ½	30 mM	1 : 2	10
C4	MS	30 mM	1 : 4	10
C8	MS	30 mM	1 : 8	10

Figura 35 - *Pereskia aculeata* cultivada *in vivo*, *in vitro* e *ex vitro*.



Legenda: A- Planta de campo; B- Planta aclimatizada; C- Calos cultivados em meio C; D- Calos cultivados em meio C4; E- Calos cultivados em meio C8; F- CCS em meio C; G- CCS em meio C4; H- CCS em meio C8. Barras=1cm.

5.2.2 Preparo dos extratos metanólicos

Folhas e segmentos caulinares obtidos de plantas de campo e aclimatizadas, assim como os calos e células em suspensão produzidos *in vitro*, foram pesados e secos em estufa a 40°C, até peso constante, para obtenção dos pesos de matéria fresca e seca das amostras. Em seguida, o material foi triturado ou macerado e submetido à extração com álcool metílico (Merck) a 26±2°C, no escuro, sob agitação constante, durante 14 dias. Os extratos obtidos foram filtrados em papel Whatman (nº1), concentrados sob pressão reduzida a 40°C e secos a vácuo em evaporador rotativo até peso constante. Os extratos brutos secos foram mantidos a 10°C, no escuro até a realização dos ensaios.

Para realização do ensaio de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), as amostras foram diluídas em metanol, enquanto para o teste da atividade quelante de ferro II, a diluição dos extratos ocorreu em álcool etílico (Merck). Em todos os demais testes, os extratos secos foram dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido) e estocados na concentração

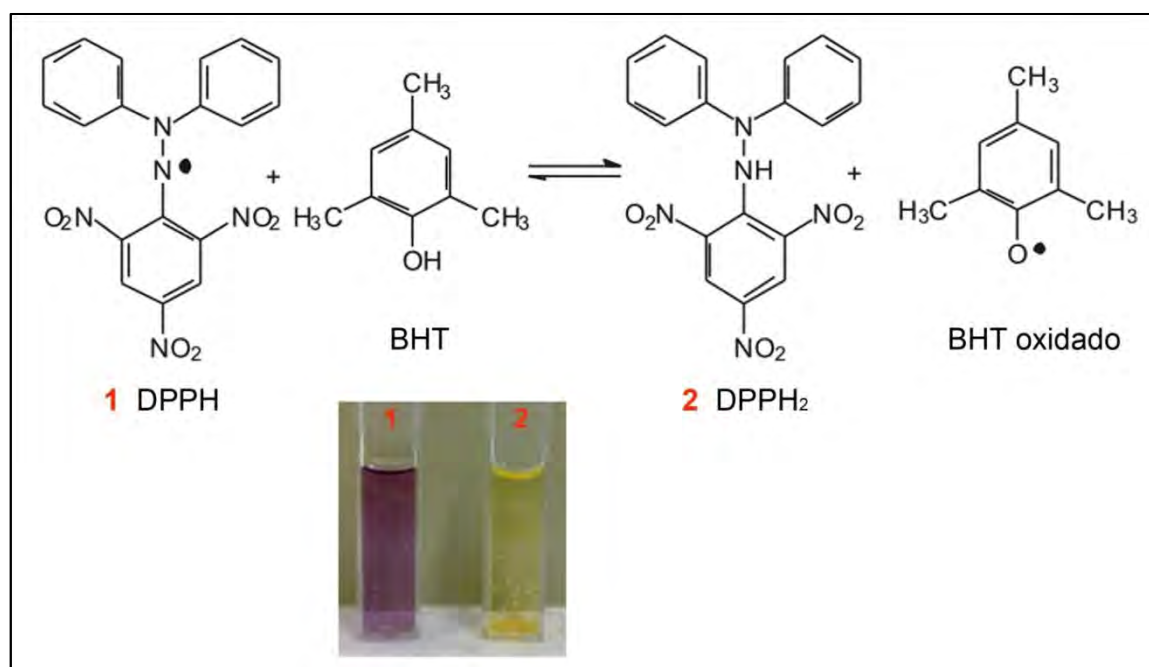
de 100 mg.mL^{-1} , a 10°C e no escuro. A diluição das amostras foi conduzida no momento da realização de cada experimento. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) e no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

5.2.3 Determinação da atividade antioxidante

5.2.3.1 Avaliação da capacidade de captura do radical DPPH

Esta atividade foi avaliada nas diferentes amostras pelo método proposto por Brand-Williams e colaboradores (1995). O DPPH^\bullet é um radical estável, de coloração violeta, que absorve luz em comprimento de onda de 515 nm . Neste ensaio, a presença de substâncias antioxidantes leva à captura do DPPH^\bullet , que reduzido a DPPH-H (2,2-difenilpicril-hidrazina), adquire coloração amarela, provocando uma redução da absorvância em 515 nm (Figura 36).

Figura 36 - Reação de oxirredução entre o antioxidante BHT (di-terc-butil metil fenol) e o radical DPPH.



Legenda: Adaptado de Oliveira e colaboradores, 2009.

Em microtubos do tipo Eppendorf, $500 \mu\text{L}$ de extratos ou amostra padrão em diferentes concentrações ($1, 10, 50, 100, 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram misturados a $500 \mu\text{L}$ de solução de DPPH ($2,4 \text{ mg}/100 \text{ mL}$). O branco da reação foi preparado a partir de metanol em substituição aos extratos. Após 30 min de incubação a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, a absorvância das

amostras foi medida em espectrofotômetro em comprimento de 515 nm. Os antioxidantes BHT (di-terc-butil metil fenol) e ácido ascórbico foram utilizados como substâncias antioxidantes de referência (amostra padrão).

A atividade antioxidante dos diferentes extratos foi expressa como porcentagem de captura do radical DPPH, a qual foi calculada pela seguinte equação (LUO et al., 2010):

$$\text{Captura do radical DPPH (\%)} = \frac{[1-(A1-A2)] \times 100}{A0}$$

Onde:

A0 = Absorvância do branco

A1 = Absorvância da amostra com DPPH

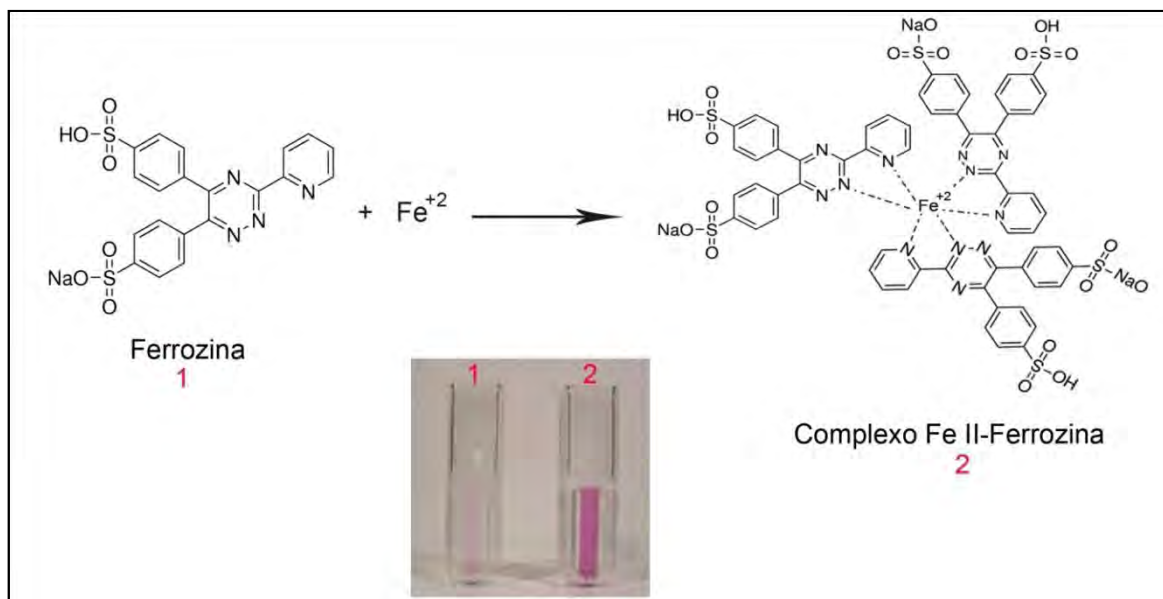
A2 = Absorvância da amostra sem DPPH

5.2.3.2 Avaliação da capacidade quelante de ferro (II)

Esta atividade dos extratos foi avaliada utilizando o método colorimétrico descrito por Decker e Welch (1990), conhecido como ensaio de Ferrozina. Neste teste, o reagente cromogênico ferrozina [3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina] irá formar um complexo com o íon Fe^{+2} livre gerando um produto de coloração rosa (Figura 37). Sem a presença desse íon, a coloração torna-se mais fraca, sendo possível avaliar a atividade quelante de ferro II de um determinado composto.

Em microplaca de 96 poços, 100 μL das amostras em diferentes concentrações (1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram incubados a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, com 150 μL de FeCl_2 (cloreto ferroso) a 2 mM, o qual irá disponibilizar Fe^{+2} livre para a reação, seguido por adição de 10 μL do reagente ferrozina (5 mM) e incubação durante 10 min, no escuro. Os brancos das amostras foram realizados substituindo a ferrozina por 10 μL de água ultrapura (MilliQ[®]), enquanto a reação controle consistiu da adição de 100 μL de água ultrapura (MilliQ[®]) ao invés da amostra. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro de microplaca a 562 nm. Por sua capacidade quelante de ferro, a quercetina foi utilizada neste experimento como substância de referência.

Figura 37 - Atividade quelante do reagente ferrozina [3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina] com o ferro II.



Legenda: Adaptado de <http://www.lookfordiagnosis.com>. Acesso em janeiro de 2015.

A atividade antioxidante das amostras foi expressa como uma porcentagem da habilidade quelante de ferro II, a qual foi calculada pela equação (WANG et al., 2009):

$$\text{Habilidade quelante de Fe}^{+2} (\%) = \frac{[A0 - (A1 - A2)] \times 100}{A0}$$

Onde:

A0 = Absorvância do controle (sem extrato)

A1 = Absorvância da amostra com ferrozina

A2 = Absorvância da amostra sem ferrozina (branco)

5.2.3.3 Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) por citometria de fluxo

Este ensaio foi realizado com células da linhagem macrofágica murina (RAW 264.7), gentilmente doadas pelo Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular, Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, da UERJ, as quais se encontram criopreservadas em nitrogênio líquido (-196 °C) no Departamento de Bioquímica. Após descongelamento, as células foram expandidas a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂, em garrafas para cultura (50 mL) contendo 5 mL de meio DMEN (Meio Eagle Modificado por Dulbecco) adicionado de 10% de SFB (soro fetal bovino), 15 mM HEPES (*N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico), 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina. Após

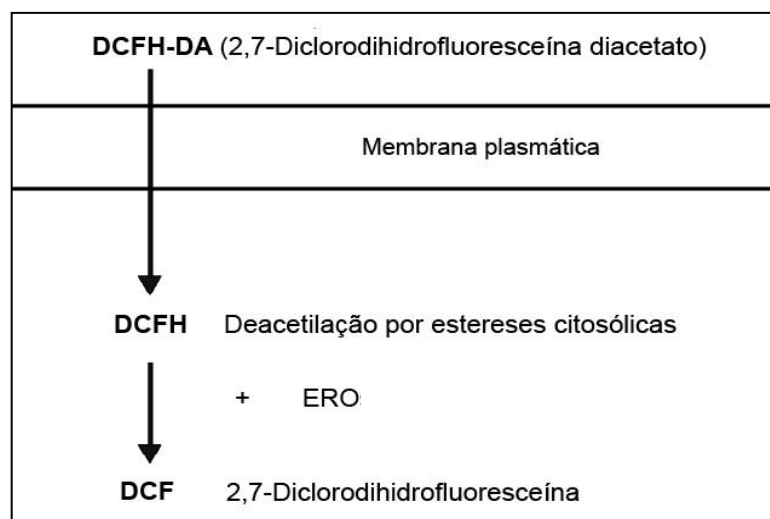
descongelamento, as células foram expandidas, utilizando-se de leve raspagem da garrafa para soltar as células, e colocados novamente em cultura em concentrações mais diluídas. A contagem de células viáveis foi realizada a partir da microscopia ótica de contraste de fase. As células foram utilizadas nos experimentos após três passagens sucessivas.

O experimento para avaliação das ERO intracelulares consistiu em incubar as células RAW 264.7 ($5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$) em placas de 6 poços (3 mL) por 24 h, a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 , para adesão. Posteriormente, as células foram estimuladas com $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) e tratadas por 24 h, a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 , com a amostra que apresentou maior atividade antioxidante nos ensaios anteriores, nas concentrações de 50 e $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A cultura de células com quercetina foi utilizada como cultura controle de ação antioxidante.

Após a incubação das células com as amostras, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino PBS (140 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 8 mM Na_2HPO_4 + 1,5 mM KH_2PO_4) aquecido e incubadas com 10 μL de sonda fluorescente DCFH-DA a $5 \mu\text{M}$, por 30 min no escuro. Em seguida, as células foram centrifugadas por 3 min a $400 \times g$, ressuspensas em $400 \mu\text{L}$ de PBS e levadas ao citômetro de fluxo para a aquisição dos dados (50.000 eventos/amostra). A concentração intracelular de ERO nos macrófagos foi determinada por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA (2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato), conforme descrito por Tiwari e colaboradores (2010).

Neste ensaio, a sonda DCFH-DA, devido ao seu caráter apolar, difunde-se pela membrana plasmática. Dentro da célula, o grupo diacetato é hidrolisado gerando moléculas de DFCH polares, as quais reagem com as ERO tornando-se fluorescentes (Figura 38). A fluorescência da sonda foi detectada no canal FL-1. Os resultados foram analisados pelo programa Summit Versão 4.3, apresentados na forma de histogramas e expressos como a mediana da intensidade de fluorescência (MIF).

Figura 38 - Mecanismo de ação da sonda DCFH-DA para determinação de ERO.



Fonte: Adaptado de Silveira, 2004.

5.2.3.4 Avaliação da produção de óxido nítrico

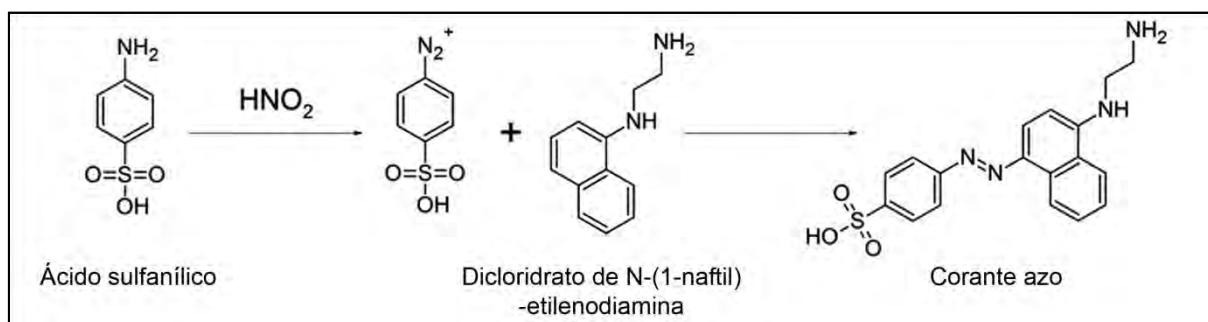
A fim de avaliar a atividade das amostras sobre as espécies ativas do nitrogênio, foi realizado o ensaio para dosagem da produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos murinos RAW 264.7. A dosagem do NO foi realizada por meio indireto, a partir da quantificação de nitrito (NO_2^-), um dos produtos de degradação primária, mais estável e não volátil do NO (GREEN et al., 1982), por reação de diazotização (GRIESS, 1879). Vale destacar que o NO é um importante mediador da resposta inflamatória, neuronal e cardiovascular.

Células RAW 264.7 viáveis (5×10^5 células/mL), determinadas por microscopia ótica de contraste de fase, foram incubadas em microplaca de 96 poços (100 μL) durante 24h para adesão. Posteriormente, adicionou-se em cada poço, 50 μL de LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 50 μL de amostra, em diferentes concentrações (1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Para cada experimento, foram realizadas culturas de células somente em meio de cultura (células não estimuladas), na presença de LPS (células estimuladas) e o branco do ensaio colorimétrico, sem células, contendo apenas o meio de cultura. Adicionalmente, foram realizados ensaios das amostras em meio de cultura sem células (branco das amostras), a fim de verificar a influência da coloração das amostras no comprimento de onda de leitura do ensaio.

Após 24h de incubação, 100 μL do sobrenadante foi transferido para outra microplaca, onde foi adicionado 50 μL de ácido sulfanílico, que permaneceu reagindo, a temperatura ambiente, durante 10 min no escuro. Durante este período, o ácido sulfanílico irá reagir com o nitrito presente no sobrenadante, formando um sal diazônico. Em seguida, adicionou-se 50 μL

de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, sendo também mantido por 10 min a temperatura ambiente, no escuro, onde na reação com o sal diazônico irá formar um produto de coloração rosada, o qual será quantificado em espectrofotômetro de microplaca a 550 nm (Figura 39). A quantidade de NO presente no sobrenadante das culturas com as diferentes amostras foi expressa em porcentagem, em relação às células estimuladas pelo LPS (controle), que foi considerada como 100% de produção de NO.

Figura 39 - Reação de Griess utilizada para a dosagem da produção de nitrito.



Fonte: <http://commons.wikimedia.org/>. Acesso em janeiro de 2015.

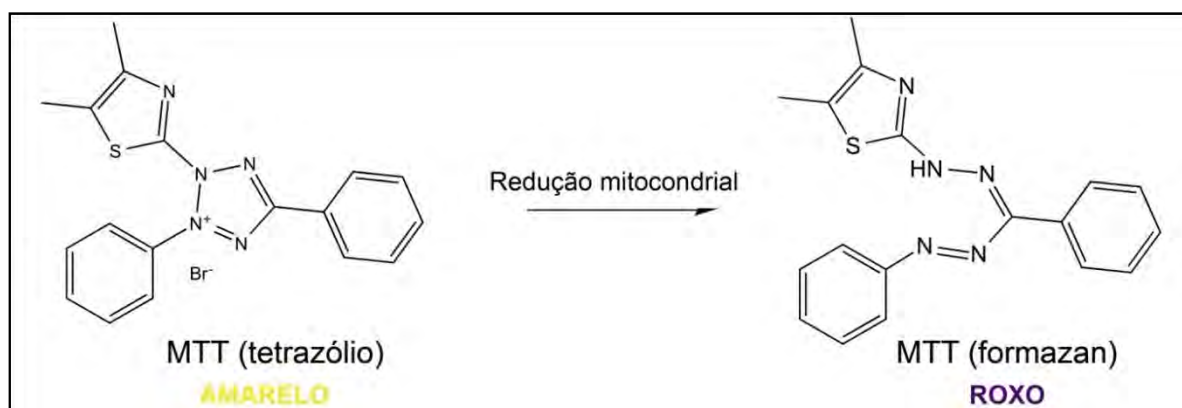
5.2.3.5 Avaliação da atividade citotóxica

Para verificar se a inibição da produção de NO não estaria ocorrendo pela morte dos macrófagos, a viabilidade celular foi avaliada a partir do ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), proposto por Mosmann (1983). O MTT consiste em um sal tetrazólico, de coloração amarela, que ao ser reduzido pelas desidrogenases mitocondriais, forma cristais de formazan, de coloração roxa (Figura 40). Assim, a quantidade de formazan, mensurada por espectrofotometria, é proporcional ao número de células viáveis, desde que as coenzimas no estado reduzido, necessárias para a reação de redução do MTT, não são adicionadas ao ensaio, sendo provenientes, portanto, do metabolismo celular.

Desta forma, utilizando a mesma cultura para dosagem de NO, após retirada do volume de sobrenadante para dosagem do mesmo, 10 µL de solução de MTT (5 mg.mL⁻¹ em PBS) foram adicionados aos 100 µL restantes de cultura na placa, contendo os macrófagos. A placa foi incubada em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e atmosfera úmida por 40 min. Em seguida, a solubilização do produto formazan foi realizada por adição de 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% acrescido de HCl (ácido clorídrico) a 0,01 N (v/v). Após 24 h a 37°C, a quantificação do formazan foi realizada através da leitura da absorvância em

espectrofotômetro de microplaca a 570 nm.

Figura 40 -: Princípio do ensaio de citotoxicidade utilizando o reagente MTT.



Fonte: Adaptado de Ebada e colaboradores, 2008.

A viabilidade pelo MTT também verificada em culturas de células RAW 264.7 tratadas com as diferentes concentrações finais usadas de DMSO, para descartar qualquer efeito citotóxico do mesmo. A viabilidade das células está expressa como porcentagem de atividade redutora mitocondrial (ARM), em relação à cultura de células estimuladas com LPS sem amostras, considerada como 100%. Adicionalmente, foram realizados os brancos de cada extrato (extrato mais meio de cultura) a fim de verificar a ação redutora dos mesmos sobre o MTT e/ou a influência da coloração dos extratos na leitura da absorvância a 570 nm.

5.2.4 Determinação o potencial antitumoral

5.2.4.1 Linhagens celulares e cultivo

Para avaliar o potencial antitumoral *in vitro* dos extratos, foram utilizadas linhagens celulares oriundas de tumores sólidos como câncer de próstata (PC3), câncer de mama (MCF-7) e câncer de pulmão (A549) e leucemias, como a linhagem leucêmica linfocítica aguda (Jurkat) e mielóide crônica (K562). Todas as linhagens foram compradas do Banco de células do Rio de Janeiro e encontram-se mantidas criopreservadas no Departamento de Bioquímica da UERJ. Após descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas de cultura contendo 5 mL de meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina. Para expansão das linhagens celulares, as células aderentes eram soltas da garrafa por tratamento com

tripsina a 0,25% contendo EDTA (0,53 mM), e plaqueadas em novas garrafas. As células eram utilizadas para experimentos após 3 passagens consecutivas.

5.2.4.2 Avaliação da atividade citotóxica

A citotoxicidade das amostras vegetais sobre as linhagens tumorais foi avaliada pela viabilidade celular determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT (MOSSMAN, 1983), cujo fundamento foi descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços, com volume final de 100 μL , e concentração celular final de $5 \times 10^4/\text{mL}$. As células tumorais foram adicionadas em 50 μL e as amostras vegetais em 50 μL para diferentes concentrações finais. A incubação foi de 72 h a 37°C, com atmosfera úmida de 5% de CO_2 . As células aderentes eram plaqueadas e deixadas para aderir por 24h antes de colocar as amostras vegetais. Em seguida, foram adicionados 10 μL de solução de MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em PBS) e após incubação a 37°C, com atmosfera úmida de 5% de CO_2 por duas horas, os cristais de formazan foram solubilizados com 100 μL de SDS (10%) contendo HCl a 0,01 N (v/v), incubando-se por 24h a 37°C. A atividade redutora mitocondrial (ARM) das células viáveis é diretamente proporcional à viabilidade celular e à absorvância determinada em espectrofotômetro de microplaca a 570 nm.

Inicialmente, a fim de selecionar as amostras mais ativas sobre as diferentes linhagens tumorais, os extratos foram testados em apenas duas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Posteriormente, as linhagens tumorais mais sensíveis foram selecionadas e os extratos mais ativos testados em diferentes concentrações (1, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para o cálculo do IC_{50} (concentração da amostra necessária para reduzir em 50 % a viabilidade das células). Para cada experimento foi realizada uma cultura controle, contendo apenas células em meio de cultura, e um branco do ensaio colorimétrico, contendo apenas meio de cultura (sem células). Os resultados dos efeitos das diferentes concentrações das amostras sobre o ensaio com MTT sem células já foram avaliados quando se estudou os efeitos dos mesmos na citotoxicidade sobre macrófagos RAW 264.7. A viabilidade das células está expressa como porcentagem, em relação à cultura de células estimuladas com LPS sem amostras, considerada como 100%.

5.2.5 Determinação da atividade citotóxica em células mononucleares

Para avaliar o efeito dos extratos na viabilidade destas células realizamos o ensaio de

citotoxicidade pelo método do MTT (MOSSMAN, 1983). Neste experimento, células mononucleares humanas foram isoladas a partir do sangue periférico humano de doadores voluntários, coletados em tubos a vácuo, já comprados contendo anticoagulante.

Após a transferência do sangue coletado para tubos de centrifuga de 15 mL (Falcon), estes foram centrifugados a 400x g, entre 18 - 20° C, durante 20 min. Em seguida, após remoção e descarte do plasma, a camada rica em leucócitos (entre o plasma e as hemácias) foi removida e suspensa em meio RPMI 1640 diluído (2x) em tampão fosfato-salino PBS, contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético) na concentração final de 2 mM (meio diluído), numa proporção de 1 parte de células para duas de meio diluído. Para isolamento das células mononucleares dos outros leucócitos (maioria neutrófilos) e das hemácias, colocou-se 3 mL de Ficol-Hipaque gelado/tubo falcon de 15 mL, e posteriormente adicionou-se, lentamente, pela parede, a suspensão de células ricas em leucócitos, porém contendo ainda muitas hemácias (5 mL/tubo), de maneira a se formar duas camadas, a superior contendo a solução celular e a inferior, contendo a solução de Ficoll-Hipaque. Os tubos foram centrifugados a 400x g, por 30 min., entre 18-20°C. Posteriormente, a camada intermediária, rica em células mononucleares, foi removida e lavada 2-3 vezes com 10 mL de meio diluído (centrifugação por 3 min a 400 x g, suspensão em meio diluído e nova centrifugação por 3 min a 400 x g) e finalmente suspensa em 3 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, 2 mM de glutamina e 0,5% de β-mercaptoetanol.

As células mononucleares (1×10^6 células/mL) foram adicionadas (100 µL) à microplaca de 96 poços, estimuladas com 50 µL de PHA (fitohemaglutinina) para concentração final de 2,5 µg/mL e tratadas com 50 µL dos extratos que apresentaram maior citotoxicidade sobre as células tumorais, para diferentes concentrações finais (1, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL). O volume final na placa de cultura foi de 200 µL. Após 72 h em estufa a 37 °C, com 5 % de CO₂, sob atmosfera úmida, a viabilidade das células foi avaliada a partir da adição de 10 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹) e incubação por 2 h a 37 °C, com 5 % de CO₂. Os cristais de formazam foram dissolvidos com 100 µL de SDS contendo HCl a 0,01 N(v/v), após 24 h a 37°C, e a leitura da absorvância determinada em espectrofotômetro de microplaca, a 570 nm. A ação tóxica dos extratos sobre as células mononucleares foi determinada em porcentagem, em relação às células estimuladas com PHA na ausência das amostras, considerada como 100%.

Para cada experimento foram realizadas uma cultura de células não estimuladas (sem PHA), uma de células estimuladas (com PHA) sem amostras vegetais (controle positivo de proliferação) e um branco do ensaio colorimétrico, contendo apenas meio de cultura (sem

células). O branco das amostras (sem células) já foram determinados em outros ensaios citotoxicidade utilizando o MTT.

5.2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste One-way ANOVA e a significância das diferenças entre os grupos testados foi avaliada pelo teste de Tukey, considerando significantes as diferenças $\text{comp} \leq 0,05$. Para o cálculo do IC_{50} , nos ensaios de citotoxicidade, os dados do eixo x foram transformados em log e posteriormente realizou-se uma análise de regressão não linear dos dados. Todas as análises foram conduzidas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

5.2.7 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência, detecção por UV acoplada e espectrometria de massas com ionização por electrospray (CLAE-UV-EM-IES)

Os extratos metanólicos foram submetidos a uma análise prévia em cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodo (Ultimate 3000 Dionex), em coluna thermo-scientific RP18 (250 mm x 4,6mm com partícula de 5 Å), a fim de estabelecer uma condição de separação cromatográfica. A fase móvel consistiu de gradiente do tipo rampa e teve início com 95 % de água ultrapura (MilliQ[®]) acidificada com ácido acético glacial, a temperatura de 25 °C, pH 3,5 (Sigma-Aldrich) e 5% de acetonitrila (Tedia[®]) (0 - 50 min), 0% de água ultrapura acidificada e 100% de acetonitrila (50 - 60 min) e, ao fim dos 64,3 min., foi restabelecida a condição inicial.

Para as análises por CLAE-UV-EM-IES o equipamento utilizado foi um UPLC (ultra) Shimadzu composto por um desgaseificador (DEU20AS), duas bombas (LC20AD), injetor automático (SIL20AC), detector de UV de comprimento de onda fixo (SPD20A), forno (CTO20A) e interface (CSM20A). As amostras foram separadas utilizando uma coluna thermo-scientific RP18 (250 mm x 4,6mm com partícula de 5 Å). A eluição da fase móvel foi por gradiente do tipo rampa e teve início com 98 % de água ultrapura (MilliQ[®]) acidificada com ácido acético glacial, pH 3,5 (Sigma-Aldrich) e 2% de acetonitrila (Tedia[®]) (0 - 130 min), 0% de água ultrapura acidificada e 100% de acetonitrila (130 - 140 min) e, ao fim dos 147 min., foi restabelecida a condição inicial. Após passagem pelo detector de UV com lâmpada fixa em 340 nm, a fase móvel seguiu para o detector do tipo espectrômetro de massas (MicroTOF) e foi gaseificada por ionização *electrospray* a uma temperatura de 200 °C, fluxo de 9 µL/min e pressão de 4 psi. Os espectros de massas foram obtidos em modo negativo no

intervalo massa/ carga (m/z) de 50 a 3000. O gás empregado durante a dessolvatação foi o nitrogênio a um fluxo de 400L/h, submetido à temperatura de 250 °C. A energia de ionização foi de 10 eV, com análise de varredura de massas (EM). Para a análise, os espectros de massas das amostras de *P. aculeata* foram comparados aos dados disponíveis na base MassBank (HORAI et al., 2010).

As análises em CLAE-UV-EM-IES foram realizadas em colaboração com a Central Analítica Fernanda Coutinho do Instituto de Química da UERJ sob a coordenação da Profa. Dra. Mônica Regina da Costa Marques.

5.3 Resultados

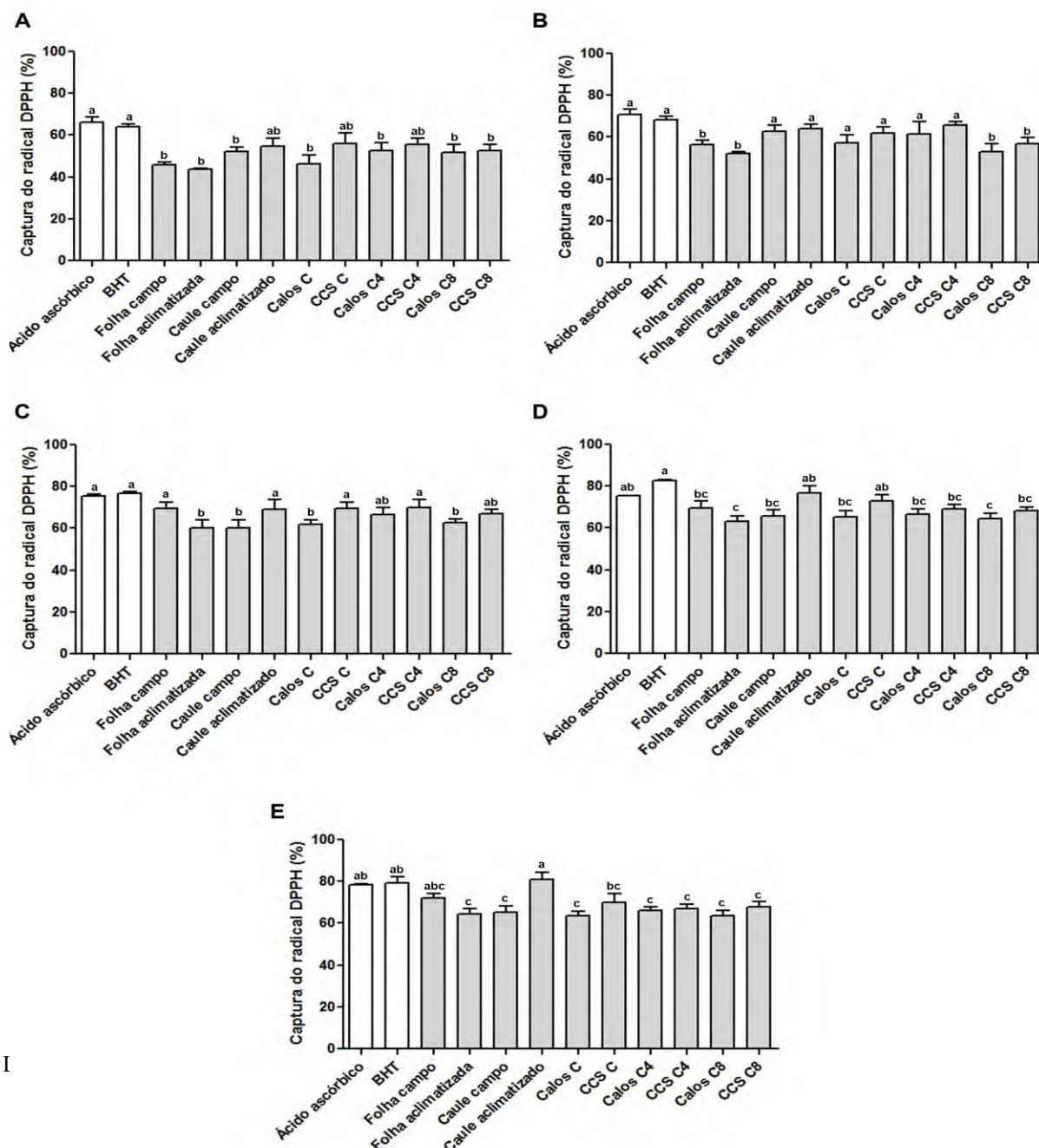
5.3.1 Avaliação da atividade antioxidante

5.3.1.1 Avaliação da capacidade de captura do radical DPPH

Esta atividade foi determinada com as amostras de *P. aculeata* nas concentrações de 1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figuras 41). Analisando os resultados obtidos pelas amostras produzidas a partir de tecidos organizados, pode-se verificar que o processo de propagação *in vitro* favoreceu o potencial antioxidante do caule de *P. aculeata*, uma vez que em todas as concentrações testadas (Figura 41 A-E), a amostra de caule aclimatizado não diferiu estatisticamente das amostras de referência (ácido ascórbico e BHT), as quais possuem alta ação antioxidante, o que não foi observado com o caule de campo. Por outro lado, as folhas cultivadas a campo apresentaram tendência de maior captura do radical DPPH nas concentrações maiores (Figuras 41 C-E), em relação à planta cultivada *ex vitro* (aclimatizada), embora a diferença só tenha sido significativa na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 41 C).

De modo geral, a cultura de tecidos vegetais não organizados (calos e CCS) não estimulou a produção de substâncias antioxidantes de *P. aculeata*, considerando que as porcentagens de captura do DPPH[•] observadas foram similares aos valores obtidos nos extratos de folhas aclimatizadas e caule de campo (Figura 41 A-E). Além disso, o tipo de sistema biotecnológico empregado neste trabalho não influenciou a ação de captura do radical DPPH da espécie estudada, uma vez que os extratos obtidos das culturas de calos e de células em suspensão apresentaram valores semelhantes de captura do radical DPPH, independente da concentração (Figura 41 A-E). Todavia, dentre estas amostras, o extrato produzido a partir da CCS em meio C (MS $\frac{1}{2}$, 1:2 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, 10 μM Picloram), destacou-se por apresentar valores superiores de captura do DPPH[•], em relação às demais culturas *in vitro*, sem diferença estatística dos valores alcançados pelo ácido ascórbico e BHT (Figura 41 A-E).

Figura 41 - Porcentagem de captura do radical DPPH em diferentes extratos metanólicos obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e culturas *in vitro* de *P. aculeata*.



I

Neste ensaio também verificou-se que o extrato caulinar de *P. aculeata*, obtido a partir de plantas aclimatizadas, apresentou os maiores valores de captura do radical DPPH na concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($81,14 \pm 3,32\%$), em relação às outras amostras de *P. aculeata* (Figura 41 E), porém sem diferença significativa das amostras de folhas de campo e das amostras referência (ácido ascórbico e BHT). Contudo, a ação antioxidante do extrato foliar de plantas cultivadas em campo a $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não se mostrou significativamente diferente de

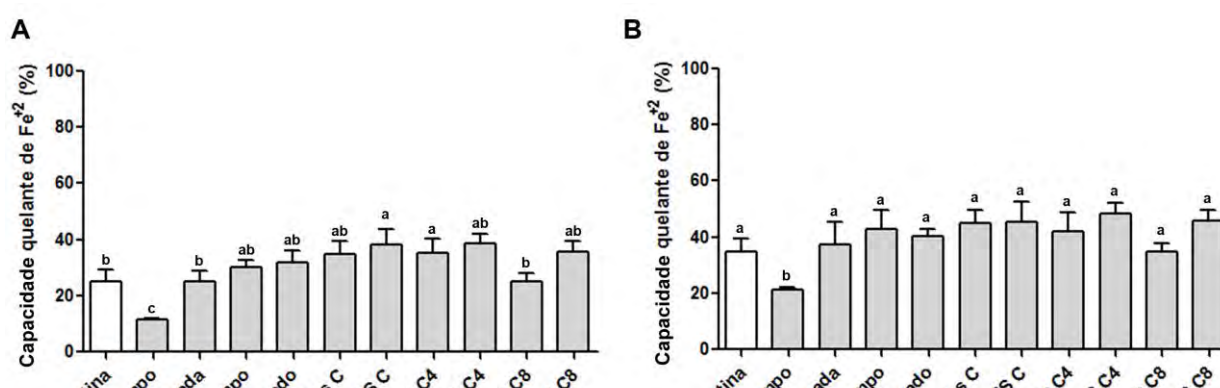
nenhuma outra amostra testada (Figura 41 E). Adicionalmente, foi possível observar que os extratos obtidos a partir da cultura *in vitro* (calos e CCS) alcançaram valores similares de captura do DPPH• com $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, independentemente da composição do meio de cultura (Figura 41 E).

Deste modo, utilizando o ensaio de captura do radical DPPH, foi possível observar que a espécie *P. aculeata* apresenta um elevado potencial antioxidante, uma vez que os valores obtidos a partir das diferentes amostras foram superiores a 50%, independente da fonte de material botânico e da concentração testada.

5.3.1.2 Avaliação da capacidade quelante de ferro (II)

Esta atividade foi determinada pelo ensaio da ferrozina com as amostras de *P. aculeata* nas concentrações de 1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figuras 42). Os diferentes sistemas biotecnológicos aplicados no cultivo *in vitro* de *P. aculeata* aumentaram a habilidade quelante de ferro II da espécie, uma vez que nas concentrações de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ os extratos produzidos a partir dos calos e das células em suspensão, independente do meio de cultura, mostraram ação quelante de ferro II superior à da folha cultivada *in vivo* (Figura 42 A - B). As culturas de células em suspensão em meio C e calos e culturas de células em suspensão cultivados em meio C8 também apresentaram ação quelante do ferro II maior do que o extrato de folha de campo nas concentrações maiores (Figuras 42 C - E). A única exceção foi observada no extrato de calos em meio C a partir de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o qual obteve os menores valores de todas as amostras testadas. Esses resultados também indicam que, de modo geral, as amostras obtidas das CCS alcançaram valores superiores em relação às amostras de calos, principalmente nas culturas mantidas nos meios C e C8, as quais não diferiram estatisticamente da amostra de referência (Figura 42).

Figura 42 - Capacidade quelante de ferro II nos diferentes extratos metanólicos obtidos a partir de plantas de campo, aclimatização e culturas *in vitro* de *P. aculeata*.



Legenda: A- Amostras a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; B- Amostras a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; C- Amostras a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; D- Amostras a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; E- Amostras a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos com triplicatas. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados também mostram que na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o extrato obtido a partir do caule de plantas aclimatizadas apresentou a maior capacidade quelante de Fe^{++} ($97 \pm 1,72 \%$), a qual foi estatisticamente diferente de todas as demais amostras, incluindo a quercetina (amostra antioxidante de referência) (Figura 42 E). Nesta mesma concentração, os extratos de caules de campo, CCS em meio C (MS $\frac{1}{2}$, 1:2 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, $10 \mu\text{M}$ Picloram), calos e CCS em meio C8 (MS, 1:8 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, $10 \mu\text{M}$ Picloram) também alcançaram elevados

valores relativos à capacidade quelante de ferro II, sem diferença significativa para a amostra de referência. Além disso, as amostras foliares e aquelas obtidas das culturas em meio C4 (MS, 1:4 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, 10 μM Picloram) não apresentaram diferença quanto à habilidade quelante de ferro II, enquanto o extrato de calo em meio C não alcançou um resultado satisfatório, com média inferior a 50 % (Figura 42 E).

Na análise geral dos resultados, foi possível verificar que a micropropagação da espécie favoreceu seu potencial antioxidante, pois na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ as amostras de caule aclimatizadas apresentaram maior capacidade quelante de Fe^{++} em relação às amostras obtidas de caule de campo (Figura 42 E). Adicionalmente, as amostras de caule aclimatizado apresentaram valores significativamente superiores aos da quercetina em todas as concentrações a partir de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 42 C, D e E).

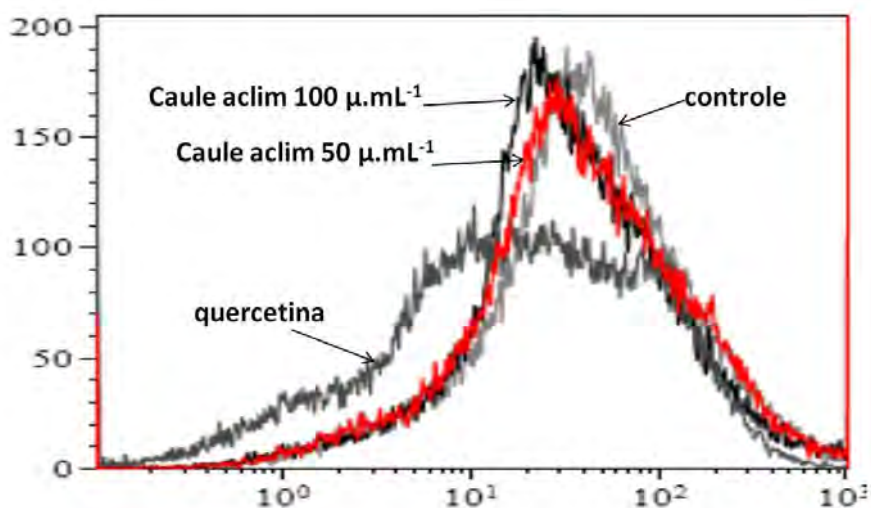
Neste sentido, pode-se observar que o cultivo *in vitro* de *P. aculeata*, seja a partir de culturas organizadas, como a micropropagação, ou de culturas não organizadas, como os calos e as suspensões celulares, permitiu um aumento significativo da capacidade quelante de ferro II da espécie, confirmando a importância da biotecnologia na produção de metabólitos secundários de interesse.

5.3.1.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por citometria de fluxo

Nos ensaios anteriores para a avaliação do potencial antioxidante de *P. aculeata*, foi possível observar que dentre todas as amostras testadas, o extrato de caule obtido a partir de plantas aclimatizadas apresentou os maiores valores de captura do radical DPPH e capacidade quelante de ferro II. Deste modo, esta amostra foi selecionada para a avaliação da inibição da produção de ERO em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS, utilizando a sonda diclorodihidrofluoresceínadiacetato (DCFH-DA). Neste ensaio, os níveis de ERO foram determinados após 24 h de tratamento das células com a amostra nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A Figura 40 mostra os histogramas de intensidade de fluorescência da sonda para ERO nas células estimuladas com LPS tratadas ou não com o extrato caulinar especificado anteriormente a 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Também é mostrado o histograma das células tratadas com o agente antioxidante de referência, a quercetina a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. É possível observar que o tratamento das células estimuladas pelo LPS com o extrato caulinar a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ fez com que a curva se deslocasse para a esquerda, em relação à curva das células estimuladas pelo LPS, indicando que o extrato nesta concentração é capaz de reduzir a marcação das células com a sonda, portanto, reduzindo os níveis intracelulares de ERO (Figura 43).

Figura 43 - Efeito protetor do extrato caulinar de plantas aclimatizadas contra a produção de ERO em células RAW 264.7 de um experimento representativo, mostrado em histogramas de intensidade de fluorescência da sonda DCFA-DA.



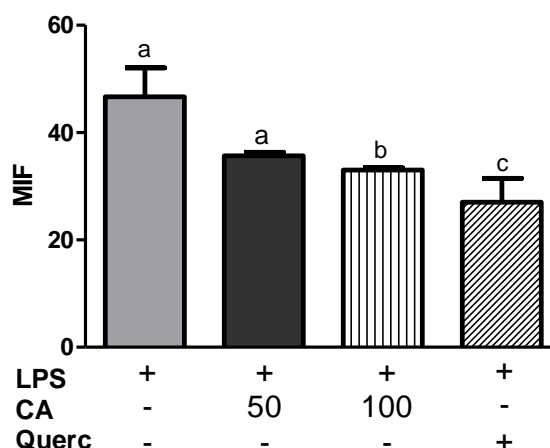
Legenda: Células ($5 \times 10^5/\text{mL}$) estimuladas ou não com LPS $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e tratadas simultaneamente com LPS e extrato caulinar de planta aclimatizada (50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou quercetina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As células foram incubadas por 24 h a 37°C e 5 % de CO_2 e posteriormente processadas para dosagem de ERO intracelular, por citometria de fluxo. Experimento representativo.

O tratamento simultâneo das células com LPS e extrato caulinar a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ resultou num deslocamento ainda maior para a esquerda, sugerindo um efeito antioxidante maior nesta concentração, em relação à concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O tratamento simultâneo das células com LPS e quercetina também deslocou a curva para a esquerda, embora de forma mais acentuada, indicando também uma redução nos níveis intracelulares de ERO nos macrófagos (Figura 43).

A análise das médias de diferentes experimentos (Figura 44) confirmaram o efeito protetor do extrato metanólico de caule de plantas aclimatizadas de *P. aculeata* contra o estresse oxidativo. Observa-se nesta figura que as células estimuladas com LPS e tratadas com extrato caulinar de planta aclimatizada a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam redução significativa na MIF de 30%, em relação às células tratadas apenas com LPS, indicando um efeito redutor do extrato caulinar de plantas aclimatizadas sobre os níveis intracelulares de ERO em células RAW 264.7. A redução dos níveis de ERO induzida pelo tratamento com o extrato a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não foi significativa ($p > 0,05$). O tratamento com quercetina reduziu 43% dos níveis

de ERO, em relação às células tratadas apenas com LPS.

Figura 44 - Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) da sonda DCFH-DA para a determinação intracelular de ERO em células RAW 264.7.



Legenda: As células RAW 264.7 ($5 \times 10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com LPS $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 h e posteriormente processadas para dosagem de ERO intracelular, por citometria de fluxo. CA - Extrato de caule de plantas aclimatizadas; Querc - Quercetina (amostra de referência). Os dados representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença significativa, em relação à cultura somente com LPS, pelo teste de Tukey a 5%.

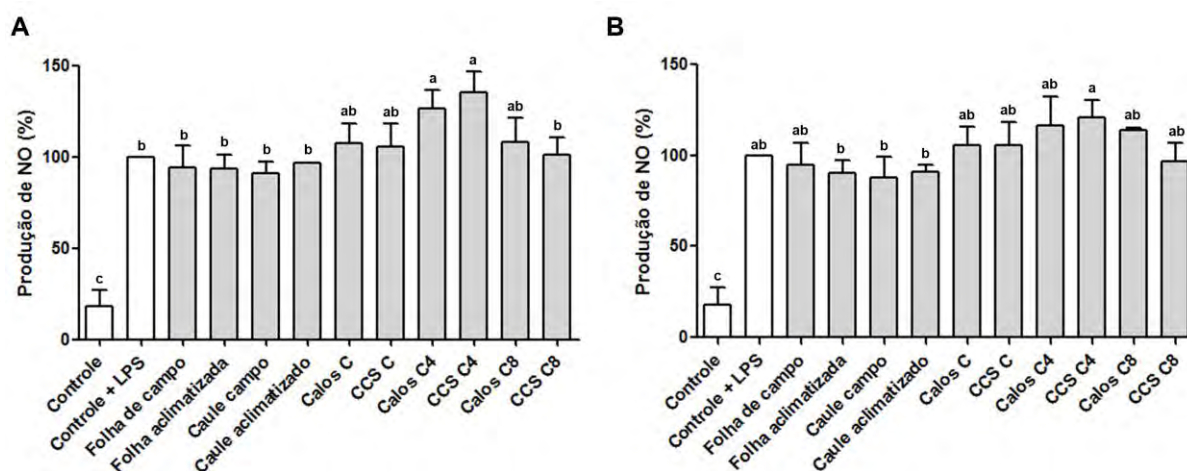
5.3.2 Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico

O efeito de diferentes concentrações das amostras de *P. aculeata* (1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na produção de óxido nítrico (NO) foi avaliado indiretamente, através quantificação do nitrito pela reação de Griess (Figura 39). Na análise dos resultados, foi possível observar que na menor concentração testada ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a produção de NO foi estimulada significativamente nas células tratadas com amostras de calos e suspensões celulares em meio C4 (MS, 1:8 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3$, 10 μM Picloram) (Figura 45 A). Nesta concentração, não houve redução significativa na produção de NO com nenhuma das amostras de campo, aclimatizadas ou de culturas *in vitro* (Figura 45 A). No tratamento a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, nenhuma amostra diferiu significativamente das células estimuladas com LPS (Figura 45 B), com exceção das células em suspensão em meio C4, condição em que se continuou observando aumento da produção de NO (Figura 45 B).

A partir da concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, as amostras obtidas a partir de plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vivo* apresentaram uma maior inibição da produção NO em relação à amostra controle estimulada com LPS (Figura 45 C, D e E). Esses extratos revelaram uma maior capacidade de redução de uma das espécies ativas do nitrogênio, o NO, o qual também apresenta ação anti-inflamatória, resultando em valores de IC_{50} de $57,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para a amostra foliar, e $60,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para a amostra obtida a partir do caule, sem diferença significativa entre elas. Na maior concentração testada ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), as porcentagens de inibição da produção de NO pelos extratos de folha ($25,09 \pm 4,22 \%$) e caule ($19,70 \pm 5,11 \%$) obtidas de plantas do campo, foram similares aos valores alcançados pela amostra controle sem adição de LPS ($18,04 \pm 9,15 \%$) (Figura 45 E).

As amostras produzidas a partir de folhas e caules obtidos de plantas aclimatizadas também apresentaram uma significativa redução da produção de NO, mostrando cerca de 50% de inibição na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 45 E). Entretanto, os extratos preparados a partir das diferentes culturas *in vitro* não foram capazes de reduzir a produção de NO pelas células estimuladas com LPS. A produção de NO pela linhagem RAW 264.7 tratadas com estas amostras foi similar ou até mesmo superior (calos e CCS em meio C4) à cultura estimulada com LPS, independentemente da concentração testada (Figura 45). Contudo, é importante destacar que dentre os extratos produzidos a partir de material biotecnológico, os tratamentos com amostras de suspensões celulares em meios C (MS $\frac{1}{2}$, 1:2 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, $10 \mu\text{M}$ Picloram) e C8 (MS, 1:8 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, $10 \mu\text{M}$ Picloram), reduziram, embora de forma não significativa, a produção de NO (em 10%), na maior concentração testada (Figura 45 E).

Figura 45 - Avaliação da inibição da produção de NO pelas células RAW 264.7, após tratamento com diferentes amostras de *P. aculeata* obtidas a partir de plantas de campo, aclimatizadas em culturas *in vitro*.



Legenda: A- Amostras a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; B- Amostras a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; C- Amostras a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; D- Amostras a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; E- Amostras a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As células ($5 \times 10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com LPS $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 h e posteriormente o nitrito foi determinado no sobrenadante. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos com triplicatas. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5%.

5.3.2.1 Avaliação da atividade citotóxica

Após análise dos níveis de NO no sobrenadante das culturas, a viabilidade das células RAW 264.7 aderidas à placa foi avaliada a partir do ensaio colorimétrico do MTT, conforme descrito na metodologia. Esta avaliação se fez necessária a fim de identificar se a redução da produção de NO estaria ocorrendo em consequência da ação do extrato vegetal sobre as células ou devido à citotoxicidade da amostra. Neste estudo, verificou-se que independentemente da amostra e da concentração testada, a viabilidade dos macrófagos foi mantida em cerca de 100 % (Figura 46).

Deste modo, uma vez que os extratos não apresentaram citotoxicidade às células RAW

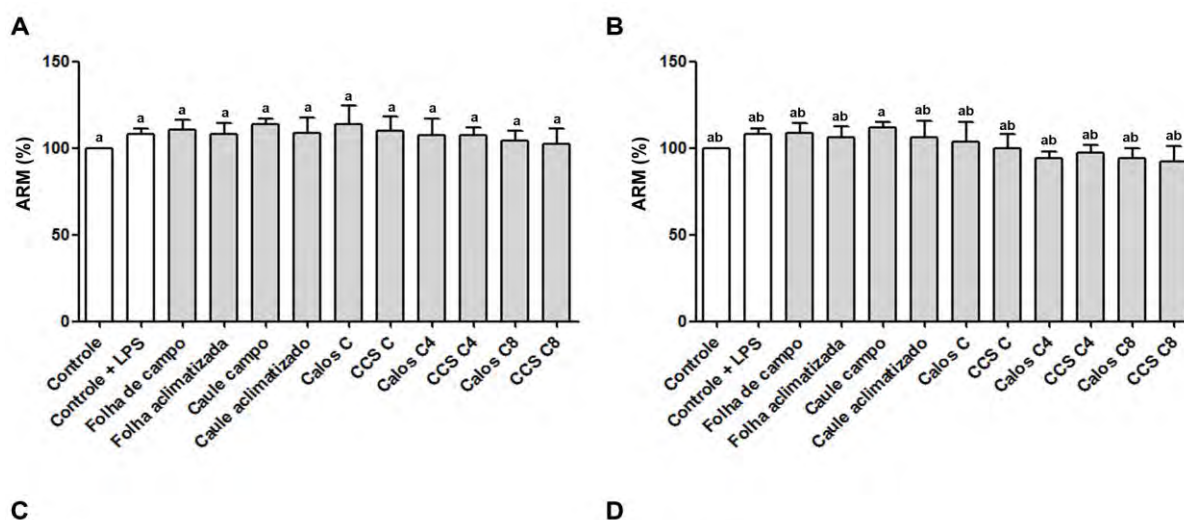
264.7, pode-se afirmar que a inibição da produção de NO observada no item anterior se deve ao potencial modulador das amostras de folha e caule obtidos de plantas do campo sobre a produção deste mediador.

5.3.3 Determinação o potencial antitumoral

O potencial antitumoral dos extratos metanólicos de *P. aculeata* foi avaliado sobre diferentes linhagens celulares. Inicialmente, a fim de identificar a amostra mais ativa e a linhagem mais sensível aos extratos, diferentes linhagens oriundas de tumores sólidos (PC3, MCF7 e A549) e leucemias (K562 e Jurkat) foram tratadas com todas as amostras por 72 h, em apenas duas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

De modo geral, os resultados indicam que o extrato obtido a partir de folhas de plantas do campo mostrou-se mais efetiva na redução da viabilidade celular da maioria das linhagens tumorais testadas, tanto das leucemias K562 e Jurkat (Figura 47), como dos tumores sólidos de próstata (PC3) e de mama (MCF-7) (Figura 48). Além disso, as linhagens leucêmicas mostraram-se mais sensíveis, uma vez que após 72 h de tratamento com amostra de folhas de campo a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a viabilidade celular das linhagens leucêmicas foi reduzida a 4,57 e 5,48 %, respectivamente (Figura 47 B e D). Já nas linhagens PC3, MCF7 e A549, a amostra apresentou baixa citotoxicidade, uma vez que a porcentagem de células viáveis foi mantida acima de 50%, independentemente da concentração testada (Figura 48 A - F).

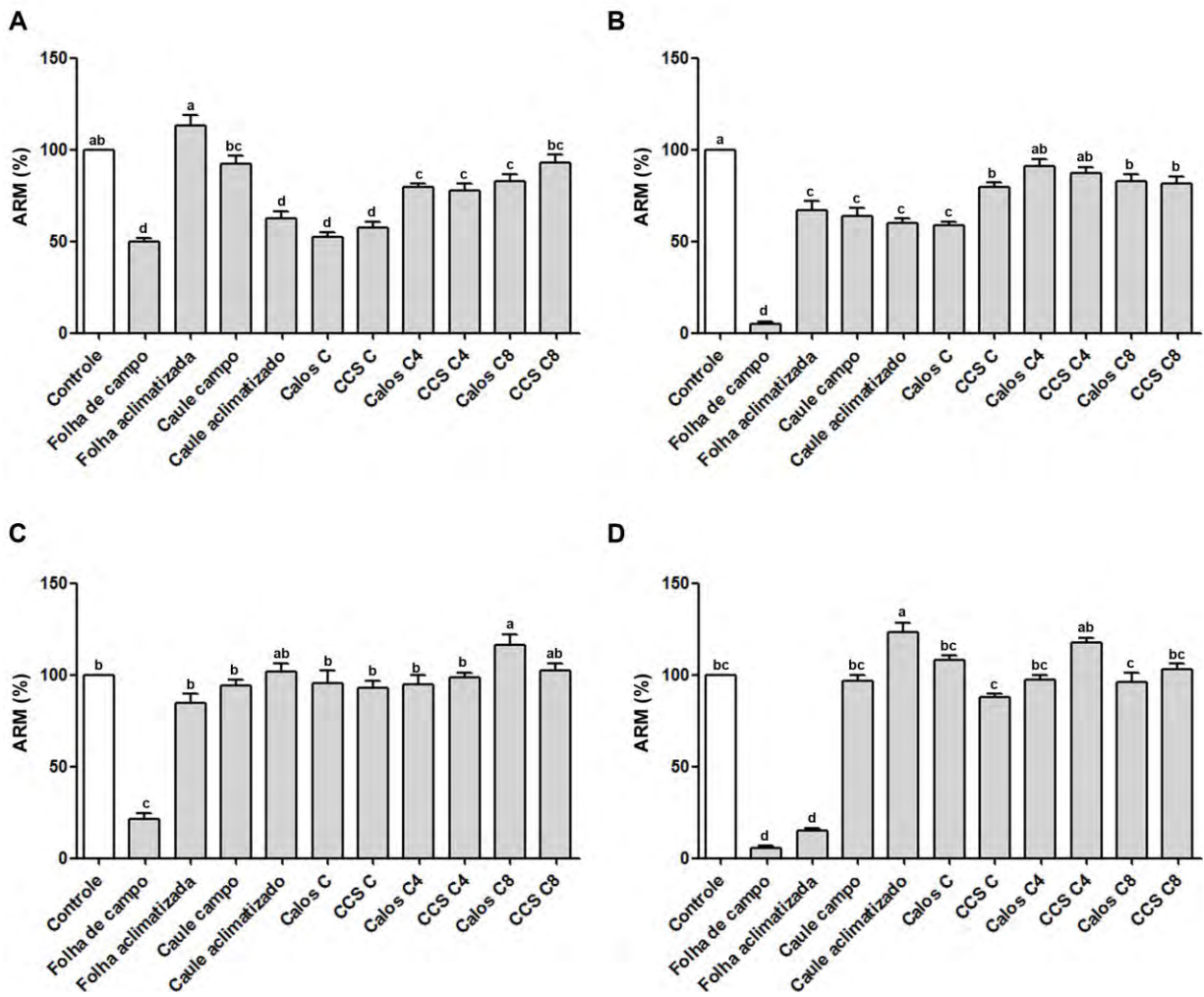
Figura 46 - Avaliação da atividade citotóxica dos extratos metanólicos obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e culturas *in vitro* de *P. aculeata* sobre macrófagos da linhagem RAW 264.7.



Legenda: A- Amostras a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; B- Amostras a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; C- Amostras a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; D- Amostras a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; E- Amostras a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As células ($5 \times 10^5/\text{mL}$) foram estimuladas com LPS $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 h e posteriormente a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos com triplicatas. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5%.

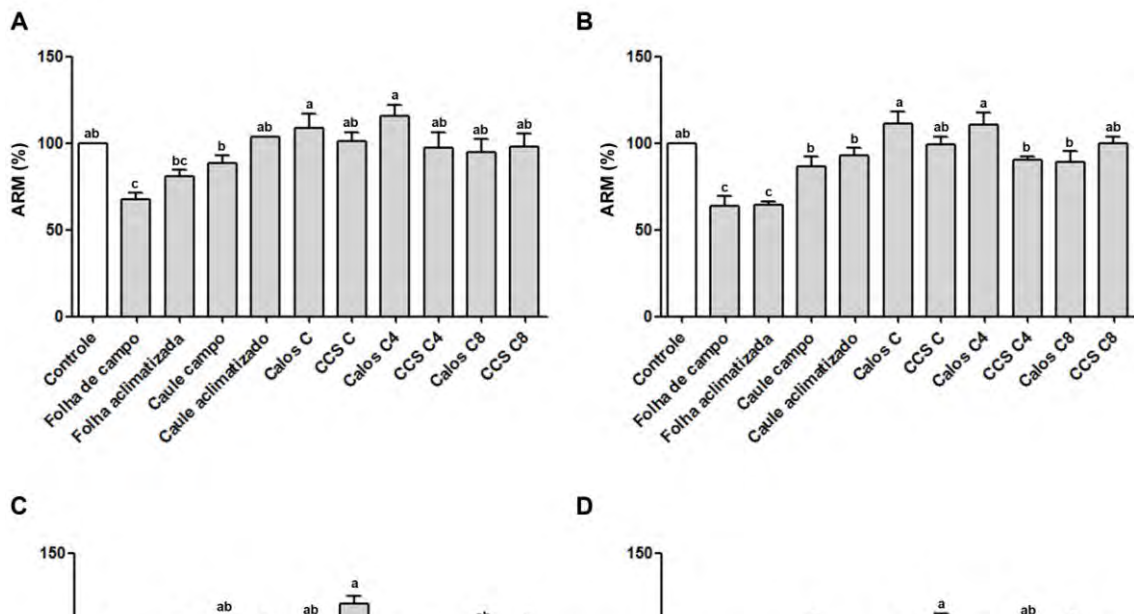
Comparando as linhagens leucêmicas, foi possível verificar que no tratamento com a amostra foliar de plantas cultivadas em campo a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a viabilidade celular da linhagem Jurkat (21,58 %) foi inferior àquela observada nas células K562 (49,91 %), caracterizando a linhagem leucêmica linfocítica (Jurkat) como a mais sensível a esse extrato (Figura 47 A e C). Adicionalmente, a linhagem Jurkat também mostrou grande sensibilidade ao extrato obtido de folhas de plantas aclimatizadas, o qual foi capaz de reduzir a viabilidade das células Jurkat para 14,86 %, após 72 h de tratamento, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 47 D).

Figura 47 - Avaliação da atividade citotóxica dos extratos metanólicos obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e culturas *in vitro* de *P. aculeata* sobre linhagens celulares leucêmicas.



Legenda: A- Linhagem K562 a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; B- Linhagem K562 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; C- Linhagem Jurkat a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; D- Linhagem Jurkat a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As células ($5 \times 10^4/\text{mL}$) foram incubadas na ausência (controle) ou presença das amostras por 72 h e posteriormente a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos com triplicatas. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 48 - Avaliação da atividade citotóxica dos extratos metanólicos de *P. aculeata* obtidos a partir de plantas de campo, aclimatizadas e em culturas *in vitro* sobre diferentes linhagens celulares obtidas de tumores sólidos.



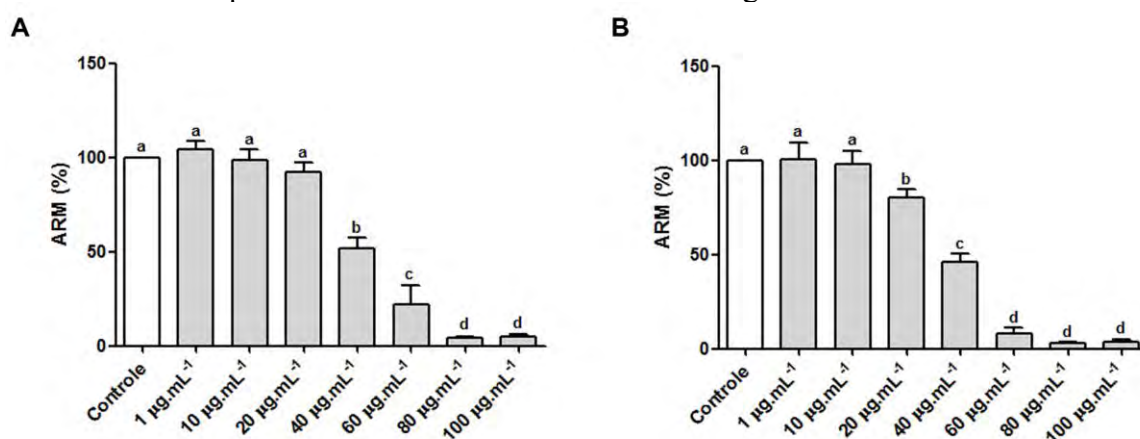
Legenda: A-B Linhagem PC3 a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente; C-D Linhagem MCF7 a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente; E-F Linhagem A549 a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. As células ($5 \times 10^4/\text{mL}$) foram incubadas na ausência (controle) ou presença das amostras por 72 h e posteriormente a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos com triplicatas. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5%.

As amostras obtidas a partir das culturas *in vitro* não se mostraram citotóxicas para a maioria das linhagens tumorais. Dentre as linhagens leucêmicas, destacaram-se os extratos de calos e suspensões celulares em meio C, os quais apresentaram atividade citotóxica sobre a linhagem K562, reduzindo a viabilidade celular para 52,46 e 57,77 %, respectivamente, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 47 A). No entanto, o extrato de calo e de células em suspensão em meio C4 também reduziu significativamente a viabilidade de células K562 para 79,7 % e 78,1 %, respectivamente, a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 47 A). O extrato de caule aclimatizado também reduziu a viabilidade de células leucêmicas K562 para 62,7 % e 59,8 % com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 47 A e B, respectivamente). Já nas células oriundas de tumores sólidos, somente o extrato produzido a partir das suspensões celulares em meio C apresentou citotoxicidade sobre a linhagem A549, reduzindo a porcentagem de células viáveis para 69,71 % e 50,63%, nas concentrações de 50 e 100

$\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 48 E e F, respectivamente).

Diante dos resultados alcançados, concluiu-se que as linhagens leucêmicas K562 e Jurkat mostraram-se as mais sensíveis ao extrato foliar obtido de plantas cultivadas *in vivo*, o qual foi considerado o mais citotóxico, uma vez que a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a viabilidade das células tumorais foi inferior a 50 %. Deste modo, esta amostra foi selecionada e testada em concentrações crescentes sobre as linhagens K562 (Figura 49 A) e Jurkat (Figura 49 B), para a obtenção do IC_{50} , ou seja, a concentração da amostra necessária para reduzir em 50 % as células viáveis.

Figura 49 - Efeito da concentração do extrato metanólico de *P. aculeata* de folhas de plantas de campo na atividade citotóxica sobre as linhagens leucêmicas K562 e Jurkat.



Legenda: A- Linhagem K562; B- Linhagem Jurkat. As células ($5 \times 10^4/\text{mL}$) foram incubadas na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações do extrato por 72 h e posteriormente a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos com triplicatas. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5%.

Após análise dos resultados, foi possível verificar que a ação citotóxica da amostra mostrou-se semelhante em ambas as linhagens tumorais. Neste ensaio, observou-se que a partir de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o tratamento promoveu uma brusca redução na viabilidade celular, a qual atingiu cerca de 4 % na maior concentração testada ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 49).

Deste modo, verificou-se que o IC_{50} da amostra sobre a linhagem K562 foi de $41,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto para a linhagem Jurkat, o IC_{50} ficou em $34,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Neste caso, o extrato foliar de plantas cultivadas *in vivo* apresenta maior efeito citotóxico sobre a linhagem tumoral Jurkat, uma vez que a partir de $34,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a amostra reduziu em 50 % a população de células tumorais, após 72 h de tratamento.

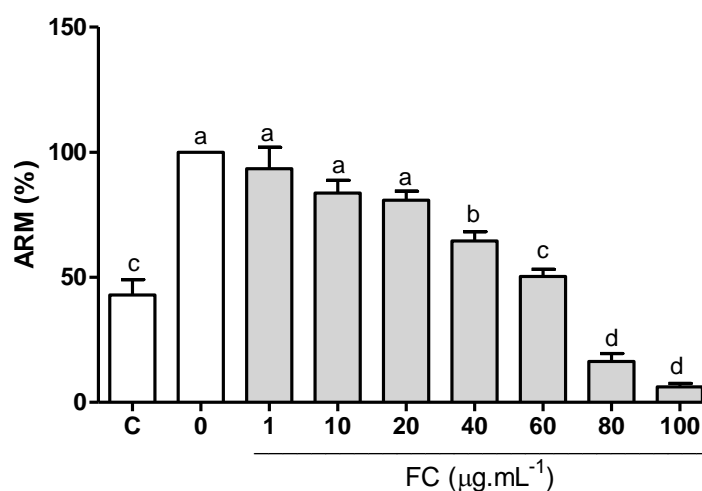
5.3.4 Determinação da atividade citotóxica em células mononucleares

Sendo a leucemia o tipo de neoplasia mais sensível às amostras de *P. aculeata*,

decidimos avaliar a citotoxicidade da amostra com maior ação antileucêmica sobre células não tumorais, e as células selecionadas neste estudo foram células mononucleares (linfócitos e monócitos) de sangue periférico humano de indivíduos saudáveis.

O efeito citotóxico do extrato obtido a partir de folhas de plantas cultivadas em campo sobre células mononucleares humanas isoladas a partir de sangue periférico foi determinado após 72 h de tratamento com diferentes concentrações do extrato, utilizando o teste do MTT. Neste ensaio, o extrato foliar mostrou efeito citotóxico significativo a partir da concentração de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, alcançando uma porcentagem de células viáveis de 6,18 % na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 50). Deste modo, a amostra testada apresentou um IC_{50} de $48,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$, na qual exerce citotoxicidade sobre 50 % das células mononucleares de sangue periférico estimuladas com PHA.

Figura 50 - Avaliação da atividade citotóxica do extrato metanólico de *P. aculeata* obtido de folhas de plantas de campo sobre células mononucleares humanas de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

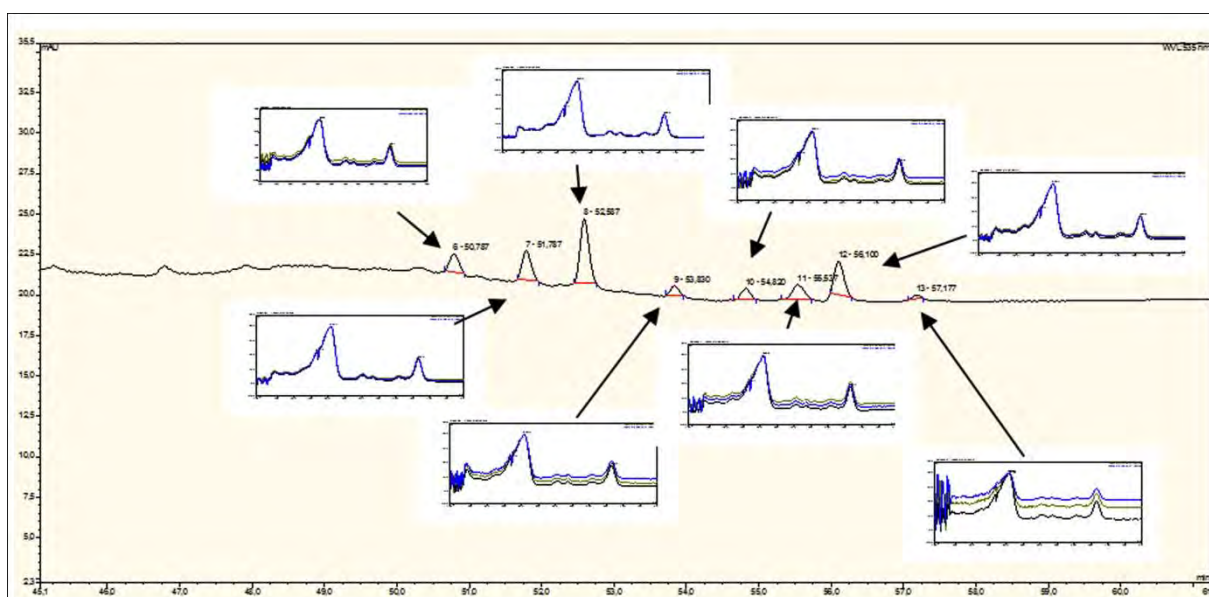


Legenda: As células ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubadas na ausência (controle negativo, C) ou na presença do mitógeno Fitohemaglutinina (PHA) sem ou com diferentes concentrações do extrato, por 72 h. A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos com triplicatas. Letras iguais sobre as barras indicam não haver diferença estatística, pelo teste de Tukey a 5%.

5.3.5 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência, detecção por UV acoplada e espectrometria de massas com ionização por electrospray (CLAE-UV-EM-IES)

Inicialmente, as amostras de *P. aculeata* obtidas de plantas de campo, plantas aclimatizadas e a partir de culturas *in vitro* foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-UV/DAD), o qual permite uma análise dos compostos em função da absorção de luz em diferentes comprimentos de onda (varredura do espectro). Deste modo, após a análise dos espectros das diferentes substâncias presentes nos extratos (diferentes sinais nos cromatogramas), foi possível verificar em todos os extratos a presença de substâncias típicas da classe das betalaínas, considerando a absorção de UV visível a 535 nm e comparando o espectro de absorção dos sinais principais, típicos de betalaínas. A Figura 51 ilustra o espectro de absorção da amostra de folhas obtidas de plantas do campo a partir da CLAE-DAD a 535 nm, a qual exemplifica os resultados obtidos com todas as amostras analisadas.

Figura 51 - Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD a 535 nm do extrato foliar de *Pereskia aculeata* cultivada a campo.

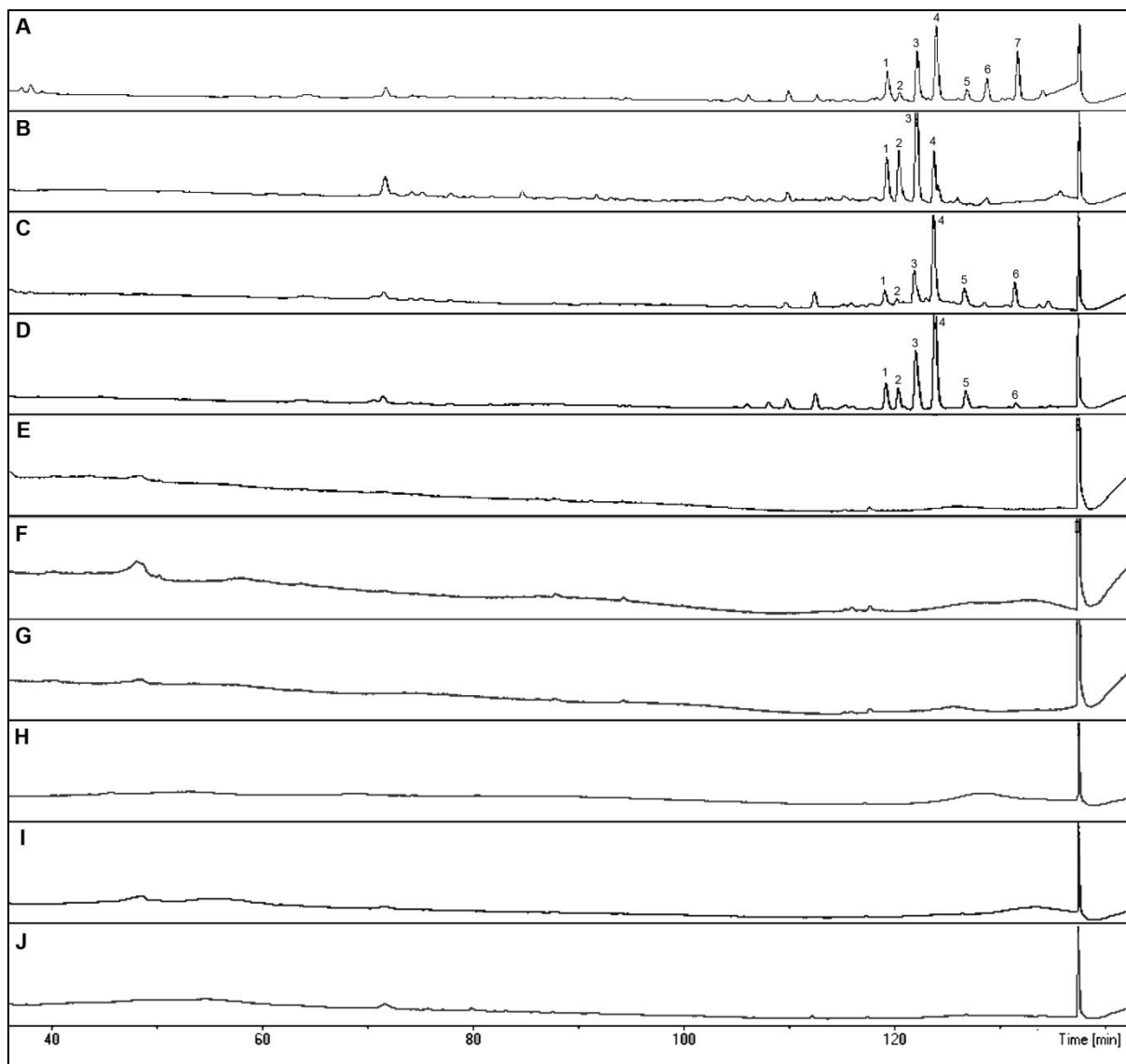


Legenda: Os gráficos insertados no cromatograma representam o espectro de absorção dos diferentes sinais a

535 nm.

Após estabelecer a melhor condição de separação dos constituintes dos extratos, estes foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrofotometria de massas por ionização *electrospray* (CLAE-UV-EM-IES), que possibilita a investigação das substâncias a partir de dois detectores, o detector de UV e o espectrômetro de massas. O detector de UV teve sua lâmpada fixada a 340 nm, visando à detecção de compostos fenólicos. Os cromatogramas das diferentes amostras (extratos), obtidos pelo detector de UV, a 340 nm, estão ilustrados na Figura 52. Deste modo, verifica-se que apenas as amostras de plantas cultivadas a campo e aclimatizadas apresentam compostos fenólicos em sua composição (Figura 52 A-D), enquanto nas culturas *in vitro* (calos e suspensões celulares) tais substâncias parecem estar presentes em concentrações muito baixas (Figura 52 E-J).

Figura 52 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-EM-IES de amostras de *P. aculeata* a partir de plantas de campo, aclimatizadas e em culturas *in vitro* a partir do detector de UV a 340 nm.

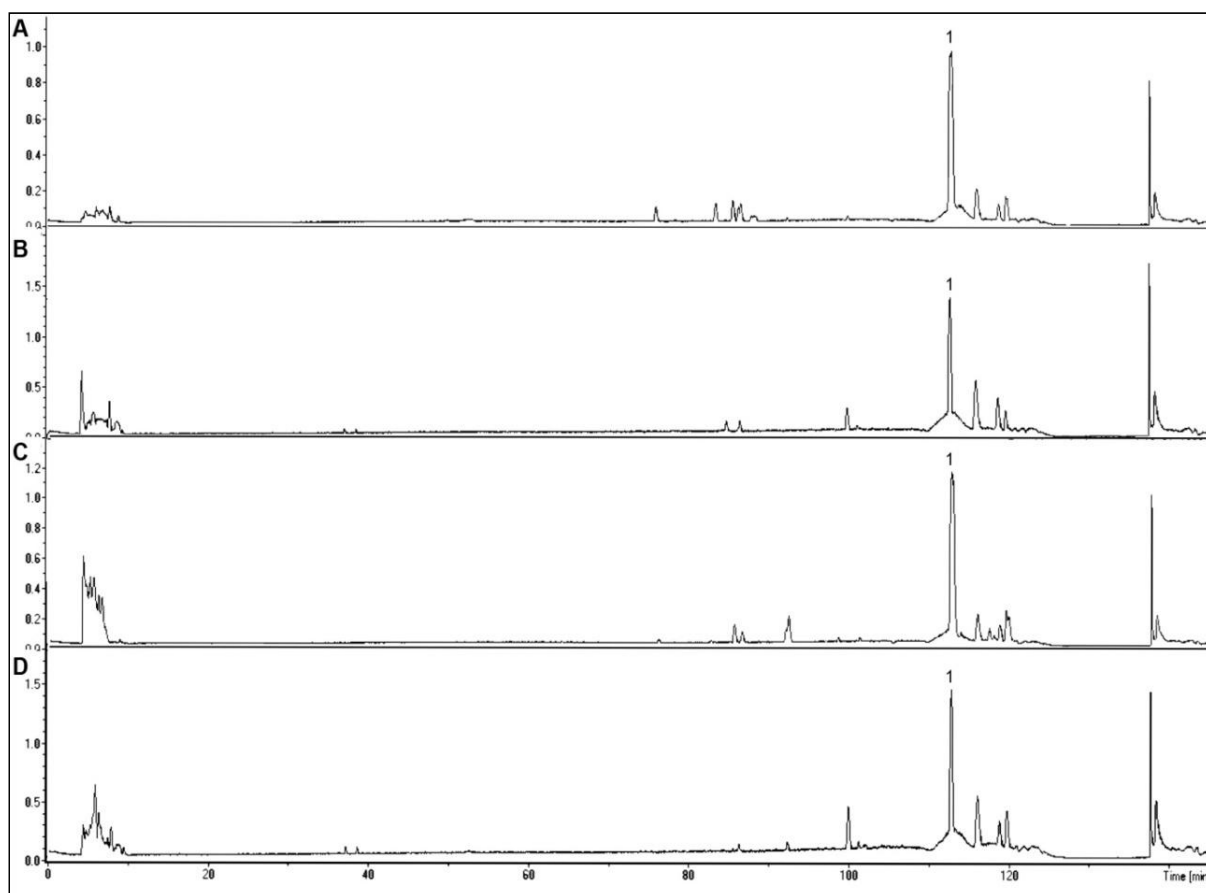


Legenda: A- Folha de plantas de campo; B- Folhas de plantas aclimatizadas; C- Caule de plantas de campo; D- Caule de plantas aclimatizadas; E- Calos em meio C; F- Calos em meio C4; G- Calos em meio C8; H- Suspensões celulares em meio C; I- Suspensões celulares em meio C4; J- Suspensões celulares em meio C8. As amostras foram preparadas a 1 mg.mL^{-1} .

A partir da análise dos cromatogramas, pode-se verificar que os principais fenólicos presentes nas amostras de *P. aculeata* foram observados a partir de 120 min, onde o extrato de folhas obtidas de plantas de campo exibiu uma maior quantidade de sinais, revelando assim, uma maior diversidade de substâncias (Figura 52 A). Adicionalmente, é possível observar que enquanto algumas substâncias mostram-se em maior concentração nas plantas de campo, como os sinais 7 e 6 verificados nos extratos de folha e caule, respectivamente (Figura 52 A e C), outras mostram-se mais concentradas nas plantas aclimatizadas, como pode ser verificado nos sinais 2 e 3 comparando as amostras de plantas cultivadas a campo e as plantas aclimatizadas (Figura 52 A-D).

Posteriormente, ao passar pelo espectrômetro de massas, as amostras foram separadas de acordo com a capacidade das substâncias em perderem um elétron após serem ionizadas. Neste sentido, pode-se observar a presença de um sinal predominante (1), com elevado tempo de retenção (cerca de 112 min.), em todos os extratos investigados, independente da origem do material vegetal (Figuras 53 e 54).

Figura 53 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-EM-IES dos extratos de folha e caule obtidos a partir de plantas de campo e aclimatizadas de *P. aculeata*.

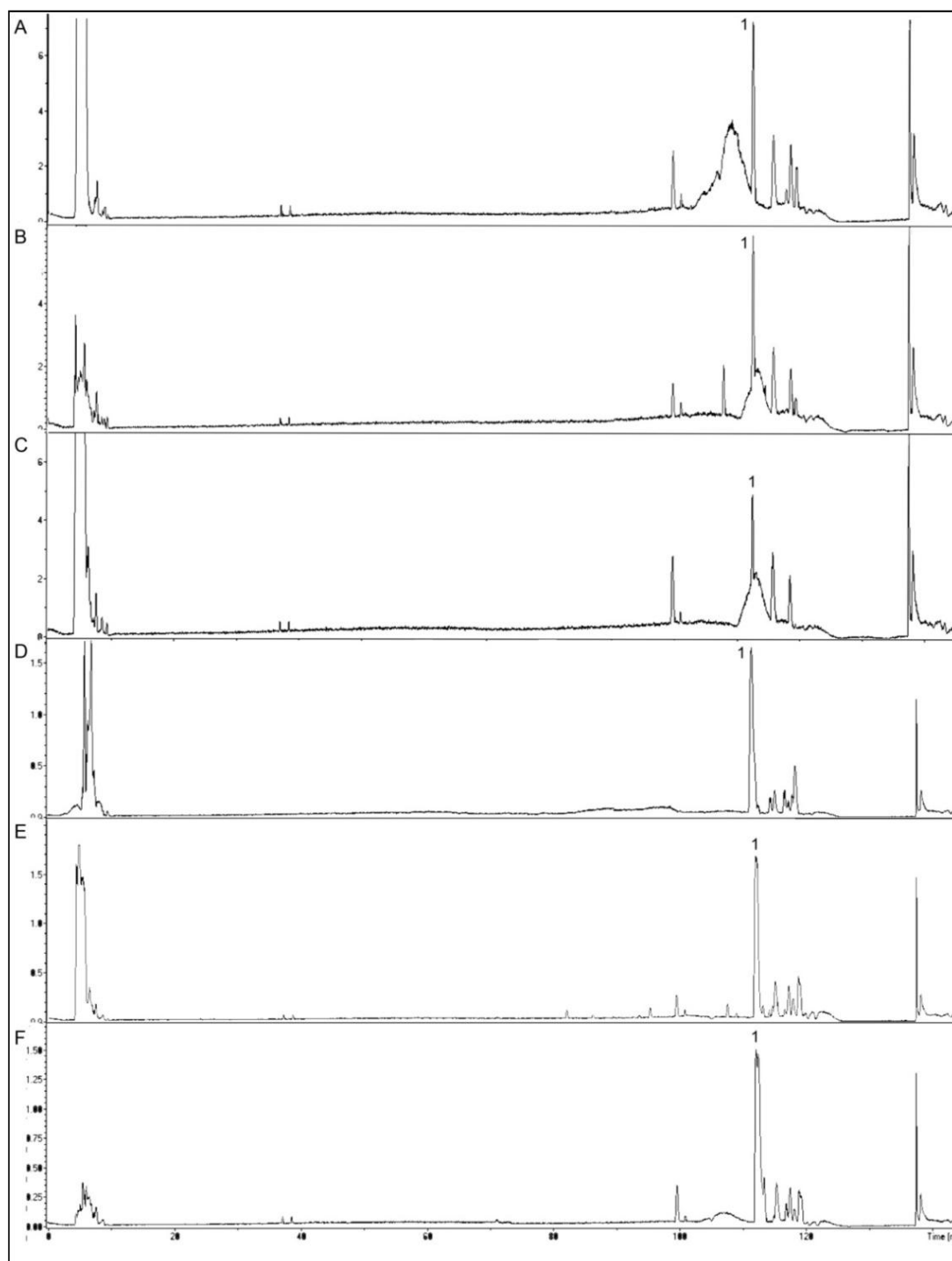


Legenda: A- Folha de plantas de campo; B- Folhas de plantas aclimatizadas; C- Caule de plantas de campo; D- Caule de plantas aclimatizadas. As amostras foram preparadas a 1 mg.mL^{-1} .

Adicionalmente, os cromatogramas das plantas *P. aculeata* revelaram o aumento da concentração e/ou a síntese de substâncias durante o processo de micropropagação da espécie. Este fato pode ser observado após 100 min de eluição das amostras, onde os extratos de folhas (Figura 53 B) e caules (Figura 53 D) de plantas aclimatizadas mostram a presença de um sinal não verificado nas plantas cultivadas a campo (Figura 53).

Figura 54 - Cromatogramas dos extratos obtidos a partir das culturas de calos e de

células em suspensão, obtidos por CLAE-UV-EM-IES.



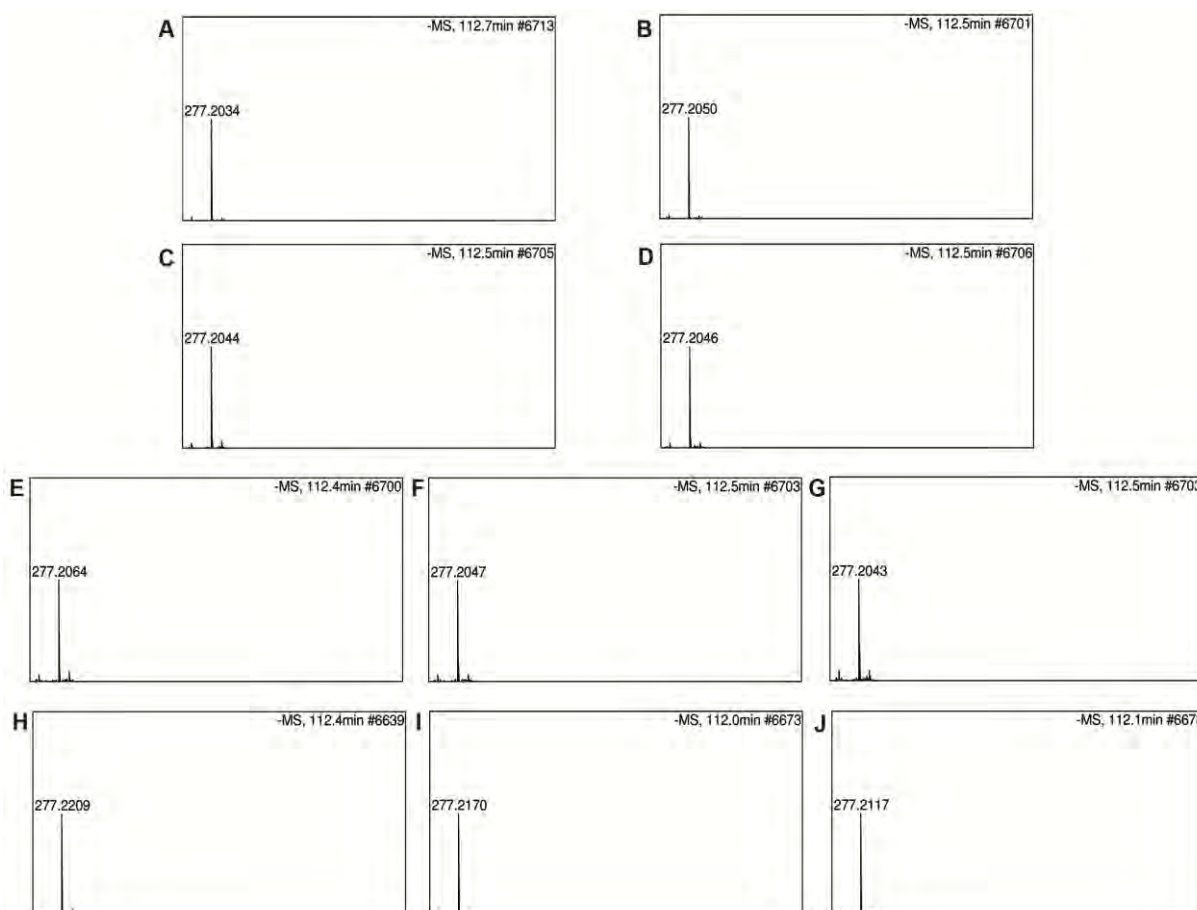
Legenda: A- Calos em meio C; B- Calos em meio C4; C- Calos em meio C8; D- Suspensões celulares em meio C; E- Suspensões celulares em meio C4; F- Suspensões celulares em meio C8. As amostras foram preparadas a 1 mg.mL^{-1} .

Os cromatogramas obtidos por CLAE-UV-EM-IES para as amostras de cultura *in vitro* revelaram uma maior riqueza de substâncias nas amostras oriundas dos calos em comparação às suspensões celulares (Figura 54). Além disso, verifica-se que nas culturas de células em suspensão, o sinal (1) é notadamente o principal, isto é, a substância predominante nestas amostras, independentemente do meio nutritivo no qual as células foram cultivadas (Figura 54

D, E, F). Já nos extratos produzidos a partir da cultura de calos, observa-se uma maior diversidade de sinais com tempos de retenção próximos ao sinal principal (1), prejudicando a resolução do perfil cromatográfico (Figura 54 A-C).

Os espectros de massas da substância predominante (sinal 1), revelou a presença de um fragmento principal, com praticamente o mesmo tempo de retenção (112 - 112,7 min) e massa molecular de 277,2 (M^+) em todas as amostras analisadas (Figura 55).

Figura 55 - Espectros de massas da substância com tempo de retenção de 112 min., obtidos a partir da análise por CLAE-UV-MS-IES das diferentes amostras de *P. aculeata*.



Legenda: A- Folha de plantas de campo; B- Caule de plantas de campo; C- Folhas de plantas aclimatizadas-; D- Caule de plantas aclimatizadas; E- Calos em meio C; F- Calos em meio C4; G- Calos em meio C8; H- Suspensões celulares em meio C; I- Suspensões celulares em meio C4; J- Suspensões celulares em meio C8.

Além disso, na análise detalhada destes fragmentogramas verifica-se a presença de diversos sinais com valores de m/z e de intensidade relativa muito semelhantes, indicando se tratar da mesma molécula em todas os extratos (Tabela 16).

Tabela 16 - Análise dos fragmentos da principal substância presente nas amostras de *Pereskia aculeata*.

Folha de campo			Caule de campo		Folha aclimatizada		Caule aclimatizado	
TR	112,7		112,5		112,5		112,5	
Sinal	m/z	IR (%)	m/z	IR (%)	m/z	IR (%)	m/z	IR (%)
1	99,92	0,80	99,92	0,92	116,92	4,65	116,92	5,09
2	116,92	3,50	116,92	3,39	277,20/ M⁺	100	277,20/ M⁺	100
3	277,05	0,76	277,03	0,74	278,21	23,2	278,21	22,40
4	277,20/ M⁺	100	277,05	0,76	279,21	2,73	279,21	2,56
5	278,21	26,22	277,21/ M⁺	100	283,25	10,94	283,25	10,05
6	279,21	2,88	278,21	21,7	284,26	2,57	284,26	2,23
7	283,25	2,19	279,21	2,54	325,17	1,12	311,28	2,82
8	325,17	0,74	283,25	1,53	341,1	1,70	341,10	1,70
9	359,20	2,96	359,21	2,47	359,20	7,49	359,21	5,79
10	377,12	0,96	377,12	1,23	360,21	1,52	360,21	1,34

Calo C			Calo C4		Calo C8	
TR	112,4		112,5		112,5	
Sinal	m/z	IR (%)	m/z	IR (%)	m/z	IR (%)
1	99,92	2,12	116,92	6,16	116,92	10,85
2	116,92	6,16	277,20/ M⁺	100	255,22	2,59
3	277,21/ M⁺	100	278,21	17,47	277,21/ M⁺	100
4	278,21	18,89	279,21	2,75	278,21	18,98
5	279,22	2,73	283,25	20,55	283,25	36,36
6	283,25	11,52	284,25	3,62	284,25	6,64
7	284,26	2,25	341,09	2,36	325,17	2,81
8	341,10	2,74	359,21	7,35	341,10	4,15
9	359,21	9,56	360,21	0,22	359,21	10,44
10	360,21	2,43	365,25	2,41	365,25	4,23

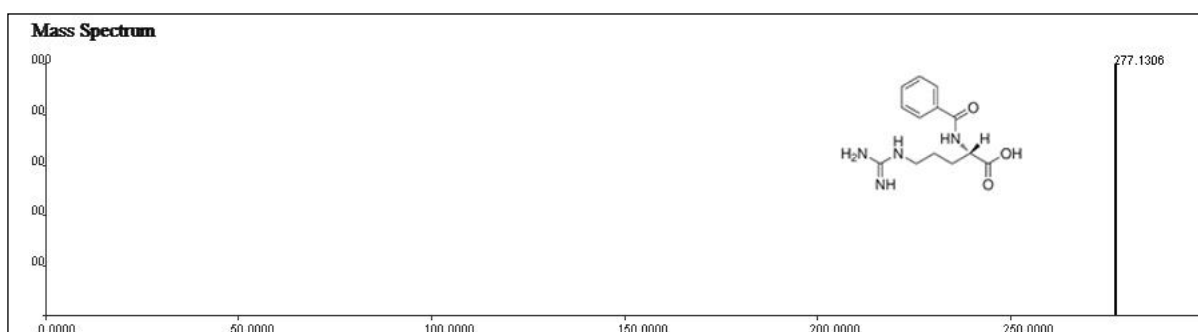
CCS C			CCS C4		CCS C8	
TR	112,4		112,0		112,1	
Sinal	m/z	IR (%)	m/z	IR (%)	m/z	IR (%)
1	89,03	0,75	99,93	0,92	99,92	0,71
2	116,93	2,94	116,93	34,59	116,92	3,01
3	277,09	0,75	277,09	0,77	277,08	0,84
4	277,22/ M⁺	100	277,22/ M⁺	100	277,21/ M⁺	100
5	278,22	22,29	278,22	28,7	278,21	26,63
6	279,22	3,25	279,22	2,75	279,22	2,78
7	341,11	0,83	311,16	0,68	339,19	0,66
8	359,22	5,86	325,18	0,70	359,21	1,84
9	360,23	1,31	359,22	2,57	360,22	0,68
10	375,2	1,25	377,14	1,52	377,14	1,54

Legenda: TR- tempo de retenção; CCS- Cultura de células em suspensão; IR- Intensidade relativa.

Neste contexto, considerando que os compostos fenólicos foram observados apenas nas plantas cultivadas *in vivo* e *ex vitro*, e que a substância principal detectada por CLAE-UV-EM-IES foi detectada em todas as amostras, com um tempo de retenção análogo aos sinais observados nos cromatogramas obtidos por CLAE-UV/DAD, a 535 nm, é possível inferir que a substância predominante nos extratos de *P. aculeata* trata-se de um derivado de betalainas.

Desta forma, comparando os resultados obtidos neste estudo com os dados disponível na base MassBank, é possível sugerir que a substância predominante trata-se do N²-Benzoil-L-arginina (Figura 56), um derivado de betaxantina, uma betalaína formada a partir de aminoácidos, a qual foi produzida em maior concentração nas culturas *in vitro* de *P. aculeata* investigadas neste estudo.

Figura 56 - Espectro de massas da molécula N- α -Benzoil-L-arginina encontrado na base MassBank, sugerida como a principal substância observada nas amostras de *Pereskia aculeata*.



5.4 Discussão

A produção de diferentes radicais livres ocorre naturalmente no metabolismo celular, como ao longo da cadeia respiratória, ou em outros processos celulares, como durante a fagocitose (OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, fontes externas de radicais livres, incluindo a exposição à radiação ultravioleta, o consumo de álcool, o tabagismo, dentre outros hábitos, contribuem muito para a ocorrência do estresse oxidativo celular (MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2013). Deste modo, o desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade do organismo em neutralizar estas moléculas, pode ser a causa de muitas doenças crônicas e degenerativas, como hipertensão, diabetes, câncer, artrite reumatoide, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, dentre outras (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; ANGAJI et al., 2012).

Antioxidantes são compostos capazes de retardar ou inibir a oxidação de lipídeos e outras moléculas a partir do bloqueio da propagação de reações de oxirredução, seja de modo enzimático ou químico (JAMES et al., 2010). Nos últimos anos, muitos estudos têm confirmado que o consumo regular de frutas e vegetais frescos pode conferir proteção contra diversas doenças crônico-degenerativas causadas pelo estresse redox, principalmente contra o câncer (SHIBATA et al., 2008; KADENBACH et al., 2009; HASSANBAGLOU et al., 2012).

Desta forma, certos alimentos podem ser caracterizados como nutracêuticos, pois além de propriedades nutritivas, são ricos em compostos antioxidantes, os quais favorecem a manutenção da integridade da célula e das funções celulares (SIMIRGIOTIS; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2010). Segundo Madrigal-Santillán e colaboradores (2013), considerando que pacientes com doenças degenerativas apresentam altos níveis de oxidantes e/ou baixas taxas de antioxidantes, a adição de compostos antioxidantes na dieta alimentar pode ser benéfica na redução dos danos causados pelo estresse oxidativo.

Um dos principais mecanismos de ação dos antioxidantes caracteriza-se pela adsorção ou neutralização de radicais livres, a fim de impedir a ocorrência de danos celulares. Neste contexto, o método de captura do radical DPPH consiste em um teste simples, rápido, que pode ser usado para avaliar a capacidade de captura de radicais livres por compostos específicos ou a partir de extratos vegetais (CHEUNG et al., 2003). O ensaio é baseado na reação de redução do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil por moléculas doadoras de hidrogênio, sendo a redução do DPPH proporcional à redução da absorvância da amostra a 515 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005). Segundo Ani e colaboradores (2006), o método de avaliação da atividade antioxidante pelo DPPH é considerado um ensaio sensível e independente da polaridade do substrato.

No presente estudo, as maiores taxas de captura do radical DPPH (acima de 70 %) foram alcançadas na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a partir dos extratos de folhas obtidas de plantas de campo, de caule obtido de plantas aclimatizadas e de suspensões celulares em meio C (MS $\frac{1}{2}$, 1:2 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3$, 10 μM Picloram), os quais não apresentaram diferença significativa para as amostras padrão (ácido ascórbico e BHT). Adicionalmente, pode-se observar que as amostras foliares de plantas cultivadas a campo e plantas aclimatizadas apresentaram taxas similares de captura do radical DPPH, indicando manutenção do potencial antioxidante da espécie, mesmo após ser propagada sob condições *in vitro*.

Comparando os resultados aqui obtidos com outras espécies da família Cactaceae é possível constatar o elevado potencial antioxidante de *P. aculeata*. O extrato metanólico produzido a partir das folhas de *P. bleo* (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresentou uma taxa de 25% de captura de DPPH $^{\bullet}$ (SIM et al., 2010), enquanto a fração de acetato de etila alcançou 50% de captura deste radical (EC_{50}) com 168,35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (HASSANBAGLOU et al., 2012). Com este mesmo tipo de fração, estudos de Sim e colaboradores (2010) com folhas de *P. grandifolia* obtiveram EC_{50} de 140 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cladódios de *O. ficus-indica* apresentaram apenas 30% de captura do radical DPPH, na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (AVILA-NAVA et al., 2014).

Neste estudo, todas as amostras obtidas a partir das culturas *in vitro* (calos e

suspensões celulares) apresentarem valores elevados de captura do DPPH• (acima de 60%), diferindo estatisticamente apenas das amostras de referência e de caule aclimatizado. Em *Justicia gendarussa*, as culturas de calos e de CCS alcançaram valores de captura do DPPH superiores às folhas de campo (AMID et al., 2011), enquanto os brotos de *Ruta graveolens* cultivados *in vitro* apresentaram maior capacidade de sequestro do radical DPPH em relação às plantas de campo, às raízes adventícias e às suspensões celulares (DIWAN et al., 2012). Já nos estudos de Amid e colaboradores (2011), o cultivo de células em suspensão de *J. gendarussa* não apenas favoreceu o sequestro do radical DPPH em relação à cultura de calos, como também resultou em valores de EC₅₀ inferiores ao da substância padrão ácido gálico, indicando uma atividade antioxidante ótima destas amostras.

A habilidade quelante de ferro II representa uma importante atividade antioxidante, uma vez que o ferro II participa ativamente da reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$), gerando radicais hidroxila altamente reativos e biologicamente prejudiciais (HALLIWELL, 1997; FLORA, 2009). Em condições normais, a ocorrência desta reação no organismo é limitada, uma vez que a maior parte do ferro encontra-se associado a proteínas de transferência (transferrina) ou armazenamento do mesmo (ferritina), em um baixo estado redox (RANG et al., 1996). Deste modo, o aumento da quantidade de ferro livre no organismo, devido a certos hábitos alimentares ou a alterações fisiológicas, irá requerer o consumo de agentes quelantes, a fim de evitar a produção de radicais livres (LE et al., 2007). Segundo Gordon (1990), as substâncias quelantes são eficientes antioxidantes secundários, pois reduzem o potencial redox e estabilizam a forma oxidada do íon metálico.

Os íons ferrosos, através da reação de Fenton, atuam como potentes pró-oxidantes estimulando a peroxidação lipídica ou mesmo acelerando a peroxidação pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos em radicais alcóxil e peróxil (RYAN; AUST, 1992; FRIDOVICH, 1995). Tais íons são comumente encontrados em sistemas alimentares (YAMAGUCHI et al., 1998), os quais são responsáveis por iniciar uma reação em cadeia levando à deterioração dos alimentos (GORDON, 1990). Segundo Lima e Abdalla (2001), a peroxidação lipídica pode ser caracterizada como um dos primeiros eventos citotóxicos que provocam alterações nas membranas, interferindo na permeabilidade, no fluxo de substâncias, e causando uma série de lesões celulares, que podem levar à morte celular (BENZIE, 1996).

O ensaio da Ferrozina tem sido empregado para determinar a habilidade quelante de ferro II em diversas espécies de cactáceas a partir de diferentes órgãos vegetais. A maioria das amostras testadas exibiu uma boa habilidade quelante de Fe^{2+} , uma vez que de 1 até 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ todos os extratos mostravam valores estatisticamente iguais à amostra de referência

(quercetina). Na maior concentração testada ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a maior capacidade quelante de ferro II foi apresentada pela amostra de caule obtido de plantas cultivadas *in vivo* ($97 \pm 1,72\%$), resultado superior ao obtido com a amostra padrão ($83,36 \pm 4,92\%$). Em *Psilosocereus arrabidae*, a fração de acetato de etila obtida da casca dos frutos exibiu uma capacidade quelante de Fe^{2+} de cerca de 70%, na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (GONÇALVES et al., 2015), enquanto no extrato etanólico obtido das flores de *Hylocereus undatus*, a $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a taxa alcançada também foi de cerca de 70% (LI et al., 2013). Contudo, estudos de Chaalal e colaboradores (2013) verificaram que os extratos obtidos de sementes de *Opuntia ficus-indica* (variedade vermelha) possuem aproximadamente 10% de capacidade de quelar o íon ferro II.

Ainda avaliando os dados de atividade quelante de ferro na maior concentração ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), observa-se que os extratos produzidos a partir de calos em meio C8 (MS, 1:8 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3$, 10 μM Picloram) e suspensões celulares em meios C (MS $\frac{1}{2}$, 1:2 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3$, 10 μM Picloram) e C8 também apresentaram resultados relevantes, exibindo habilidade quelante de Fe^{2+} acima de 80%. Por outro lado, as culturas de calos em meio C apresentou menor ação quelante do que todos os extratos de plantas *in vivo* ou *ex vivo*. Contudo, em *Ceropegia santapau*, as plantas micropropagadas por organogênese direta apresentaram uma habilidade de quelar o ferro II superior às plantas propagadas por organogênese indireta e às plantas cultivadas *in vivo* (CHAVAN et al., 2014).

Adicionalmente, foi possível observar que o processo de micropropagação de *P. aculeata* aumentou a capacidade quelante de ferro das folhas a 1 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em relação a folha de campo. O aumento desta atividade também foi observado com o extrato de caule aclimatizado em $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em relação ao extrato do caule da planta de campo. Além disso, o extrato de CCS em meio C também apresentou capacidade quelante de ferro II superior aos dos extratos foliares, independentemente da origem (aclimatizado ou de campo). Estes resultados demonstram a importância da utilização da biotecnologia vegetal na produção de metabólitos de interesse, além de oferecer outras vantagens, como o fornecimento contínuo de matéria-prima de qualidade, sem interferir nas populações naturais, além do estabelecimento de uma produção homogênea e sob condições controladas (RAO e RAVISHANKAR, 2002; VANISREE et al., 2004). A eficiência do cultivo *in vitro* na produção de metabólitos especiais associados à atividade antioxidante tem sido relatada para diferentes espécies vegetais (SIMÕES-GURGEL et al., 2011; GIRI et al., 2012; AL KHATEEB et al., 2012).

Métodos fluorescentes, por serem mais sensíveis, têm sido muito empregados na pesquisa, inclusive para avaliar a produção intracelular de ERO (MEDINI et al., 2015; MATIAS et al., 2014; ACQUAVIVA et al., 2013). Neste estudo, este parâmetro foi

determinado pela intensidade da fluorescência emitida pela sonda DCFH-DA, após o tratamento de células macrofágicas murinas RAW 264.7 estimuladas pelo LPS com os diferentes extratos. A sonda DCFH, utilizada há mais de 20 anos na determinação *in vitro* de ERO (BASS et al., 1983), destaca-se pela capacidade de atuar como marcador intracelular e extracelular de ERO (SILVEIRA, 2004), além de possuir elevada sensibilidade (permite a detecção de espécies reativas mesmo em baixas concentrações) (KOJIMA et al., 1998). Após a entrada da sonda DCFH-DA na célula, o grupo diacetato é hidrolisado por esterases citosólicas, liberando a molécula de DCFH, que não é fluorescente. Porém, na presença de EROs, bem como de outros agentes oxidantes e enzimas intracelulares do tipo oxidases (GIRARD-LALANCETTE et al., 2009), o DCFH é oxidado produzindo o derivado fluorescente diclorofluoresceína (DCF) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Assim, quanto maior a produção de ERO, maior a fluorescência da sonda e, conseqüentemente, maior será o MIF (intensidade média de fluorescência).

Alguns estudos apontam a maior especificidade da sonda DCFH na detecção de peróxido de hidrogênio (LE BEL et al., 1992; SILVEIRA, 2004). Entretanto, segundo Hernández-García e colaboradores (2010), apesar da baixa sensibilidade aos radicais hidroxila e superóxido, na presença de metais de transição e peroxidases, radicais intermediários reagem com a DCFH, produzindo DCF. Desta forma, a DCFH pode ser considerada uma sonda universal para a detecção de ERO.

No presente trabalho, o tratamento por 24h com o extrato obtido do caule de plantas aclimatizadas com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ mostrou uma grande tendência em reduzir a produção intracelular de ERO nas células RAW 264.7 (MIF de 33,0), em relação à cultura controle constituída por macrófagos cultivados apenas com LPS (MIF de 46,6), porém essa redução só foi significativa (33%) com a concentração do extrato de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, essa redução foi um pouco menos acentuada do que a induzida pela substância de referência quercetina (MIF de 27,0), com redução de 43%. Tais resultados indicam que o extrato caulinar de *P. aculeata* obtido de plantas aclimatizadas se mostrou eficiente na redução do estresse oxidativo intracelular.

Diversos estudos têm demonstrado a atividade antioxidante de extratos vegetais a partir da avaliação da produção intracelular de ERO utilizando a sonda fluorescente DCFH. Acquaviva e colaboradores (2013) reportaram cerca de 70% de inibição de ERO em adipócitos, após tratamento por 72 h com extrato aquoso de folhas de *Momordica foetida* a $175 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em *Limonium densiflorum*, o tratamento da linhagem tumoral A549 com o extrato metanólico foi o mais eficiente na inibição do estresse oxidativo, alcançando um IC_{50}

de $4,4 \pm 0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MEDINI et al., 2015). Já a fração de acetato de etila, obtida a partir dos frutos do cacto *O. ficus-indica*, apresentou uma elevada ação antioxidante sobre células tumorais PC-12 estimuladas com H_2O_2 , inibindo cerca de 100% da produção de ERO na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SON et al., 2014).

Em condições normais, o NO possui papel fundamental na regulação de diversos processos fisiológicos, como na vasodilatação (UMBRELLO et al., 2013; GORDISH; BEIERWALTES, 2014), no reparo da musculatura (DE PALMA; CLEMENTI, 2012; CASEY et al., 2015) e na neuroproteção (ARANDARCIKAITE et al., 2015; CUI et al., 2014). O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que existe em tres isoformas diferentes, dependendo do tecido onde é encontrada. A eNOS (endotelial) e a nNOS (neuronal) são enzimas constitutivas, enquanto a iNOS, presente em células inflamatórias, dentre outras células, é indutível (LENON et al., 2008).

Por outro lado, o NO consiste em uma importante molécula produzida na defesa contra patógenos (BOGDAN et al., 2000). Segundo Kim e colaboradores (2000), o NO reage espontaneamente com o íon superóxido (O_2^-), formando peroxinitrito (ONOO), um radical muito tóxico para os sistemas biológicos, induzindo modificações em proteínas e danos ao DNA, exercendo assim seu efeito citotóxico (KIM et al., 2000). Entretanto, a produção de NO em excesso está relacionada a processos inflamatórios agudos e crônicos, como arteriosclerose, hipertensão e carcinogênese (PACHER et al., 2007; TAIRA et al., 2009).

Macrófagos atuam como importantes células do sistema imunológico, promovendo uma resposta de defesa imediata contra patógenos, a partir da produção de diferentes mediadores pró-inflamatórios (MONCADA et al., 1991). Contudo, tais mediadores intracelulares, como citocinas e o NO, também podem ser induzidos pelo LPS, lipopolissacarídeo obtido da parede celular de bactérias Gram-negativas, que age como um potente ativador dos macrófagos (NICHOLAS et al., 2007). Deste modo, a busca por moléculas capazes de inibir a produção de NO a partir de macrófagos estimulados com LPS, constitui um das possibilidades na busca por substâncias anti-inflamatórias e antioxidantes (CALIXTO et al., 2015; JOO et al., 2014; REN et al., 2014).

Em *P. aculeata*, as amostras obtidas a partir de plantas cultivadas *in situ* e *in vivo* apresentaram um maior potencial antioxidante e anti-inflamatório, com destaque para os extratos de folha ($\text{IC}_{50} = 57,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e caule ($\text{IC}_{50} = 60,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidos de plantas do campo, que foram capazes de reduzir a produção de NO para 25,08 e 19,70%, respectivamente, na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Tais resultados mostraram-se mais satisfatórios do que os obtidos por Joo e colaboradores (2014), que reportaram uma taxa de

inibição de NO de 35 % a partir da fração de acetato de etila obtida da casca de *Ulmus pumula*, a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em cactáceas, o extrato metanólico de folhas de *O. ficus-indica* não apresentou efeito sobre a produção de NO, sendo observado somente com a fração de clorofórmio (inibição de cerca de 90%) (CHO et al., 2006). Nesta mesma espécie, extratos em acetona produzidos a partir de sementes inibiram a produção de 34,67% de NO (CHAALAL et al., 2013).

Embora com menor atividade, o tratamento com as amostras obtidas a partir de plantas aclimatizadas, induziu uma redução de cerca de 50% na produção de NO (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), independentemente do órgão vegetal utilizado. Já os extratos produzidos a partir das culturas *in vitro* (calos e suspensões celulares) não apresentaram efeito satisfatório sobre a produção de NO em nenhuma concentração testada, resultando em reduções menores do que 30%, as quais não diferiram estatisticamente da amostra controle contendo macrófagos estimulados com LPS. Neste contexto, estudos com a espécie *Cleome rosea* a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apontam que embora a amostra de folha obtida de plantas aclimatizadas tenha apresentado uma redução no potencial redutor da produção de NO (18 ± 7 %) em relação à amostra foliar de plantas de campo (78 ± 22 %), os extratos produzidos a partir das raízes mantiveram elevada taxa de inibição do NO, sem diferença significativa entre as plantas de campo e aclimatizadas (SIMÕES et al., 2006).

A fim de excluir a possibilidade do efeito inibidor da produção de NO pelas células RAW 264.7 ter sido causado pela ação citotóxica dos extratos de *P. aculeata*, as células foram submetidas ao ensaio do MTT para avaliação da viabilidade. Independente da concentração testada dos extratos, a viabilidade das células permaneceu em torno de 100% em todos os tratamentos, sem diferença significativa das amostras controle, indicando ausência de efeito citotóxico sobre os macrófagos da linhagem RAW 264.7 e confirmando o potencial antioxidante e anti-inflamatório das amostras de folha e caule obtidos de plantas de campo de *P. aculeata*. Por outro lado, enquanto Cho e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento com a fração de clorofórmio das folhas *O. humifusa* reduz 90% da produção de NO com redução da viabilidade celular de 30%, resultados de Simões e colaboradores (2006) reportam inibição de 80% da produção de NO na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato, porém com elevada citotoxicidade (aproximadamente 75%).

Diversos estudos relacionam o consumo de cactos e seus derivados com a baixa incidência de câncer nas populações que utilizam tradicionalmente estas espécies na alimentação (CORNETT, 2000; ZOU et al., 2005). Deste modo, considerando os dados da literatura e o efeito antioxidante previamente relatado de *P. aculeata*, as diferentes amostras

foram testadas quanto ao efeito citotóxico sobre diferentes linhagens tumorais. Segundo Tan e colaboradores (2005), extratos metanólicos são normalmente utilizados para uma triagem de amostras com ação antitumoral, considerando que muitas vezes os compostos polares são responsáveis pela citotoxicidade do extrato.

A avaliação do efeito citotóxico dos extratos de *P. aculeata* sobre as diferentes linhagens tumorais revelou uma maior sensibilidade das linhagens leucêmicas K562 e Jurkat. De modo geral, o extrato foliar de planta cultivada *in vivo* exerceu maior atividade antitumoral, reduzindo a viabilidade celular das linhagens oriundas de tumores sólidos, como a PC-3 (carcinoma de próstata) (64,09 %) e MCF7 (carcinoma de mama) (59,26 %), mas principalmente das leucemias K562 (leucemia mieloide crônica) (4,57 %) e Jurkat (leucemia linfocítica aguda) (5,48 %), na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por outro lado, o maior efeito citotóxico sobre a linhagem A549 (carcinoma de pulmão) foi observado no tratamento das células com o extrato obtido de suspensões celulares em meio C (MS $\frac{1}{2}$, 1:2 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, 10 μM Picloram), que reduziu a viabilidade das células para 50,63 %. Este foi o melhor resultado observado a partir de uma amostra produzida de culturas *in vitro*, uma vez que os demais extratos propiciaram uma baixa citotoxicidade (abaixo de 20%) em todas as linhagens tumorais testadas.

As espécies do gênero *Pereskia* têm sido alvo de muitos estudos visando à determinação do potencial antitumoral. Efeitos citotóxicos de extratos de *P. bleo* já foram relatados para células T-47D, de carcinoma de ducto mamário (TAN et al., 2005), carcinoma epidermoide nasofaríngeo (KB), carcinoma de cólon (HCT 116), carcinoma de mama (MCF7) e carcinoma cervical (CasKi) (SRI NUESTRI et al., 2008). Em *P. grandifolia*, a atividade antitumoral também foi verificada nas linhagens KB, CasKi, MCF7, A549 (SRI NUESTRI et al., 2009) e HeLa (carcinoma cervical) (KARIM; SISINDARI, 2012). Nos estudos supracitados, os extratos de *P. bleo* e *P. grandifolia* não apresentaram efeito tóxico sobre fibroblastos normais, utilizados como controle.

O potencial citotóxico das folhas da espécie *P. aculeata* sobre linhagens tumorais foi previamente reportado por Pinto e colaboradores (2012). Neste estudo, o tratamento por 48 h com as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e o precipitado resultante do fracionamento a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, resultou em cerca de 44% de inibição das células HL60 (leucemia promielocítica), enquanto para a linhagem MCF7, a amostra do precipitado mostrou-se a mais citotóxica, com aproximadamente 30% de inibição. Entretanto, o extrato metanólico não foi eficiente na redução da proliferação das linhagens celulares tumorais HL60 e MCF7 (viabilidade de 75% e 90%, respectivamente). Além disso, os autores relatam

que o extrato metanólico não exibiu efeito citotóxico sobre macrófagos murinos ($IC_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizados como controle, após 72 h de incubação, apesar de não mostrarem os dados experimentais.

Comparando os resultados já alcançados para *P. aculeata*, verifica-se que para a linhagem MCF7, os dados obtidos no presente estudo foram mais relevantes do que os reportados por Pinto e colaboradores (2012), uma vez que o extrato metanólico das folhas de plantas de campo foi capaz de reduzir a viabilidade celular para cerca de 60%. Deste modo, é possível inferir que a diferença observada deve-se ao maior tempo de incubação da amostra com as células (72 h), o que potencializou seu efeito antitumoral. Entretanto, nas espécies *P. bleo* e *P. grandifolia*, foi possível observar um maior efeito citotóxico dos extratos metanólicos sobre a linhagem MCF7, provocando inibição de 50% das células tumorais nas concentrações de $39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SRI NUESTRI et al., 2008) e $88 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SRI NUESTRI et al., 2009), respectivamente. Com relação às células A549 (carcinoma de pulmão), enquanto estas se mostraram sensíveis somente ao extrato obtido *in vitro* a partir de suspensões celulares em meio C (MS $\frac{1}{2}$, 1:2 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3$, 10 μM Picloram), que reduziu a viabilidade celular para cerca de 70%, após 72 h de tratamento com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o extrato de folhas de *P. grandifolia* exibiu maior citotoxicidade sobre esta linhagem, alcançando um IC_{50} de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nestas mesmas condições (SRI NUESTRI et al., 2009).

Neste estudo, o maior potencial antitumoral de *P. aculeata* foi verificado a partir das folhas de plantas de campo sobre as linhagens leucêmicas K562 ($IC_{50}=41,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Jurkat ($IC_{50}=34,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Segundo William e colaboradores (2009), o tratamento quimioterápico para leucemia pode ser conduzido a partir de fitoquímicos capazes de agir diretamente nos mecanismos que envolvem a indução da neoplasia e a sinalização de apoptose. Deste modo, é de grande relevância a busca por novas substâncias envolvidas na atividade antileucêmica, capazes de inibir a proliferação e induzir a morte celular (AMPASAVATE et al., 2010).

Os resultados alcançados neste estudo foram superiores aos obtidos com outras espécies de *Pereskia*, no tratamento com extratos metanólicos durante 72h. Asmaa e colaboradores (2014) reportaram uma baixa ação citotóxica de *P. saccharosa* sobre as linhagens MV4-11 (leucemia mieloide aguda - $IC_{50}=110 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e K562 (leucemia mieloide crônica) ($IC_{50}=130 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Enquanto em *P. grandifolia*, o efeito antitumoral sobre as células CEM-SS (leucemia linfobástica T) somente foi observado nas frações de hexano ($IC_{50}=15,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e diclorometano ($IC_{50}=29 \mu\text{g.mL}^{-1}$), não sendo observada atividade no extrato metanólico (ABDELWAHAB, 2013), após 72 h de tratamento. Resultados similares

foram verificados por Pinto e colaboradores (2012), onde o extrato metanólico de *P. aculeata* exibiu um baixo potencial antileucêmico na linhagem HL60, reduzindo apenas 25% da viabilidade celular.

É importante destacar que poucos estudos sobre substâncias com atividade antileucêmica relatam o potencial tóxico das suas amostras para as células mononucleares de sangue periférico de indivíduos sadios, as quais estariam mais próximas das células tumorais do estudo em questão (leucemias). O extrato metanólico das folhas cultivadas em campo de *P. aculeata* também reduziu a viabilidade das células mononucleares de sangue periférico estimuladas com PHA, apresentando IC_{50} próximo ($IC_{50}=48,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ao das células leucêmicas Jurkat ($IC_{50}=34,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e K562 ($IC_{50}=41,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Neste contexto, estudos utilizando fibroblastos como controle, sugerem que os extratos metanólicos da espécie em estudo apresentem maior citotoxicidade sobre as células normais do que suas frações, (SRI NUESTRI et al., 2008; 2009). No entanto, é importante lembrar que tais fibroblastos, apesar de não serem tumorais, constituem uma linhagem celular, que sofre mudanças nos processos de regulação de seu ciclo celular para se tornarem imortais, cuja sensibilidade não pode ser comparada a dos linfócitos e monócitos de sangue periférico, que não sofreram qualquer modificação. De outra forma, caso o extrato bruto seja realmente mais tóxico que suas frações, é possível sugerir que existam diferentes substâncias no extrato metanólico que contribuam de forma sinérgica para a citotoxicidade do mesmo, o que pode não ser observado com as frações, por se mostrarem menos complexas em sua composição, podendo apresentar um número reduzido ou não apresentar substâncias tóxicas às células normais.

Para a investigação das atividades antioxidantes e antitumorais nos extratos de *P. aculeata*, os materiais biotecnológicos selecionados foram os calos e as suspensões celulares sabidamente produtores de pigmentos da classe das betalaínas, como observado numa etapa deste trabalho, além da planta em campo e aclimatizada.

Tanto as culturas de calos como de células em suspensão foram mantidas em meio básico MS $\frac{1}{2}$ suplementado com $10 \mu\text{M}$ de Picloram (meio C), e em meios de cultura contendo o mesmo fitorregulador, porém com modificações nas concentrações salínicas (meios C4 e C8). O cultivo de calos e de CCS em meios MS contendo menor taxa de nitrogênio total e maior proporção de nitrato (meio C4) favoreceu o acúmulo de betalaínas nas culturas, tornando-as muito interessantes do ponto de vista fitoquímico e farmacológico.

As betalaínas constituem pigmentos nitrogenados hidrossolúveis, que conferem coloração violeta (betacianinas) ou amarela (betaxantinas) a flores, frutos e órgãos tuberosos de apenas 13 famílias botânicas, incluindo a família Cactaceae (AZEREDO, 2009). Dentre as

vantagens do uso de betalaínas como corantes naturais em relação às antocianinas, destacam-se a maior estabilidade frente à variação de pH, podendo ser empregadas em alimentos neutros ou levemente ácidos (STINTZING; CARLE, 2004; TANAKA et al., 2008), bem como sua maior biodisponibilidade, exercendo efeitos logo após sua absorção (PAVOKOVIC; KRSNIK-RASOL, 2011). Dentre as propriedades farmacológicas, as betalaínas são caracterizadas por apresentarem alto potencial antioxidante (GENTILE et al., 2004; TESORIERE et al., 2004 e 2005), anti-inflamatório (REDDY et al., 2005; PIETRZKOWSKI et al., 2010) e anticarcinogênico (SREEKANTH et al., 2007; VULIC et al., 2013).

Neste sentido, a investigação fitoquímica por CLAE-UV/-MS-IES revelou a presença de substâncias pertencentes à classe das betalaínas em todas as amostras investigadas, embora os compostos fenólicos tenham sido detectados apenas nas plantas obtidas *in vivo* e *ex vitro*. Os cromatogramas de todas as amostras indicaram a presença de uma substância predominante, com o mesmo tempo de retenção (112 min), que após análise no espectrômetro de massas determinou o sinal majoritário em 277,2 [M]⁺. Assim, considerando os resultados obtidos pelo espectrômetro de massas, as informações fornecidas pela base MassBank e os dados da literatura, pode-se inferir que a principal substância encontrada nas amostras trata-se de um derivado de betaxantina (um tipo de betalaína). Segundo diversos estudos, a degradação de vulgaxantina I, principal betaxantina, produz fragmentos com massa molecular 277, similar à observada neste estudo (HERBACH et al., 2004; LEE et al., 2005; GONÇALVES et al., 2015).

Diversos estudos apontam para uma estreita relação entre a produção de compostos fenólicos e a atividade antioxidante apresentada pelas espécies vegetais (MAIZURA et al., 2011; MOLDOVAN et al., 2011), embora esta propriedade possa estar sendo exercida por outros metabólitos (NIKI, 2011). Segundo Ramesh e colaboradores (2009), considerando que em condições naturais os polifenóis são produzidos em resposta ao estresse ambiental, torna-se comum observarmos a presença de baixas taxas destes compostos em plantas cultivadas *in vitro* em relação às plantas de campo (PARSAEIMEHR et al., 2010; SAGWAN et al., 2011; SINGH et al., 2011). Deste modo, apesar de muitos metabólitos especiais já terem sido produzidos a partir de diferentes sistemas biotecnológicos (SIMÕES-GURGEL et al., 2011; BISWAS et al., 2013), estudos indicam que a produção destas moléculas muitas vezes está associada à presença de células e tecidos especializados (ABOUZID et al., 2010; DIWAN et al., 2012). Neste caso, a ausência de compostos fenólicos nas culturas *in vitro* de *P. aculeata* pode ser justificada pelo fato dos calos e suspensões celulares constituírem tecidos desorganizados, os quais são cultivados sob condições químicas e físicas controladas e

adequadas, reduzindo o estresse e inibindo a síntese destes metabólitos.

De modo geral, as espécies da família Cactaceae apresentam elevada atividade antioxidante associada às altas taxas de betalaínas e polifenóis, obtidos principalmente a partir de frutos, cladódios e sementes de diversas espécies de *Opuntia sp.* (CAYUPÁN et al., 2011; MORALES et al., 2012; CHOUGUI et al., 2013). No gênero *Pereskia*, os extratos foliares de *P. bleo* e *P. grandifolia* exibiram alta atividade antioxidante associado ao elevado teor de polifenóis presentes na fração acetato de etila (SIM et al., 2010; HASSANBAGLOU et al., 2012). Analisando a contribuição destes metabólitos no potencial antioxidante dos frutos de *O. ficus-indica*, Dehbi e colaboradores (2013) verificaram uma alta correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo total de polifenóis ($R^2=0,96$), em comparação à quantidade de betaxantinas ($R^2=0,63$). Contudo, uma betacianina purificada a partir dessa espécie, induziu a apoptose na linhagem leucêmica K562 (SREEKANTH et al., 2007).

No presente estudo, é possível observar uma estreita relação entre a presença de betalaínas e compostos fenólicos e as atividades antioxidante e antitumoral, apresentadas pelas amostras de *P. aculeata*. Provavelmente, a presença de betalaínas e compostos fenólicos contribuem para o potencial antioxidante da espécie, uma vez que amostras obtidas de culturas *in vivo*, *ex vitro* e *in vitro* mostraram efeito nos ensaios de captura do radical DPPH, NO, ERO e da habilidade quelante de ferro II. Entretanto, podemos inferir que o potencial citotóxico sobre leucemias, detectados somente nas amostras de plantas de campo e aclimatizadas, deva estar relacionado à presença dos compostos fenólicos nestas amostras, ou ao sinergismo destes com as betalaínas.

A identificação de moléculas com ação antioxidante a partir de extratos vegetais torna-se muito relevante na busca de novas drogas com potencial antineoplásico, uma vez que o estresse oxidativo resulta em muitas injúrias celulares, incluindo lesões no DNA, que contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, como o câncer (ERDEMOGLU et al., 2006; KHOMDRAM; SINGH, 2011). Diante dos resultados alcançados pode-se inferir que a espécie *P. aculeata* constitui uma importante fonte de polifenóis e betalaínas com elevada atividade antioxidante e potencial antitumoral, favorecendo a sua exploração como alimento funcional.

5.5 Conclusões

Do que foi analisado no decorrer desta parte do trabalho, é possível concluir:

- Os extratos de folhas de plantas de campo e caule de plantas aclimatizadas apresentaram elevado potencial antioxidante pelo ensaio de captura do radical DPPH;
- A amostra obtida a partir de caule de plantas aclimatizadas mostrou maior capacidade quelante de ferro II, dentre todos os extratos testados;
- Atividade antioxidante também foi verificada nas culturas *in vitro* a partir dos testes de captura do DPPH e da capacidade quelante de ferro II, especialmente a partir das suspensões celulares;
- A amostra de caule de planta aclimatizada reduziu significativamente a produção intracelular de ERO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS;
- Extratos de plantas de campo apresentaram uma significativa redução na produção de NO nas células RWA 264.7 estimuladas com LPS, mostrando elevado potencial antioxidante e anti-inflamatório;
- O extrato foliar de plantas cultivadas a campo mostrou-se citotóxico para as linhagens tumorais (K562, Jurkat, PC-3, MCF7), enquanto as suspensões celulares em meio C foi a amostra mais ativa sobre a linhagem A549;
- As linhagens leucêmicas K562 e Jurkat foram as mais sensíveis aos efeitos citotóxicos dos extratos de folhas de plantas de campo;
- Análises fitoquímicas revelaram a presença de betalaínas em todas as amostras, enquanto compostos fenólicos foram verificados apenas nas plantas cultivadas *in vivo* e *ex vitro*;
- As betalaínas e os compostos fenólicos contribuem para o efeito antioxidante, enquanto o potencial antileucêmico parece estar associado aos compostos fenólicos isoladamente ou em associação com as betalaínas;
- *Pereskia aculeata* pode ser considerada uma importante fonte de substâncias com propriedades antioxidantes e antitumorais, as quais podem ser exploradas biotecnologicamente.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos diferentes estudos desenvolvidos neste trabalho com a espécie *Pereskia aculeata* Mill., podemos concluir que:

- ❖ A germinação *in vitro* e a micropropagação foram alcançadas com sucesso, produzindo plantas saudáveis, homogêneas, fenotipicamente normais e com alto teor proteico;
- ❖ Os protocolos usados para o estabelecimento das culturas de calos e de células em suspensão permitiram o elevado acúmulo de biomassa associado à alta produção de betalaínas.
- ❖ Os extratos obtidos de plantas de campo, aclimatizadas e dos materiais *in vitro* apresentaram elevado potencial antioxidante e antitumoral, associado à presença de betalaínas e polifenóis;
- ❖ A espécie pode ser considerada um vegetal nutracêutico, fonte de minerais, proteínas e metabólitos especiais, podendo ser recomendada na dieta usual e ser explorada biotecnologicamente, visando à produção de substâncias de interesse alimentício e farmacêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHAB, S.I. Anticancer, antioxidant and antibacterial activities of different extracts of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). **J. Jazan University-Appl Sci. Branch**, v.2, n.2, 2013.
- ABOUZID, S.F., EL-BASSUONY, A.A., NASIB, A., KHAN, S., QURESHI, J., CHOUDHARY, M.I.: Withaferin A production by root cultures of *Withania coagulans*. **Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.**, v.3, p.23-27, 2010.
- ABUD, H.F.; GONÇALVES, N.R.; PEREIRA, M.S.; PEREIRA, D.S.; REIS, R.G.E.; BEZERRA, A.M.E. Germination and morphological characterization of the fruits, seeds, and seedlings of *Pilosocereus gounellei*. **Braz. J. Bot.**, v.35, n.1, p.11-16, 2012.
- ABUD, H.F.; GONÇALVES, N.R.; REIS, R.G.E.; PEREIRA, D.S.; BEZERRA, A.M.E. Germinação e expressão morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pilosocereus pachycladus* Ritter. **Rev. Cien. Agron.**, v.41, p.468-474, 2010.
- ACQUAVIVA, R.; DI GIACOMO, C.; VANELLA, L.; SANTANGELO, R.; SORRENTI, V.; BARBAGALLO, I.; GENOVESE, C.; MASTROJENI, S.; RAGUSA, S.; IAUK, L. Antioxidant activity of extracts of *Momordica foetida* Schumach. et Thonn. **Molecules**, v.18, p.3241-3249, 2013.
- ADEYEMI, H.M.M. A review of secondary metabolites from plant material for post harvest storage. **Int. J. Pure Appl. Sci. Technol.**, v.6, n.2, p.94-102, 2011.
- ADIB, S.M.; RAHMAN, M.S.; RAHMAN, M.Z.; AHMED, K.S.; RASHID, M.A. Free radical scavenging activities of some indigenous plants of Bangladesh. **Bangladesh Pharm. J.**, v.13, n.1, p.68-70, 2010.
- AGBAIRE, P.O.; EMOYAN, O.O. Nutritional and antinutritional levels of some local vegetables from Delta State, Nigeria. **Afr. J. Food Sci.**, v.6, n.1, p.8-11, 2012.
- AGOSTINI-COSTA, T.S.; WONDRAECK, D.C.; ROCHA, W.S.; SILVA, D.B. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Rev. Bras. Frutic.**, v.34, n.1, p.234-238, 2012.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, p.472-508, 2008.
- AGRA, M.J.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, p.114-140, 2007.
- AKANNI, G.B.; DU PREEZ, J.C.; STEYN, L.; KILIAN, S.G. Protein enrichment of an *Opuntia ficus-indica* cladode hydrolysate by cultivation of *Candida utilis* and *Kluyveromyces marxianus*. **J. Sci. Food Agric.**, v.95, p.1094-1102, 2015.
- AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. Effect of zinc deficiency on betacyanin production in a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.65,

p.962-965, 2001.

AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.66, p.902-905, 2002.

AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.64, p.1807-1812, 2000.

AL KHATEEB, W.; HUSSEIN, E.; QOUTA, L.; ALU'DATT, M.; AL-SHARA, B.; ABUZAITON, A. *In vitro* propagation and characterization of phenolic content along with antioxidant and antimicrobial activities of *Cichorium pumilum* Jacq. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.1-8, n.110, p.103L-110, 2012.

ALBERT, C.M.; CAMPOS, H.; STAMPFER, M.J.; RIDKER, P.M.; MANSON, J.E.; WILLETT, W.C., MA, J. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. **New Engl. J. Med.**, v.346, p.1113-1118, 2002.

ALBUQUERQUE, M.G.P.T.; SABAA-SRUR, A.U.O.; FREIMAN, L.O. Composição centesimal e escore de aminoácidos em três espécies de 'ora-pro-nobis' (*Pereskia aculeata* Mill., *P. bleu* De Candolle e *P. pereskia* (L) Karsten). **Boletim SBCTA**, v.25, p.7-12, 1991.

ALI, A.; GULL, I.; NAZ, S.; AFGHAN, S. Biochemical investigation during different Stages of *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana*. **Pak. J. Bot.**, v.42, n.4, p.2827-2837, 2010.

ALIYU, B.S.; MUSTAPHA, Y. Effect of different media on the *in vitro* growth of cactus (*Opuntia ficus-indica*) explants. **Afr. J. Biotechnol.**, v.6, n.11, p.1330-1331, 2007.

ALLEGRA, M., FURTMULLER, P.G., JANTSCHKO, W., ZEDERBAUER, M., TESORIERE, L., LIVREA, M.A., OBINGER, C. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.332, p.837-844, 2005.

ALMEIDA, M.E.F.; CORRÊA, A.D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Rev. Ciênc. Rur.**, v.42, n.4, p.751-56, 2012.

ALMEIDA-FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do 'ora-pro-nobis' (*Pereskia aculeata* Mill.). **Rev. Ceres**, v.21, p.105-111, 1974.

ALTESOR, A.; EZCURRA, E.; SILVA, C. Changes in the photosynthetic metabolism during the early ontogeny of 4 cactus species. **Acta Ecol. Int. J. Ecol.**, v.13, n.6, p.777-785, 1992.

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, K. **Enciclopédia de plantas brasileiras**. São Paulo: Três, 1988.

AMARAL, C.F.; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Rev. Biotechnol.**, v.30, p.55-59, 2003.

AMID, A.; JOHAN, N.N.; JAMAL, P.; ZAIN, W.N.W.M. Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. **Afr. J. Biotechnol.**, v.10, n.81,

p.18653-18656, 2011.

AMPASAVATE, C.; OKONOGLI, S.; ANUCHAPREEDA, S. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v.4, n.1, p.13-21, 2010.

ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. 58.ed., Planaltina: Embrapa cerrados, 2002. 16p.

ANGAJI, S. A., MOUSAVI, S. F., BABAPOUR, E. Antioxidants: A few key points. **Ann. Biol. Res.**, v. 3, n.8, p.3968-3977, 2012.

ANGULO-BEJARANO, P.I.; PAREDES-LÓPEZ, O. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). **Sci. Horticult.**, v.128, p.283-288, 2011.

ANI, V.; VADARAJ, M.C.; KAN. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenol compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). **Eur. Food Res. Technol.**, v.224, p.109-115, 2006.

ANTOGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, v.78, p.345-52, 2007.

ARANDARCIKAITE. O.; JOKUBKA, R.; BORUTAITE, V. Neuroprotective effects of nitric oxide donor NOC-18 against brain ischemia-induced mitochondrial damages: role of PKG and PKC. **Neuroscience Lett.**, v.586, p.65-70, 2015.

ARAÚJO, T.V.; MOREIRA, W.J. Preliminary evaluation of the germination percentage and register of germination speed of seeds of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.6, n.9, 2010.

ASLAM, J.K.; SIDDIQUI, S.H.; FATIMA, Z.H.; MAQSOOD, Z.; BHAT, M.; NASIM, M.A.; ILHA, S.A.; AHMAD, A.; KHAN, I.Z.; MUJIB, S.A.; SHARMA, M.P. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: its applications and production. **Int. J. Comp. Pharm.**, v.4, n.12, p.1-16, 2010.

ASMAA, M.J.S.; AL-JAMAL, H.A.N.; ANG, C.Y.; ASAN, J.M.; SEENI, A.; JOHAN, M.F. Apoptosis induction in MV4-11 and K562 human leukemic cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) leaf crude extract. **Asian Pacific J. Cancer Prev.**, v.15, p.476-481, 2014.

ASTELLO-GARCÍA, M.G.; ROBLES-MARTÍNEZ, M.; BARBA-DE LA ROSA, A.P.; SANTOS-DÍAZ, M.D.S. Establishment of callus from *Opuntia robusta* Wendl., a wild and medicinal cactus, for phenolic compounds production. **Afr. J. Biotechnol.**, v.12, n.21, p.3204-3207, 2013.

AVILA-NAVA, A.; CALDERÓN-OLIVER, M.; MEDINA-CAMPOS, O.N.; ZOU, T.; GU, L.; TORRES, N.; TOVAR, A.R.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species *in vitro* and enhances plasma antioxidant capacity in humans. **J. Func. Foods**, v.10, p.13-24, 2014.

AZEREDO, H.M.C. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.44, p.2365-2376, 2009.

BALCH, E.P.M.; FIGUEROA, C.A.D. *In vitro* propagation of *pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. Strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.38, p.73-78, 2002.

BANDYOPADHYAY, U.; DAS, D.; BANERJEE, R.K. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis (review). **Curr. Sci.**, v.77, n.5, p.658-666, 1999.

BARROS, K.N.; GUIMARÃES, H.E.T.; SARTOR, C.P.; FELIPE, D.F. Desenvolvimento de uma pomada contendo extrato de *Pereskia aculeata*. In: **VI EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**, 2009. Disponível em: http://www.unicesumar.edu.br/epcc2009/anais/kellen_nobre_barros.pdf. Acesso em abril de 2012.

BASS, D.A.; PARCE, J.W.; DECHATELET, L.R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M.C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **J. Immunol.**, v.130, p.1910–1917, 1983.

BENJAMINS, R.; SCHERES, B. Auxin: the looping star of plant development. **Annu Rev. Plant Biol.**, v.59, p.443-465, 2008.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v.47, p.233-261, 1996.

BERLIN, J.; SIEG, S.; STRACK, D.; BOKERN, M.; HARMS, H. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.5, p.163-174, 1986.

BERNABÉ-ANTONIO, A.; ESTRADA-ZÚÑIGA, M.E.; BUENDÍA-GONZÁLEZ, L.; REYES-CHILPA, R.; CHÁVEZ-ÁVILA, V.M.; CRUZ-SOSA, F. Production of anti-HIV-1 calanolides in a callus culture of *Calophyllum brasiliense* (Cambes). **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.103, n.1, p.33-40, 2010.

BERRIOS, E.F.; GENTZBITTEL, L.; SERIEYS, H.; ALIBERT, G.; SARRAFI, A. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.59, p.65-69, 1999.

BHUIYAN, M.; MURAKAMI, K.; ADACHI, T. Variation in betalain content and factors affecting the biosynthesis in *Portulaca* sp. “Jewel’ ceel cultures”, **Plant Biotech.**, v.19, n.5, p.369-376, 2002.

BHUIYAN, N.H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **J. Plant Physiol.**, v.160, p.1117-1124, 2003.

BIANCO-COLOMAS, J. Qualitative and quantitative aspects of betalains biosynthesis in *Amaranthus caudatus* L. var *pendula* seedlings. **Planta**, v.149, p.176-180, 1980.

BIAVATTI, M.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, p.640-653, 2007.

BIRUEL, R.P.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. Germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. **Rev. Bras. Sem.**, v.29, n.3, p.151-159, 2007.

BISWAS, M.; DAS, S.S.; DEY, S. Establishment of a stable *Amaranthus tricolor* callus line for production of food colorant. **Food Sci. Biotechnol.**, v.22, S, p.1-8, 2013.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.588-594, 2009.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol. Rev.**, v.173, n.1, p.17-26, 2000.

BOHM, H.; BOHM, L.; RINK, E. Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.26, p.75-82, 1991.

BONFILL, M.; MANGAS, S.; MOYANO, E.; CUSIDO, R. M.; PALAZÓN, J. Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.104, p.61-67, 2011.

BOONSNONGCHEEP, P.; KORSANGRUANG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHINTAPAKORN, Y., SARALAMP, P.; PRATHANTURARUG, S. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.2, p.119-126, 2010.

BOTTA, B. et al. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p.354-379, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.7, n.72, p.248-54, 1976.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci. Technol.**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL, J.; JEREISSATI, E.; SANTOS, M.; CAMPOS, F. *In vitro* micropropagation of *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae). **J. Appl. Bot. Food Qual.**, v.79, p.160-162, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: MAPA/ACS, 2010.

BREGMAN, R.; GRAVENA, P. Subcuticular secretion by cactus seeds improves germination by means of rapid uptake and distribution of water. **Ann. Bot.**, v.80, p.525-531, 1997.

BROCKINGTON, S.F.; WALKER, R.H.; GLOVER, B.J.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. **New Phytologist**, v.190, p.854-864, 2011.

BRONZEA, M.R.; DUARTE, C.M.M. Antioxidant and anti-inflammatory activity of a flavonoid-rich concentrate recovered from *Opuntia ficus-indica* juice. **Food Funct.**, v.5, p.3269-3280, 2014.

BROWN, P.H.; CAKMAK, I.; ZHANG, Q. Form and function of zinc in plants. Chap. 7, In A.D. Robson (Ed). **Zinc in Soils and Plants**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 90-106, 1993.

BUCHNER, H.C.; HENGSTLER, P.; SCHINDLER, C.; MEIER, G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease - a meta analysis of randomized controlled trials. **Am. J. Med.**, v.112, p.298-304, 2002.

BURNHAM, R.J.; GRAHAM, A. The history of neotropical vegetation: new developments and status. **Ann. Miss. Bot. Gard.**, v.86, p.546-589, 1999.

BUTTERWORTH, C.; EDWARDS, E.J. Investigating *Pereskia* and the earliest divergences in Cactaceae. **Haseltonia**, v.14, p.46-53, 2008.

CAI, Z.; KASTELL, A.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. **Plant Cell Rep.**, v.31, n.3, p.461-477, 2012.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília: Ed. da Embrapa, v.1, p.87-132, 1998.

CAMPOS, D., NORATTO, G., CHIRINOS, R., ARBIZU, C., ROCA, W., CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz; Pavon), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). **J. Sci. Food Agric.**, v.86, p.1481-1488, 2006.

CANTRELL, C.L.; DAYAN, F.E.; DUKE, S.O. Natural products as sources for new pesticides. **J. Nat. Prod.**, v.75, n.6, p.1231-1242, 2012.

CARDARELLI, M.; BORGOGNONE, D.; COLLA, G. *In vitro* propagation of *Obregonia denegrii* Fric (Cactaceae). **Propag. Orn. Plant**, v.10, n.1, p.29-36, 2010.

CARDELLINA II, J.H.; FULLER, R.W.; GAMBLE, W.R.; WESTERGAARD, C.; BOSWELL, J.; MUNRO, M.H.G.; CURRENS, M.; BOYD, M.R. Evolving strategies for the selection, dereplication and prioritization of antitumor and hiv-inhibitory natural products extracts. In: BOHLIN, L.; BRUHN, J.G. (Eds.), **Bioassay Methods in Natural Product Research and Development**. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, p.25-36, 1999.

CARDOSO, A.L.; OLIVEIRA, G.G. Alimentos Funcionais. **Jornal Eletrônico da UFSC**, n.5, p.3-6, 2008. Disponível em: http://www.nutrijr.ufsc.br/jornal/jornal_eletronico_06-08.pdf. Acesso em junho 2012.

CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. **Molecules**, v.16, p.251-280, 2011.

CARVALHO, E.G.; SOARES, C.P.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; JOAQUIM, W.M. Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.24, p.677-682, 2014.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.R. **Fatores inerentes à Micropropagação**. Embrapa Algodão. Documentos, v.148, 2006. 28p.

CASANOVA, E.; MOYSSET, L.; TRILLAS, M.I. Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biol. Plant**, v.52, p.1-8, 2008.

CASEY, D.P.; RANADIVE, S.M.; JOYNER, M.J. Aging is associated with altered vasodilator kinetics in dynamic contracting muscle: Role of nitric oxide. **J. Appl. Physiol.**, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00787.2014>. Acesso em janeiro de 2015.

CASTANEDA, A.I.; GONZALEZ, S.J.; FRATI, M.A.C. Hypoglycemic effect of an *Opuntia streptacantha* Lemaire dialysate. **J. Prof. Assoc. Cactus Dev.**, v.2, p.73-75, 1997.

CASTELLAR, M.R.; OBON, J.M.; FERNANDEZ-LOPEZ, J. The isolation and properties of a concentrated red–purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. **J. Sci. Food Agric.**, v.86, p.122-128, 2006.

CASTELLAR, R.; OBON, J.M.; ALACID, M.; FERNANDEZ, L.J.A. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.2772-2776, 2003.

CASTRO, J.P.; ARAÚJO, E.R.; RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R. *In vitro* germination and disinfection of sweet cactus (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck). **Acta Scient. Agron.**, v.33, n.3, p.509-512, 2011.

CASTRO, T.C. **Germinação, micropropagação e perfil fitoquímico por CLAE da espécie medicinal *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae)**. Tese (Msc). Pós-Graduação em Biologia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2001.

CAXITO, M.L.C.; CORREIA, R.R.; GOMES, A.C.C.; JUSTO, G.; COELHO, M.G.P.; SAKURAGUI, C.M.; KUSTER, R.; SABINO, K.C.C. *In Vitro* Antileukemic Activity of *Xanthosoma sagittifolium* (Taioba) Leaf Extract. **Evidence-Based Complement. Altern. Med.**, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/384267>. Acesso em junho de 2015.

CAYUPÁN, C.Y.S.; OCHOA, M.J.; NAZARENO, M.A. Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. **Food Chem.**, v.126, p.514-519, 2011.

CEMELI, E.; BAUMGARTER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the comet assay. **Mutation Res.**, v.681, p.51-67, 2009.

CHAALAL, M.; LOUAILECHE, H.; TOUATI, N.; BEY, M.B. Phytochemicals, *in vitro* antioxidant capacity and antiradical potential of whole and ground seeds of three prickly pear varieties: a comparative study. **Ind. Crops Prod.**, v.49, p.386-391, 2013.

CHAKOLE R.; ZADE S.; CHARDE M. Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Beta vulgaris* Linn. roots. **Int. J. Biomed. Adv. Res.**, v.2, p.124-130, 2011.

CHATTOPADHYAY, S., FARKYA, S., SRIVASTAVA, A.K., BISARIA, V.S. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. **Biotech. Bioproc. Eng.**, v.7, p.138-149, 2002.

CHAVAN, J.J.; GAIKWAD, N.B.; UMDALE, S.D.; KSHIRSAGAR, P.R.; BHAT, K.V.; YADAV, S.R. Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis, molecular profiling, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Ceropegia santapau*. **Plant Growth Regul.**, v.72, n.1, p.1-15, 2014.

CHAVEZ-SANTOSCOY, R.A.; GUTIERREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDIVAR, S.O. Phenolic composition, antioxidant capacity and *in vitro* cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia spp.*) juices. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v.64, p.146-152, 2009.

CHEN, D.; ZHAO, Y.; BAI, S.; SHI, Z.; ZHANG, J. Effect of ginsenoside Rg3 on the progression of orthotopically xenotransplanted human breast cancer in nude mice and its mechanism. **J. Sichuan Univ. Med. Sci. Ed.**, v.34, p.546-548, 2003.

CHENG, J.S.; LEI, C.; WU, J.C.; YUAN, Y.J. Expression of arabinogalactan proteins involved in taxol production by immobilized *Taxus cuspidata* cells. **J. Biotechnol.**, v.133, n.1, p.96-102, 2008.

CHENG, X.Y.; WEI, T.; GUO, B.; NI, W.; LIU, C.Z. *Cistanche deserticola* cell suspension cultures: phenylethanoid glycosides biosynthesis and antioxidant activity. **Process. Biochem.**, v.40, p.3119-24, 2005.

CHETHANA, S.; NAYAK, C.A.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. **J. Food Eng.**, v.81, p.679-687, 2007.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chem.**, v.81, p.249-255, 2003.

CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITWER, F.G. Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. **Veterinaria México**, v.33, n.3, p.265-283, 2002.

CHO, J.Y.; PARK, S.C.; KIM, T.W.; KIM, K.S.; SONG, J.C.; KIM, S.K.; LEE, H.M.; SUNG, H.J.; PARK, H.J.; SONG, Y.B.; YOO, E.S.; LEE, C.H.; RHEE, M.H. Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, p.113-119, 2006.

CHOUGUI, N.; TAMENDJARI, A.; HAMIDJ, W.; HALLAL, S.; BARRAS, A.; RICHARD, T.; LARBAT, R. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. **Food Chem.**, v.139, p.796-803, 2013.

CHRISTENSEN, K.Y.; NAIDU, A.; PARENT, M.E.; PINTOS, J.; ABRAHAMOWICZ, M.; SIEMIATYCKI, J.; KOUSHIK, A. The risk of lung cancer related to dietary intake of flavonoids. **Nutr. Cancer**, v.64, p.964-974, 2012.

CLAYTON, P.W.; HUBSTENBERGER, J.F.; PHILLIPS, G.C.; BUTLER-NANCE, A. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribu Cactinae. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.115, p.337-343, 1990.

CLEMENT, J.S., MABRY, T.J. Pigment evolution in the Caryophyllales: A systematic overview. **Bot. Acta**, v.109, p.360-367, 1996.

CORNETT, J. **How Indians used desert plants**. Palm Springs: Nature Trails Press; 2000.

COSTA, L.C.B.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Comprimento da estaca e tipo de substrato na propagação vegetativa de atoveran. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1157-1160, 2007.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p.72-79, 2005.

CUI, X.H.; CHAKRABARTY, D.; LEE, E.J.; PAEK, K.Y. Production of adventitious roots and secondary metabolite by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Biosource Techn.**, v.101, p.4708-4716, 2010.

CUI, W.; ZHANG, Z.J.; HU, S.Q.; MAK, S.H.; XU, D.P.; CHOI, C.L.; WANG, Y.Q.; TSIM, W.K.; LEE, M.Y.; RONG, J.H.; HAN, Y.F. Sunitinib produces neuroprotective effect via inhibiting nitric oxide overproduction. **CNS Neurosc. Therap.**, v.20, p.244-252, 2014.

D'AVILA-FIGUEROA, C.A.; DE LA ROSA-CARRILLO, L.M.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). **In Vitro Cell. Dev. Plant**, v.41, p.540-545, 2005.

DAN, A.L.; WILSON, C.L. Comparative assessment of genetic and epigenetic variation among regenerants of potato (*Solanum tuberosum*) derived from long-term nodal tissue-culture and cell selection. **Plant Cell Rep.**, v.30, n.4, p.631-639, 2011.

DAS, L.; BHAUMIK, E.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Role of nutraceuticals in human health. **J. Food Sci. Technol.**, v.49, n.2, p.173-183, 2012.

DAU, L.; LABOURIAU, L.G. Temperature control of seed germination in *Pereskia aculeata* Mill. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.46, p.311-322, 1974.

DAVET, A.; VIRTUOSO, S.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; OLIVEIRA, A.B.; MIGUEL, O.G. Atividade antibacteriana de *Cereus jamacaru* DC, Cactaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.19, p.561-564, 2009.

DAVIES, K.M.; DEROLE, S.C. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.26, p.133-140, 2014.

DE KLERK, G.J. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In vitro Cell. Dev. Biol.**

Plant, v.38, p.415-422, 2002.

DE MEDEIROS, L.A.; DE RIBEIRO, R.C.S.; GALLO, L.A.; DE OLIVEIRA, E.T.; DEMATTÊ, M.E.S.P. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.84, p.165-169, 2006.

DE PALMA, C.; CLEMENTI, E. Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair. **Mol. Neurobiol.**, v.46, n.3, p.682-92, 2012.

DEBNATH, S.C. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Growth Regul.**, v.43, p.179-186, 2004.

DECKER, E.A.; WELCH, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food? **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, p.674-677, 1990.

DEHBI, F.; HASIB, A.; BOUAZIZ, M.; OUATMANE, A.; ELBATAL, H.; JAOUAD, A.; SAYADI, S. Effect of phenolic compounds and betalain pigments on the antioxidant capacity of Moroccan prickly pear juices. **Nat. Technol. Agron. Biolog. Sci.**, n.9, p.2-7, 2013.

DEHGHAN, E.; HAKKINEN, S.T.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; AHMADI, F.S. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.) **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.110, n.35-44, 2012.

DEIKMAN, J.; HAMMER, P.E. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, v.108, p.47-57, 1995.

DIAS, A.C.P.; PINTO, N.A.V.D.; YAMADA, L.T.P.; MENDES, K.L.; FERNANDES, A.G. Avaliação do consumo de hortaliças não convencionais pelos usuários das unidades do programa saúde da família de Diamantina-MG. **Alim. Nutr.**, v.16, n.3, p.279-284, 2005.

DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture alternative for metabolite production. **Biotechnol. Adv.**, v.13, n.3, p.425-453, 1995.

DIGUISEPPI, J.; FRIDOVICH, I. The toxicology of molecular oxygen. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.12, p.315-342, 1984.

DIWAN, R.; SHINDE, A.; MALPATHAK, N. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. *in vitro* culture lines. **J. Botany**, p.1-6, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/685427>. Acesso em março de 2013.

DONOHUE, K.; CASAS, R.R.; BURGHARDT, L.; KOVACH, K.; WILLIS, C.G. Germination, post germination adaptation, and species ecological ranges. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v.41, p.293-319, 2010.

DUARTE, M.R.; HAYASHI S.S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill.(Cactaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15, p.103-109, 2005.

[EBADA, S.S.](#); [EDRADA, R.A.](#); [LIN, W.](#); [PROKSCH, P.](#) Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nat.**

[Protoc.](#), v.3, n.12, p.1820-31, 2008.

EDWARDS, E.J.; DONOGHUE, M.J. *Pereskia* and the origin of the cactus life-form. **Am. Nat.**, v.167, n.6, 2006.

EDWARDS, E.J.; NYFFELER, R.; DONOGHUE, M.J. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. **Am. J. Bot.**, v.92, n.7, p.1177-1188. 2005.

EL FINI, A.; EL BOULLANI, R.; AABD, N.A.; MSANDA, F.; SERGHINI, M.A.; EL MOUSADIK, A. *In vitro* propagation of three moroccan prickly pear cactus *Opuntia* and plant establishment in soil. **Not. Sci. Biol.**, v.5, n.1, p.39-44, 2013.

EL FINI, A.; EL BOULLANI, R.; EL AYADI, F.; AIT AABD, N.; EL MOUSADIK, A. Micropropagation *in vitro* of *Opuntia ficus-indica* in south of Morocco. **IJCBS**, v.1, p.6-10, 2012.

EL-BELTAGI, H.S.; AHMED, O.K.; EL-DESOUKY, W. Effect of low doses γ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. **Rad. Phys. Chem.**, v.80, n.9, p.968-976, 2011.

ELLIOT, J.G. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. **Food Technol.**, v.53, p.46-48, 1999.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programme d cell death. **Toxicol. Pathol.**, v.35, p.495-516, 2007.

ER, H.M.; CHENG, E.; RADHAKRISHNAN, A.K. Anti-proliferative and mutagenic activities of aqueous and methanol extracts of leaves from *Pereskia bleo* (Kunth) DC leaves. **J. Ethnopharm.**, v.113, p.448-456, 2007.

ERDEMOGLU, N.; TURAN, N.N.; CAKÝCÝ, I.; SENER, B.; AYDÝN, A. Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts. **Phytother. Res.**, v.20, p.9-13, 2006.

EREJUWA, O.O.; SULAIMAN, S.A.; WAHAB, M.S.A.B. Honey: A Novel Antioxidant. **Molecules**, v.17, p.4400-4423, 2012.

ESMAEILI, A.K.; TAHA, R.M.; , MOHAJER, S.; BANISALAM, B. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from *in vivo* and *in vitro* grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). **BioMed Res. Int.**, Article ID 643285, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/643285>. Acesso em julho de 2013.

FAISAL, M.; SIDDIQUE, I.; ANIS, M. *In vitro* rapid regeneration of plantlets from nodal explants of *Mucuna pruriens*– a valuable medicinal plant. **Ann. Appl. Biol.**, v.148, n.1, p.1-6, 2006.

FAO. In: Inglese et al (eds) **Cactus pear cultivation and uses**. FAO Publ., Rome, 1996.

FAY, M.F.; GRATTON, J. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. **Bradleya**, v.10, p.33-48, 2010.

FERGUSON, P.J.; KUROWSKA, E.; FREEMAN, D.J.; CHAMBERS, A.F.; KOROPATNICK, D.J. A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. **J. Nutr.**, v.134, p.1529-1535, 2004.

FERREIRA, I.C.F.R., BARROS, L., ABREU, R.M.V. Antioxidants in wild mushrooms. **Curr. Med. Chem.**, v.16, p.1543-1560, 2009.

FEUGANG, J.M.; YE, F.; ZHANG, D.Y.; YU, Y.; ZHONG, M.; ZHANG, S.; ZOU, C. Cactus pear extracts induce reactive oxygen species production and apoptosis in ovarian cancer cells. **Nutr. Cancer**, v.62, p.692-699, 2010.

FLETCHER, A. **Lycopene colorant achieves regulatory approval**. 2006. Disponível em: <http://www.foodnavigator.com/news/ng.asp?n=64939-lycored-lycopene-colour>. Acesso em dezembro de 2012.

FLORA. S.J.S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxid. Med. Cell. Long.**, v.2, n.4, p.191-206, 2009.

FORKMANN, G.; MARTENS, S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.12, p.155-160, 2001.

FOSKET, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. Academic Press, Inc., London, 580p, 1994.

FRANCO, M.M.; GOMEZ, F.R.; TAMEZ, G.P.; CASTILLO, L.L.; RODRIGUEZ, P.C. *In vitro* immunopotentiating properties and tumour cell toxicity induced by *Lophophora williamsii* (peyote) cactus methanolic extract. **Phytotherapy Res.**, v.17, p.1076-1081, 2003.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.**, v.64, p.97-112, 1995.

FULDA, S.; EFFERTH, T. Selected secondary plant metabolites for cancer therapy. **Mod. Res. Chin. Mat. Med.**, v.1, n.1, p.24-28, 2014.

GACH, K.; DŁUGOSZ, A.; JANECKA, A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 388, p.477-486, 2015.

GALATI, E.M.; MONDELLO, M.R.; LAURIANO, E.R.; TAVIANO, M.F.; GALLUZZOL, M.; MICELI, N. *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Fruit juice protects liver from carbon tetrachloride induced injury. **Phytother. Res.**, v.19, p.796-800, 2005.

GALATI, E.M.; MONFORTE, M.T.; TRIPODO, M.M.; D'AQUINO, A.; MONDELLO, M.R. Antiulcer activity of *Opuntia ficus-indica* L. Mill. Cactaceae: ultrastructural study. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p.1-9, 2001.

GAMBORG, O.L., MILER, R.A., OJIMAK, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experim. Cell Res.**, v.50, p.151-158, 1968.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. Development of a

protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. **Phytochem. Anal.**, v.17, p.262-269, 2006.

GARCÍA-RUBIO, O.; MALDA-BARRERA, G. Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. **HortScience**, v.45, n.6, p.934-938, 2010.

GARCÍA-SAUCEDO, P.; VALDEZ-MORALES, M.; VALVERDE, M.E.; CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; PAREDES-LÓPEZ, O. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.80, p.215-219, 2005.

GENTILE, C.; TESORIERE, L.; ALLEGRA, M.; LIVREA, M.A.; D'ALESSIO, P. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1028, p.481-6, 2004.

GEORGE, E.F. Plant Tissue Culture Procedure - Background 1. In: GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE KLERK, G-J. (Eds) **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3ed. Springer, The Netherlands, p.1-28, 2008.

GEORGIEV, V.; ILIEVA, M.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant *in vitro* systems. **Acta Physiol. Plant.**, v.30, p.581-593, 2008.

GHAFFARI, A.; HASANIOO, T.; NEKOU EI, N.A. Micropropagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and effect of medium composition on proliferation and rooting. Int. J. Biosci., v.3, n.11, p.129-139, 2013.

GIBSON, A.C.; NOBEL, P.S. **The cactus primer**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1986.

GIRÃO, L.V.C.; SILVA FILHO, J.C.; PINTO, E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Avaliação da composição bromatológica de ora-pro-nóbis. **Horticult. Bras.**, v.21, n.2, Supl.2, 2003.

GIRARD-LALANCETTE, K.; PICHET, A.; LEGAULT, J. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: analysis of fruit and vegetable juice. **Food Chem.**, v.115, 2009.

GIRI, L.; DHYANI, P.; RAWAT, S.; BHATT, I.D.; NANDI, S.K.; RAWAL, R.S.; PANDE, V. *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. **Ind. Crops Prod.**, v.39, p.1-6, 2012.

GIROD, P.A.; ZRYD, J.P. Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures. **Plant Cell Rep.**, v.6, p.27-30, 1987.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

GOH, K.L. **Malaysian herbaceous plants**. Advanco Press: Malaysia, 2000.

GONÇALVES, A.S.M.; PEIXE, R.G.; SATO, A.; MUZITANO, M.F.; DE SOUZA, R.O.M.;

MACHADO, T.B.; AMARAL, A.C.F.; MOURA, M.R.L.; SIMAS, N.K.; LEAL, I.C.R. *Pilosocereus arrabidae* (Byles & Rowley) of the Grumari sandbank, RJ, Brazil: physical, chemical characterizations and antioxidant activities correlates to detection of flavonoids. **Food Res. Int.**, v.70, p.110-117, 2015.

GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. **Introduction to plant biochemistry**. Oxford: Pergamon, 1983. 677p.

GORDISH, K.L.; BEIERWALTES, W.H. Resveratrol induces acute endothelium-dependent renal vasodilation mediated through nitric oxide and reactive oxygen species scavenging. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v.306, p.F542-F550, 2014.

GORDON, M.H. **The mechanism of antioxidant action *in vitro***. In: B.J.F. Hudson (Ed.), Food antioxidants Elsevier Applied Science, London, p.1-18, 1990.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v.177, p.751-766, 1949.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOC, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]Nitrate in biological fluids. **Analytical Biochem.** v.126, p.131-138, 1982.

GRIESS, J.P. **Ber. Deutsch. Chem. Ges.**, v.12, p.426, 1879.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.3, n.51, p.227-234, 2005.

GUIMARÃES, H.E.T.; BARROS, K.N.; SARTOR, C.F.P.; PATRONI, S.M.S. Cultivo e avaliação do teor proteico das folhas de *Pereskia aculeata*. **V Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**, 2009.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAHM, S.W.; PARK, J.; SON, Y.S. Opuntia humifusa partitioned extracts inhibit the growth of U87MG humanglioblastoma cells. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v.65, p.247-252, 2010.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. **Adv. Pharmacol.**, v.38, p.3-20, 1997.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – *quo vadis?* **Trends pharmacol. Sci.**, v.32, n.3, p.125-130, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4th edition. Oxford: oxford university press, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, v.142, p.231-255, 2004.

- HAMAD, A.M.; TAHA, R.M. Effect of sequential subcultures on in vitro proliferation capacity and shoot formation pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Sci. Hortic.*, v.117, p.329-334, 2008.
- HAN, K.L.; LEE, Y.; SONG, J.H.; HWANG, Y.S.; LEE, W.S.; KIM, M.W.; KIM, S.H. Enhanced production and secretion of rutin and GABA in immobilized cells of mulberry tree (*Morus bombycis* K.). **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.108, p.513-520, 2012.
- HARLEV, E.; NEVO, E.; SOLOWEY, E.; BISHAYEE, A. Cacer preventive and curative attributes of plants of the Cactaceae family: A review. **Planta Med.**, v.79, p.713-722, 2013.
- HARRIS, E.D. Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB Journal**, v.6, n.9, p.2675-2683, 1992.
- HARTLEY A.J. Andean uplift and climate change. **J. Geolog. Soc.**, v.160, p.7-10, 2003.
- HASSANBAGLOU, B.; HAMID, A.A.; ROHEEYATI, A.M.; SALEH, N.M.; ABDULAMIR, A.; KHATIB, A.; SABU, M.C. Antioxidant activity of different extracts from leaves of *Pereskia bleo* (Cactaceae). **J. Med. Plants Res.**, v.6, n.15, v.2932, 2937, 2012.
- HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.45, p.51-88, 2005.
- HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. *In*: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.;
- HERBACH, K.M.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Impact of thermal treatment on colour and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. **J. Food Sci.**, v.69, n.6, p.C491-C498, 2004.
- HERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; WOOD, C.D.; CASTRO-OBREGÓN, S.; COVAR, L. Reactive oxygen species: A radical role in development? **Free Rad. Biol. Med.**, v.49, p.130-143, 2010.
- HERRERO, O.; MARTÍN, J.P.; FREIRE, P.F.; LÓPEZ, L.C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M.J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mut. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutag.**, v.743, n.1, p.20-24, 2012.
- HIGA, K.M.; RODRIGUES, L.R. ; FIOR, C.S. Germinação e Multiplicação de ora-pro-nobis - *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). *In*: V Jornada de Iniciação Científica - Meio Ambiente, Porto Alegre, 2009.
- HIROSE, M.; YAMAKAWA, T.; KODAMA, T.; KOMAMINE, A. Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. *Plant Cell Physiol.*, v.31, n.2, p.267-271, 1990.
- HOBBS, D.A.; KAFFA, N.; GEORGE, T.W.; METHVEN, L.; LOVEGROVE, J.A. Blood pressure-lowering effects of beetroot juice and novel beetroot-enriched bread products in normotensive male subjects. *Br. J. Nutr.*, v.108, p.2066-2074, 2012.

HOLLIS, H.; SCHEINVAR, L. **El interesante mundo de las cactáceas**. México: Fondo de Cultura Económica, 1995. 235p.

HONG, W.K.; SPORN, M.B. Recent advances in chemoprevention of cancer. **Science**, v.278, p.1073-1077, 1997.

HONÓRIO, I.C.G.; PINTO, V.B.; GOMES, J.A.O.; MARTINS, E.R. Influência de diferentes substratos na germinação de jambu (*Spilanthes oleracea* L. – Asteraceae). **Biotemas**, v.24, n.2, p.21-25, 2011.

HORAI, H.; ARITA, M.; KANAYA, S.; NIHEI, Y.; IKEDA, T.; SUWA, K.; OJIMA, Y.; TANAKA, K.; TANAKA, S.; AOSHIMA, K.; ODA, Y.; KAKAZU, Y.; KUSANO, M.; TOHGE, T.; MATSUDA, F.; SAWADA, Y.; HIRAI, M.Y.; NAKANISHI, H.; IKEDA, K.; AKIMOTO, N.; MAOKA, T.; TAKAHASHI, H.; ARA, T.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D.; NEUMANN, S.; IIDA, T.; TANAKA, K.; FUNATSU, K.; MATSUURA, F.; SOGA, T.; TAGUCHI, R.; SAITO, K.; NISHIOKA, T. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **J. Mass Spectrom.**, v. 45, n.7, p.703-14, 2010.

HUSSAIN, A.; QARSHI, I.A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. Plant tissue culture: current status and opportunities. *In*: Recent advances in plant *in vitro* culture, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-current-status-and-opportunities>. Acesso em maio de 2013.

HUSSAIN, T.M.D.; CHANDRASEKHAR, T.; RAMA GOPAL, G. High frequency shoot regeneration of *Sterculia urens* Roxb. an endangered tree species through cotyledonary node cultures. **Afr. J. Biotechnol.**, v.6, n. 14, p.1643-1649, 2007.

HÜTTENHAIN, R.; SOSTE, M.; SELEVSEK, N.; RÖST, H.; SETHI, A.; CARAPITO, C.; FARRAH, T.; DEUTSCH, E.W.; KUSEBAUCH, U.; MORITZ, R.L.; NIMÉUS-MALMSTRÖM, E.; RINNER, O.; AEBERSOLD, R. Reproducible quantification of cancer-associated proteins in body fluids using targeted proteomics. **Sci. Transl. Med.**, v.4, n.142, 142ra94, 2012.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Acesso em novembro de 2012.

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.96, p.145-150, 2005.

JAMES, O. Polyphenol compositions and antioxidant capacity: A comparison of ripe and unripe fruit extract of *Cissus multistriata* (Vitaceae) plant. **Int. J. Med. Med. Sci.**, v.2, n.5, p.133-137, 2010.

JO, E.H.; HONG, H.D.; AHN, N.C.; JUNG, J.W.; YANG, S.R.; PARK, J.S.; KIM, S.H.; LEE, Y.S.; KANG, K.S. Modulations of Bcl2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of licorite root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) in MCF-7 human breast cancer cell. **Agric. Food Chem.**, v.52, p.1715-1719, 2004.

JOMOVA, K.; LAWSON, M. GALA, L. Prooxidant effect of lycopene on triglyceride oxidation. **J. Microb. Biotech. Food Sci.**, v.1, p.942-948, 2012.

JOO, T.; SOWNDHARARAJAN, K.; HONG, S.; LEE, J.; PARK, S.Y.; KIM, S.; JHOO, J.W. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. **Saudi J. Biol. Sci.**, v.21, p.427-435, 2014.

KAÇAR, Y.A.; BIÇEN, B.; VAROL, I.; MENDI, Y.Y.; SERÇE, S.; CETINER, S. Gelling agents and culture vessels affect *in vitro* multiplication of banana plantlets. **Gene Mol. Res.**, v.9, n.1, p.416-424, 2010.

KADENBACH, B.; RAMZAN, R.; VOGT, S. Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function. **Trends Mol. Med.**, v.15, n.4, p.139-147, 2009.

KALIA, A.N. **Textbook of Industrial Pharmacognocny**, CBS publisher and distributor, New Delhi, p.204-208, 2005.

KAMESAKI, H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. **Int. J. Hematol.**, v.68, p.29-43, 1998.

KAPADIA, G.J.; AZUINE, M.A.; SRIDHAR, R.; OKUDA, Y.; TSURUTA, A.; ICHIISHI, E.; MUKAINAKE, T.; TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; NISHINO, H.; TOKUDA, H. Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. **Pharmacol. Res.**, v.47, p.141-148, 2003.

KAPADIA, G.J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H.; IWASHIMA, A.; NISHINO, H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein-Barr virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Lett.**, v.115, p.173-178, 1997.

KARIM, A.K.; SISINDARI. **Anticancer activity of methanol and hexane extract of *Pereskia grandifolia* haw leaves against human cervical (HeLa) cells line.** In: International Conference: Research and Application on Traditional Complementary and Alternative Medicine in Health Care, Surakarta, Indonesia, 2012. https://publikasiilmiah.ums.ac.id/bitstream/handle/11617/2297/7_Methanol%20and%20Hexane%20Extract%20of%20Pereskia.pdf?sequence=1. Acesso em setembro de 2014.

KARIMI, N.; MOFID, M.R.; EBRAHIMI, M.; KHAYYAM NEKOUEI, S.M. Effect of genotype, explant size and position on callus induction in *Cereus peruvianus* mill. (Cactaceae). **Trakia J. Sci.**, v.8, n.1, p.33-37, 2010.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **J. Med. Plant Res.**, v.3, p.1222-1239, 2009.

KAY, M.A. **Healing with plants in the American and Mexican West.** Tucson: The University of Arizona Press; 1996.

KHALAFALLA, M.M.; ABDELLATEF, M.M.; AHMED, M.; OSMAN, M.G. (2007) Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. **Int. J. Sustain Crop Prod.**, v.2, n.4, p.1-8, 2007.

KHATTAB, S.; EL SHERIF, F. Effect of growth regulators on *Carpobrotus edulis* rapid micropropagation and molecular analysis. **J. Am. Sci.**, v.7, n.9, p.511-520, 2011.

KHOMDRAM, S.D.; SINGH, P.K. Polyphenolic compounds and free radical scavenging activity in eight Lamiaceae herbs of Manipur. **Not. Sci. Biol.**, v.3, n.2, p.108-113, 2011.

KIM, J.S., LEE, S.Y.; PARK, S.U. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. **Afr. J. Biotechnol.**, v.7, n.20, 2008.

KIM, O.K.; MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; TAKEDA, N.; YOSHIZUMI, H.; OHIGASHI, H. Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.1557-1563, 2000.

KIRKINEZOSA, I.G.; MORAES, C.T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Cell Develop. Biol.**, v.12, p.449-457, 2001.

KISHIMA, Y.; SHIMAYA, A.; ADACHI, T. Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulacca* callus. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.43, p.67-70, 1995.

KLUGE, M.; TING, I.P. **Crassulacean acid metabolism: analysis of an ecological adaptation**. Springer, Berlin, 1978.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Trends Plant Sci.**, v.10, p.236-242, 2005.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H., HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicator: Diaminofluoresceins. **Anal. Chem.**, v.70, p.2446-53, 1998.

KOULAJIAN, K.; IVOVIC, A.; YE, K.; DESAI, T.; SHAH, A.; FANTUS, I.G.; RAN, Q.; GIACCA, A. Overexpression of glutathione peroxidase 4 prevents β -cell dysfunction induced by prolonged elevation of lipids *in vivo*. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.305, n.2 E254-E262, 2013.

KUGLER, F.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Annl, Bioanal. Chem.**, v.387, p.637-648, 2007.

KUMAR, J.K.; SINHA, A.K. Resurgence of natural colourants: a holistic view. **Nat. Prod. Lett.**, v.18, p.59-84, 2004.

KUMAR, S.; KANT, S.; PARASHAR, B. Nutraceuticals as important critical supplements. **Novel Science Int. J. Pharm. Sci.**, v.1, n.8, p.574-579, 2012.

KUMAR, V.; MURTHY, K.N.; BHAMID, S.; SUDHA, C.G.; RAVISHANKAR, G.A. Genetically modified hairy roots of *Withania somnifera* Dunal: a potent source of rejuvenating principles. **Rejuvenation Res.**, v.8, p.37-45, 2005.

KUO, C.I.; CHAO, C.H.; LU, M.K. Effects of auxins on the production of steroidal alkaloids in rapidly proliferating tissue and cell cultures of *Solanum lyratum*. **Phytochem. Anal.**, v. 23, p.400-404, 2012.

KUO, C.L.; CHANG, J.Y.; CHANG, H.C.; GUPTA, S.K.; CHAN, H.S.; CHEN, E.C.F.; TSAY, H.S. *In vitro* production of benzylisoquinoline from *Stephania tetrandra* through callus culture under the influence of different additives. **Bot. Studies**, v.52, p.285-294, 2011.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, Cromonas e Xantonomas. In: SIMÕES, C. O. S.; et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 537-556, 2003.

KUTCHAN, T.; DIXON, R.A. Physiology and metabolism: Secondary metabolism: Natures chemical reservoir under deconvolution. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.8, p.227-229, 2005.

LAIRON, D.; ARNAULT, N.; BERTRAI, S.; PLANELL, R.; CLERO, E.; HERCBERG, S.; BOUTRON-RUAULT, M-C. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.82, p.1185-1194, 2005.

LALLEMAND, D.; CURTO, M.; SAOTOME, I.; GIOVANNINI, M.; MCCLATCHEY, A.I. NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. **Genes Dev.**, v.17, p.1090-1100, 2003.

LE BEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, H. Evaluation of the probe 2'-7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v.5, p.227-31, 1992.

LE, K.; CHIU, F.; NG, K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. **Food Chem.**, v.105, p.353-363, 2007.

LEATHERS, R.; DAVIN, C.; ZRÝD, J. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. (red beet). **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.28, p.39-45, 1992.

LEE, C.H.; WETTASINGHE, M.; BOLLING, B.W.; JI, L.L.; PARKIN, K.L. Betalains, Phase II Enzyme-Inducing Components From Red Beet root (*Beta vulgaris* L.) Extracts. **Nutr. Cancer**, v.53, n.1, p.91-103, 2005.

LEE, J.A.; JUNG, B.G.; LEE, B.J. Inhibitory effects of *Opuntia humifusa* on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-ace- tate induced two-stage skin carcinogenesis. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v.13, p.4655-4660, 2012.

LEE, J.C.; KIM, H.R.; KIM, J.; JAM, Y.M. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.6490-696, 2002.

LEE, S.Y.; CHO, S.I.; PARK, M.H.; KIM, Y.K.; CHOI, J.E.; PARK, S.U. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). **Prep. Biochem. Biotechnol.**, v.37, p.239-46, 2007.

LEGHA, M.R.; PRASAD, K.V.; SINGH, S.K.; KAUR, C.; ARORA, A.; KUMAR, S. Induction of carotenoid pigments in callus cultures of *Calendula officinalis* L. in response to

- nitrogen and sucrose levels. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v.48, p.99-106, 2012.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. São Paulo, SP. 2005. 839p.
- LEMA-RUMINSKA, J.; GONCERZEWICZ, K.; GABRIE, M. Influence of abscisic acid and sucrose on somatic embryogenesis in cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *mostruosa*. **The Scientific. World J.**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/513985>. Acesso em outubro de 2011.
- LENG, C.E.; KENG, C.L. Induction of somatic embryogenic callus from the leaves of *Pereskia grandifolia*. **Biotechnol.**, v.6, n.1, p.45-48, 2007.
- LENOIR-WIJNKOOP, I.; SANDERS, M.E.; CABANA, M.D.; CAGLAR, E.; CORTIER, G.; RAYES, N.; SHERMAN, P.M.; TIMMERMAN, H.M. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. **Nutr. Rev.**, v.65, p.469-89, 2007.
- LENON, G.B.; LI, C.G., XUE, C.C.; THIEN, F.C.K.; STORY, D.F. Inhibition of inducible nitric oxide production and iNOS protein expression in lipopolysaccharide-stimulated rat aorta and Raw 264.7 macrophages by ethanol extract of a Chinese herbal medicine formula (RCM-101) for allergic rhinitis. **J. Ethnopharmacol.**, v.116, p.547-553, 2008.
- LERAY, C.; WIESEL, M.L.; FREUND, M.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, J. Long chain n-3 fatty acids specifically affect rat coagulation factors dependent on vitamin K: relation to peroxidative stress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.21, p.459-465, 2001.
- LESSA, M.A.; PAIVA, P.D.O.; ALVES, C.M.L.; RESENDE, M.L. Application of different fertilizers in substrate for *Kalanchoe luciae* Raym.-Hamet cultivation. **Ciênc. Agrotec.**, v.33, p.950-955, 2009.
- LEUENBERGER, B.E. *Pereskia, Maihuenia, and Blossfeldia* - Taxonomic History, Updates, and Notes. **Haseltonia**, v.14, p.54-93, 2007.
- LI, T.; ZIRPOLI, G.R.; JAYAPRAKASH, V.; REID, M.E.; MCCANN, S.E.; NWOGU, C.E.; ZHANG, Y.; AMBROSONE, C.B.; MOYSICH, K.B. Cruciferous vegetable intake is inversely associated with lung cancer risk among smokers: a case-control study. **BMC Cancer**, v.10, p.162, 2010.
- LI, X.; GAO, Y.; HAN, W.; LIN, J.; HU, Q.; CHEN, D. Antioxidant activity and mechanism in flower of *Hylocereus undatus* (Haw.) Britt. et Rose. **Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot.**, v.55, n.1, p.80-85, 2013.
- LIEW, S.Y.; STANBRIDGE, E.J.; YUSOFF, K.; SHAFEE, N. Hypoxia affects cellular responses to plant extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 144, p.453-456, 2012.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Braz. J. Pharm. Scienc.**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.
- LINDAHL, T. My Journey to DNA Repair. **Genom. Proteom. Bioinform.**, v.11, n.1, p.2-7, 2013.

LINSMAIER, E.F.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.18, p.100-127, 1965.

LIU, S.; SUN, J.; YU L.; ZHANG, C.; ZHU, F.; QU, M., YANG, Q. Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. **Food Chem.**, v.134, n.4, p.1885-1891, 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1995.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, n.1, p.265-75, 1951.

LUO, C.; ZHANG, W.; SHENG, C.; ZHENG, C.; YAO, J.; MIAO, Z. Chemical composition and antidiabetic activity of *Opuntia milpa alta* extracts. *Chem Biodivers.*, v.7, n.12, p.2869-79, 2010.

LUO, Y.; WANG, H.; XU, X.; MEI, W.; DAI, H. Antioxidant Phenolic Compounds of *Dracaena cambodiana*. **Molecules**, v.15, p.8904-8914, 2010.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat. Toxicol.**, v.101, n.1, p.13-30., 2011.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v.24, p.701-714, 2006.

MACHAKOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E.F. Plant growth regulators. I. Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. *In*: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J., editors. **Plant propagation by tissue culture**, The background. v.1. Dordrecht: Springer, p.175-204, 2008.

MADHAVI, D.; GAURI, A.; REDDY, V.D.; KAVI KISHOR, P.B. Carbohydrate and elicitor enhanced withanolide (withaferin A and withanolide A) accumulation in hairy root cultures of *Withania somnifera* L. **Ind. J. Exp. Biol.**, v.50, p.484-490, 2012.

MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; CRUZ-JAIME, S.; VALADEZ-VEGA, M.D.C.; SUMAYA-MARTÍNEZ, M.T.; PÉREZ-ÁVILA, K.G.; MORALES-GONZÁLEZ, J.A. The Chemoprevention of Chronic Degenerative Disease Through Dietary Antioxidants: Progress, Promise and Evidences. **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**, cap.7, p.155-185, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/52162>. Acesso em agosto de 2012.

MAIZURA, M.;AMINAH, A.;WANAJIDA,W.M. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. **I. Food Res. J.**, v.18, p.529-534, 2011.

MALDA, G.; SUZAN, H.; BACKHAUS, R. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. **Sci. Hort.**, v.81, p.71-87, 1999.

MALEK, S.N.; SHIN, S.K.; WAHAB, N.A.; YAACOB, H. Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. **Molecules**, v. 14, p.1713-1724, 2009.

MANKE, E. **Cactus**. s.l.: Barron's, 1998.

MARIATH, I.R.; FALCÃO, H.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SOUSA, L.C.F.; TOMAZ, A.C.A.; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.19, p.158-192, 2009.

MARTINEVSKI, C.S.; OLIVEIRA, V.R.; RIOS, A.O.; FLORES, S.H. VENZKE, J.G. Utilização de bertalha (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) e ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) na elaboração de pães. **Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr.**, v. 24, n. 3, p.1-6, 2013.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, O.; RUBLUO, A. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. **J. Hort. Sci.**, v.64, p.99-105, 1989.

MASSON, J.; LIBERTO, E.; BREVARD, H.; BICCHI, C.; RUBIOLO, P. A metabolomic approach to quality determination and authentication of raw plant material in the fragrance field. *Iris* rhizomes: a case study. **J. Chromat. A**, v.1368, n.14, p.143-154, 2014.

MASTUTI, R. **Role of *in vitro* system as continuous betalain sources**. Disponível em: <http://retnomastutibiologi.lecture.ub.ac.id/files/2012/06/paper-BaSic-2012-18-Feb.pdf>. Acesso em agosto de 2013.

MATHUR, M.; KAMAL, R. Studies on trigonelline from *Moringa oleifera* and its *in vitro* regulation by feeding precursor in cell cultures. **Braz. J. Pharmacog.**, v.22, n.5, p. 994 - 1001, 2012.

MATIAS, A.; NUNES, S.L.; POEJO, J.; MECHA, E.; SERRA, A.T.; MADEIRA, P.J.A.; MATKOWSKI, A. Antioxidant and anti-inflammatory activity of a flavonoid-rich concentrate recovered from *Opuntia ficus-indica* juice. **Food Funct.**, v.5, p.3269-3280, 2014.

MATKOWSKI, A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. **Biotechnol. Adv.**, v.26, p.548-560, 2008.

MAUSETH, J.D. Anatomical adaptations to xeric conditions in *Maihuenia* (Cactaceae), a relictual, leaf-bearing cactus. **J. Plant Res.**, v.112, p.307-315., 1999.

MAZIA, R.S.; SARTOR, C.F.P. Influência do tipo de solo usado para o cultivo de *Pereskia aculeata* sobre propriedade proteica. **Rev. Saúde Pesq.**, v.5, n.1, p.59-65, 2012.

MEDINI, F.; BOURGOU, S.; LALANCETTE, K.; SNOUSSI, M.; MKADMINI, K.; COTÉ, I.; ABDELLY, C.; LEGAULT, J.; KSOURI, R. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. **S. Afr. J. Bot.**, v.99, p.158-164, 2015.

MEGGOS, H. Food colours: An international perspective. **Manuf. Confect.**, v.75, p.59-65, 1995.

MERCÊ, A.L.R.; LANDALUZE, J.S.; MANGRICH, A.S.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M.R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} . **Biores. Technol.**, v.76, p.29-37, 2001.

MERTINS, P.; YANG, F.; LIU, T.; MANI, D. R.; PETYUK, V. A.; GILLETTE, M. A.; CLAUSER, K.R.; QIAO, J.W.; GRITSENKO, M.A.; MOORE, R.J.; LEVINE, D.A.; TOWNSEND, R.; ERDMANN-GILMORE, P.; SNIDER, J.E.; DAVIES, S.R.; RUGGLES, K.V.; FENYO, D.; KITCHENS, R.T.; LI, S.; OLVERA, N.; DAO, F.; RODRIGUES, H.; CHAN, D.W.; LIEBLER, D.; WHITE, F.; RODLAND, K.D.; MILLS, G.B.; SMITH, R.D.; PAULOVICH, A.G.; ELLIS, M. CARR, S.A. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. **Mol. Cell. Proteom.**, v.13, n.7, p.1690-1704, 2014.

MEWIS, I.; SMETANSKA, I.M.; MULLER, C.T.; ULRICHS, C. Specific Polyphenolic Compounds in Cell Culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.164, n.2, p.148-161, 2011.

MEYER, M.; PÉPIN, F.; SMITH, M.A.L. Anthocyanin production from *Vaccinium pahalae*: limitations of the physical microenvironment J.E. **J. Biotechnol.**, v.93, p.45-57, 2002.

MIHALTE, L.; SESTRAS, R.E.; FESZT, G. Methods to improve seed germination of Cactaceae species. **Bulgarian J. Agric. Sci.**, v.17, n.3, p.288-295, 2011.

MOEBIUS-GOLDAMMER, K.G.; MATA-ROSAS, M.; CHÁVEZ-AVILA, V.M. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. **In Vitro Cell. Dev. Plant**, v.39, p.388-393, 2003.

MOJICA, L.; MEJÍA, E.G. Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. **Plant Food. Hum. Nutr.**, v.70, n.2, p.105-112, 2015.

MOLDOVAN, L.; GASPAR, A.; TOMA, L.; CRACIUNESCU, O.; SAVIUC, C. Comparison of polyphenolic content and antioxidant capacity of five Romanian traditional medicinal plants. **Rev. De Chimie**, v.62, p.299-303, 2011.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, p.109-142, 1991.

MONDELLO, L. Nutraceuticals and separations. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.405, p.4589-90, 2013.

MORAES, P.L.R.; PAOLI, A.A.. The Morphology and establishment of seedlings of *Gryptocarya moschata* Nees, *Ocotea catharinensis* Mez e *Endlicheria paniculata* (Spreng) *Macbride lauraceae*. **Rev. Bras. Bot.**, v.22, n.2, p.287-295p, 1999.

MORALES, P.; RAMÍREZ-MORENO, E.; SANCHEZ-MATA, M.C.; CARVALHO, A.M.; FERREIRA, I.C.F.R. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xocostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C.Weber ex Diguet and *Opuntia matudae*

- Scheinvar) of high consumption in Mexico. **Food Res. Int.**, v.46, p.279-285, 2012.
- MORENO, D.A.; GARCIA-VIGUERA, C.; GIL, J.I.; GIL-IZQUIERDO, A. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. **Phytochem. Rev.**, v.7, p.261-280, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MOBHAMMER, M.R.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. **Innov. Food Sci. Emerg.**, v.6, p.221-231, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- MURCH, S.J., KRISHNARAJ, S., SAXENA, P.K. Phytopharmaceuticals: mass production, standard, and conservation. **Sci. Rev. Altern. Med.**, v.4, p.39-43, 2000.
- NAGELLA, P.; MURTHY, H.N. Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.104, p.119-124, 2011.
- NAKATSUKA, T.; YAMADA, E.; TAKAHASHI, H.; IMAMURA, T.; SUZUKI, M.; OZEKI, Y.; TSUJIMURA, I.; SAITO, M.; SAKAMOTO, Y.; SASAKI, N.; NISHIHARA, M. Genetic engineering of yellow betalain pigments beyond the species barrier. **Scientific Rep.**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep01970>. Acesso em janeiro de 2013.
- NARTOP, P.; AKAY, S.; GÜREL, A. Immobilization of *Rubia tinctorum* L. suspension cultures and its effect on alizarin and purpurin accumulation and biomass production. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.112, p.123-128, 2013.
- NASIM, S.A.; ASLAM, J.; KAPOOR, R.; KHAN, S.A. Secondary metabolites production through biotechnological intervention: A Review. **Emir. J. Food Agric.**, v.22, p.147-161, 2010.
- NEELWARNE, B. Red beet hairy root cultures. **Red Beet Biotech.**, p.199-249, 2012.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v.70, p 461-477, 2007.
- NICHOLAS, C.; BATRA, S.; VARGO, M.A.; VOSS, O.H.; GAVRILIN, M.A.; WEWERS, M.D.; GUTTRIDGE, D.C.; GROTEWOLD, E.; DOSEFF, A.I. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. **J. Immunol.**, v.179, p.7121-7127, 2007.
- NIKI, E. Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it? **J. Berry Res.**, v., n.4, p.169-176, 2011.

NOBEL, P.S. **Environmental Biology of Agaves and Cacti**. New York, NY: Cambridge University Press. 1988, 270p.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination - still a mystery. **Plant Sci.**, v.179, p.574-81, 2010.

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trend. Plant Sci.**, v.9, n.9, p.433-40, 2004.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.104, n.2, p.149-155, 2003.

OLIVEIRA, A.K.M.; SCHLEDER, E.D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (silva Manso) Benth. & Hook. F. ex. s. Moore. **Rev. Árvore**, v.30, p.25-32, 2006.

OLIVEIRA, D.M.T. Comparative Morphology of seedlings and young plants of native leguminous trees: species *Phaseoleae*, *Sophoreae*, *Swartzieae* and *Tephrosieae*. **Rev. Bras. Bot.**, v.24, n.1, p.85-97, 2001.

OROZCO-VILLAFUERTE, J.; BUENDÍA-GONZÁLEZ, L.; CRUZ-SOSA, F.; VERNON-CARTER, E.J. Increased mesquite gum formation in nodal explants cultures after treatment with a microbial biomass preparation. **Plant Physiol. Biochem.**, v.43, p.802-807, 2005.

OUELHAZI, L.; HAMDÍ S.; CHENIEUX, J.C.; RIDEAU, M. Cytokinin and auxin-induced regulation of protein synthesis and poly(A) RNA accumulation in *Catharanthus roseus* cell cultures. **J. Plant Physiol.**, v.144, p.167-174, 1994.

OZEKI, Y.; MATSUBA, Y.; ABE, Y.; UMEMOTO, N.; SASAKI, N. Plant pigments I: anthocyanins. In: Ashihara H, Crozier A, Komamine A (eds) **Plant metabolism and biotechnology**, p.343-372, 2011.

PACHER, P.; JOSEPH, S.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, v.87, p.315-424, 2007.

PAK, J.H.; KIM, T.; KIM, M.J.; KIM, J.Y.; CHOI, H.; KIM, S.A.; TCHAH, H. Reduced expression of l-cys peroxiredoxin in oxidative stress-induced cataracts. **Exp. Eye Res.**, v.82, p.899-906, 2006.

PALACIO, L.; CANTERO, J.J.; CUSIDÁ, R.; GOLENIOWSKI, M. Phenolic compound production by *Larrea divaricata* Cav. Plant cell cultures and effect of precursor feeding. **Process. Biochem.**, v.46, p.418-422, 2011.

PALAZON, J.; CUSIDO, R.M.; ROIG, C.; PINOL, M.T. Effect of rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. **Plant. Physiol. Biochem.**, v.35, p.155-162, 1997.

PAPAFOTIOU, M.; BALOSTIS, G.N.; LOUKA, P.T.; CHRONOPOULOS, J. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.65, p.163-167, 2001.

PARIDA, B.P.; MISRA, B.B. Is a plant's ploidy status reflected in its metabolome? **J. Postdoc. Res.**, v.3, n.4, 2015.

PARK, E.; KAHNG, J.; LEE, S.; SHIN, K. An anti-inflammatory principle from cactus. **Fitoterapia**, v.72, p.288-290, 2000.

PARSAEIMEHR, A.; SARGSYAN, E.; JAVIDNIA, K. A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of *Ephedra*. **Molecules**, v.15, n.3, p.1668-1678, 2010.

PATERSON, I.D.; DOWNIE, D.; HILL, M.P. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. **Biol. Control**, v.48, p.84-91, 2009.

PAVOKOVIC, D.; KRSNIK-RASOL, M. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. biotechnological production of betalains, **Food Technol. Biotechnol.**, v.49, n.2, p.145-155, 2011.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M. Dispersão de sementes de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae) num fragmento florestal no sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Biol.**, v.57, n.3, p.479-486, 1997.

PEREIRA, O.L.; BARRETO, R.W.; CAVALAZZI, J.R.P.; BRAUN, U. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* from Brazil with comments on the life-cycle of *Uromyces Pereskia*. **Fung. Divers.**, v.25, p.167-180, 2007.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; DÁVILA-FIGUEROA, C.A. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.38, p.73-78, 2002.

PERRON, N.R.; GARCÍA, C.R.; PINZÓN, J.R.; CHAUR, M.N.; BRUMAGHIM, J.L. Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. **J. Inorg. Biochem.**, v.105, p.745-753, 2011.

PETRUZZIELLO, L.; IACOPINI, F.; BULAJIC, M.; SHAH, S.; COSTAMAGNA, G. Review article: uncomplicated diverticular disease of the colon. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v.23, p.1379-1391, 2006.

PIATTELLI, M.; MINALE, L. Pigments of Centrospermae - II. Distribution of betacyanins. **Phytochem.**, v.3, p.547-557, 1964.

PIETRZKOWSKI, Z.; NEMZER, B.; SPÓRNA, A.; STALICA, P.; TRESHER, W.; KELLER, R.; JIMENEZ, R.; MICHAOWSKI, T.; WYBRANIEC, S. Influence of betalain-rich extract on reduction of discomfort associated with osteoarthritis. **New Medicine**, v.1, p.12-17, 2010.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLUCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. Sao Paulo: Varela, 2005.

PINTO, N.C.C.; DUQUE, A.P.N.; PACHECO, N.R.; MENDES, R.F.; MOTTA, E.V.S.; BELLOZI, P.M.Q.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. **Atividade antinociceptiva da partição hidrometanólica do extrato bruto das folhas de *Pereskia aculeata* Miller**. Disponível em: <http://sembiouffj2012.webnode.com/> Acesso em setembro de 2011.

PINTO, N.C.C.; SANTOS, R.C.; MACHADO, D.C.; FLORÊNCIO, J.R.; FAGUNDES, E.M.S.; ANTINARELLI, L.M.R.; COIMBRA, E.S.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. **Pharmacol. On line**, v.3, p.63-69, 2012.

POLAZZO-MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, p.765-791, 2004.

PRABU, S.L.; SURIYAPRAKASH, T.N.K.; KUMAR, C.D.; SURESHKUMAR, S.; RAGAVENDRAN, T. Nutraceuticals: A review. **I. Res. J. Pharm.**, v.46, p.8372-8377, 2012.

PRAKASH, S.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Hoslundia opposita* Vahl - a valuable medicinal plant. **S. Afr. J. Bot.**, v.73, n.1, p.60-63, 2007.

PREVIERO, C.A.; MARTINS, L.; FONSECA, R.H.A.; GROTH, D. Efeito dos tratamentos para superação da dormência em sementes de capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.) durante o armazenamento. **Rev. Bras. Sem.**, v.18, n.1, p.143-148, 1996.

QUIALA, E.; MATOS, J.; MONTALVO, G.; DE FERIA, M.; CHÁVEZ, M.; CAPOTE, A.; PÉREZ, N.; BARBÓN, R.; KOWALSKI, B. *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. **J. Prof. Assoc. Cactus Dev.**, v.11, p.18-25, 2009.

RADFAR, M.; SUDARSHANA, M.S.; NIRANJAN, M.H. Betalains from stem callus cultures of *Zaleya decandra* L. N. Burm. f. - A medicinal herb. **J. Med. Plants Res.**, v.6, n.12, p.2443-2447, 2012.

RAM, M.; PRASAD, K.V.; KAUR, C.; SINGH, S.K.; ARORA, A.; KUMAR, S. Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.104, p.171-179, 2011.

RAMESH, J.; ANSHUL, S.; JAT, B. L. Analysis of antioxidant activity in extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **J. App. Biosci.**, v.17, p.899-903, 2009.

RAMIREZ-MALAGON, R.; AGUILAR-RAMIREZ, I.; BORODANENKO, A.; PEREZ-MORENO, L.; BARRERA-GUERRA, J.; NUÑEZ-PALENIUS, H.G.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.43, p.660-665, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Pharmacology**. London: Church Hill Pub.1996.

RAO, S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary

metabolites. **Biotechnol. Adv.**, v.20, p.101-153, 2002.

RATES, S.M.K.; BRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. *In*: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS/Ed. da UFSC, p.685-710, 2007.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN S.E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2001. 906p.

REA, G.; ANTONACCIA, A.; LAMBREVAA, M.; PASTORELLIA, S.; TIBUZZIA, A.; FERRARIB, S.; FISCHERC, D.; JOHANNINGMEIERC, U.; OLESZEK, W.; DOROSZEWSKAD, T.; RIZZOE, A.M.; BERSELLIE, P.V.R.; BERRAE, B.; BERTOLIF, A.; PISTELLIF, L.; RUFFONIG, B.; CALAS-BLANCHARDH, C.; MARTYH, J.L.; LITESCUI, S.C.; DIACONU, M.; TOULOUPAKISJ, E.; GHANOTAKISJAND, D.; GIARDI, M.T. Integrated plant biotechnologies applied to safer and healthier food production: The Nutra-Snack manufacturing chain. **Trend. Food Sci. Technol.**, v.22, p.353-366, 2011.

REDDY, M.K.; EXANDER-LINDO, R.L.; NAIR, M.G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. **J. Agric. Food Chem.**, n.53, p.9268-73, 2005.

REIS, M.V.; PÊGO, R.G.; PAIVA, P.D.O.; ARTIOLI-COELHO, F.A.; PAIVA, R. Germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de plântulas de *Pilosocereus aurisetus* (Werderm.) Byles; G.D. Rowley (Cactaceae). **Rev. Ceres**, v.59, n.6, p.739-744, 2012.

REN, W.; ZHOU, H.; XIAN-JU, H.; GAO, Y. Anti-Inflammatory Effects of Bullatine A on LPS-Induced RAW264.7 Cells by Endoplasmic Reticulum Stress. **Interdiscip. J. Microinflammation**, v.1, n.2. <http://dx.doi.org/10.4172/ijm.1000123>. Acesso em fevereiro de 2015.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic. Biol. Med.**, v.49, p.1603-1616, 2010.

RITTLE, J.; GREEN, M.T. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science*, v.330, p.933-937, 2010.

RODRÍGUEZ LÓPEZ, C.M.; WETTEN, A.C.; WILKINSON, M.J. progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants. **New Phytol.**, v.186, p.856-868, 2010.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.**, v.92, p.235-254, 2005.

ROJAS-AREHCHIGA, M.; VÁZQUEZ-YANES C. Cactus seed germination: a review. **J. Arid Environ.**, v.44, p.85-104, 2000.

ROSA, S.M.; SOUZA, L.A. Morfo-anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). **Act. Scient.**, v.25, p.415-428,

2003.

ROSAS, M.S.L.; SILVA, B.N.M.; PINTO, R.G.M.P.; SILVA, B.V.; SILVA, R.A.; GUERRA, L.R.; SOARES G.C.M.T.; CASTRO, H.C; LIONE, V.O.F. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Rev. Virtual Quim.**, v.5, n.2, 2013.

ROWINSKY, E.K.; DONEHOWER, R.C. Paclitaxel (Taxol). **N. Engl. J Med.**, v.332, p.1004-1014, 1995.

RYAN, T.P.; AUST, S.D. The role of iron in oxygen mediated toxicities. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.22, p.119-141, 1992.

SADO, M. **Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva.** Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente - Instituto de Botânica, 2009.

SAENZ, C. *Opuntia spp.* Bioactive compounds in foods: a plus for health. **Acta Hortic.**, v.728, p.231-239, 2006.

SAGWAN, S.; RAO, D.V.; SHARMA, R.A. *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant activity and total phenolic content of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre: an important medicinal plant. **Int. J. Biotech.**, v.4, p.568-574, 2011.

SAITO, K.; MIZUKAMI, H. Plant cell cultures as producers of secondary compounds. **In Plant Biotechnology and Transgenic Plants.** Edited by Oksman-Caldentey, K.-M. & Barz, W.H. Marcel Dekker, New York. pp.77-109, 2002.

SAJID, Z.A.; AFTAB, F. Plant regeneration from in vitro-selected salt tolerant callus cultures of *Solanum tuberosum* L. **Pak. J. Bot.**, v.46, n.4, p.1507-1514, 2014.

SAJILATA, M.G.; SINGHAL, R.S. Isolation and stabilization of natural pigments for food applications. **Stewart Postharvest Rev.**, v.2, p.1-2, 2006.

SAKUTA, M. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. **Plant Biotechnol. Rep.** Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11816-013-0294-z>. 2013. Acesso em dezembro de 2013.

SAKUTA, M.; HIRANO, H.; KOMAMINE, A. Stimulation by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid of betacyanin accumulation in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiol. Plant.**, v.83, p.154-158, 1991.

SAKUTA, M.; OHMIYA, A. Plant pigments II: betacyanins and carotenoids. In: Ashihara H, Crozier A, Komamine A (eds) **Plant Metab. Biotechnol.**, p.343-372, 2011.

SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. Effects of sucrose of betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca Americana*. **Physiol. Plant.**, v.71, p.455-458, 1986.

SANAL-KUMAR P.; MATHUR V.L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum*

sativum. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.78, p.267-271, 2004.

SANDERS, M.E. Lactic acid bacteria as promoters of human health. *In*: Goldberg I (ed) Functional foods: designer foods, pharma- foods and nutraceuticals. **Chapman Hall**, p.294-322, 1994.

SANTORO, M.V.; NIEVAS, F.; ZYGADLO, J.; GIORDANO, W.; BANCHIO, E. Effects of growth regulators on biomass and the production of secondary metabolites in peppermint (*Mentha piperita*) micropropagated *in vitro*. **Am. J. Plant Sci.**, v.4, p.49-55, 2013.

SANTOS, T.C.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; MENEZES, M.M.L.A. Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). **Biosci. J.**, v.28, n.6, p.963-970, 2012.

SANTOS-DÍAZ, M.S.; MÉNDEZ-ONTIVEROS, R.; ARREDONDO-GÓMEZ, A.; Santos-Díaz, M.L. *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). **In vitro Cell. Dev. Biol.**, v.39, p.480-484, 2003.

SANTOS-DÍAZ, M.S.; VELÁSQUEZ-GARCÍA, Y.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.M. Pigment production by callus of *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae). **Agrociencia**, v.39, n.6, p.619-626, 2005.

SATO, K.; MOCHIZUKI, M.; SAIKI, I.; YOO, Y.C.; SAMUKAWA, K.; AZUMA, I. Inhibition of tumor angiogenesis and metastases by a saponin of *Panax ginseng*, ginsenoside-Rb2. **Biol. Pharm. Bull.**, v.17, p.635-639, 1994.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.81(suppl), p.215S-217S, 2005.

SCHEINVAR, L. **Cactáceas**. Flora Ilustrada Catarinense, Itajaí. Fascículo CACT: 1-383, 1985.

SCHENKEL, E.P. Saponinas. *In*: SIMÕES, C.M.O. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, p.711-40, 2007.

SCHLIEMANN, W.; KOBAYASHI, N.; STRACK, D. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. **Plant Physiol.**, v.119, p.1217-1232, 1999.

SCHOPF, J. W. The evolution of the earliest cells. **Sci. Am.**, v.239, p.110-112 (114, 116-120 passim), 1978.

SCHWARTZ, S.J.; VON ELBE, J.H. Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. **Food Chem. Toxicol.**, v.21, p.531-535, 1983.

SELBY, C.; LEE, R.; HARVEY, B.M.R. The effects of culture medium rigidity on adventitious bud production and tissue vitrification in needle cultures of sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). **New phytologist.**, v.113, p.203-210, 1989.

SHAHNEH, F.Z.; VALIYARI, S.; BARADARAN, B.; ABDOLALIZADEH, J.; BANDEHAGH, A.; AZADMEHR, A.; HAJIAGHAEI, R. Inhibitory and cytotoxic activities

of *Salvia officinalis* L. extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis. **Adv. Pharm. Bull.**, v.3, p.51-55, 2013.

SHEDBALKAR, U.U.; ADKI, V.S.; JADHAV, J.P.; BAPAT, V.A. *Opuntia* and other cacti: applications and biotechnological insights. **Tropical Plant Biol.**, v.3, n.3, p.136-150, 2010.

SHEKHAWAT, M.S.; SHEKHAWAT, N.S. Micropropagation of *Arnebia hispidissima* (Lehm) DC. and production of alkanin from callus and cell suspension culture. **Acta Physiol. Plant.**, v.33, p.1445-1450, 2011.

SHETTY, A.A.; RANA, M.K.; PREETHAM, S.P. Cactus: a medicinal food. **J. Food Sci. Technol.**, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0462-5>. Acesso em março de 2013.

SHIBATA, N.; KOBAYASHI, M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Brain Nerve**, v.60, n.2, p.157-170, 2008.

SHIMADA, S.; OTSUKI, H.; SAKUTA, M. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the Caryophyllales. **J. Exp. Bot.**, v.58, p.957-967, 2007.

SHIMADA, S.; TAKAHASHI, K.; SATO, Y.; SAKUTA, M. Dihydroflavonol 4-reductase cDNA from non-anthocyanin-producing species in the Caryophyllales. **Plant Cell Physiol.**, v.45, p.1290-1298, 2004.

SHIN, K.S. CHAKRABARTY, D.; KO, Y.J.; HAN, S.S.; PAEK, K.Y. Sucrose utilization and mineral nutrient uptake during hairy root growth of red beet (*Beta vulgaris* L.) in liquid culture, **Plant Growth Reg.**, n.39, p.187-193, 2003.

SHIRLEY, B.W. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol.**, v.126, p.485-493, 2001.

SHISHKOVA, S.; GARCÍA-MENDOZA, E.; CASTILLO-DÍAZ, V.; MORENO, N.E.; ARELLANO, J.; DUBROVSKY, J.G. Regeneration of roots from callus reveals stability of the developmental program for determinate root growth in Sonoran Desert Cactaceae. **Plant Cell Rep.**, v.26, p.547-557, 2007.

SHUKLA, M.R.; JONES, A.M.P.; SULLIVAN, J.A.; LIU, C.; GOSLING, S.; SAXENA, P.K. *In vitro* conservation of American elm (*Ulmus americana*): potential role of auxin metabolism in sustained plant proliferation. **Can. J. For. Res.**, v.42, p.686-697, 2012.

SIDIK, N.J.; NORIHAN, M.S.; SHAFII, K. *In vitro* culture of *Pereskia bleo*. **Acta Horticult.**, v.829, p.99-104, 2009.

SIERAKOWSKI, M.R.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; CORREA, J.B.C. Some structure features of a heteropolysaccharide from the leaves of the cactus *Pereskia aculeate*. **Phytochem.**, v.26, p.1709-1713, 1987.

SILVA JÚNIOR, A.A. Ora-pro-nóbis: nutracêutico, protetor e construtor. **Agropecuária Catarinense**, v.21, n.1, 2008.

SILVA, E.O.; LOCATELLI, M.; ROSULAPOETINI, M.; PINHEIRO, F. C.; MISSAU, F.C.

Avaliação do potencial antioxidante de *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nobis) frente ao DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v.4, n.2, 2012.

SILVA, N.C.B.; MACEDO, A.F.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A.; SATO, A. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation, growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v, 48, n.5, p.779-786, 2005.

SILVEIRA, L.R. Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.48 n.6, p.812-822, 2004.

SIM, K.S., SRI NURESTRI, A.M., NORHANOM, A.W. Phenolic content and antioxidant activity of crude and fractionated extracts of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae). **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v.4, p.193-201, 2010.

SIMIRGIOTIS, M.J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques. **J. Food Comp. Anal.**, v.23, p.545-553, 2010.

SIMÕES, C.; BIZARRI, C.H.B.; CASTRO, T.C.; COUTADA, L.C.M.; SILVA, A.J.R.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiol. Biochem.**, v.47, p.895-903, 2009.

SIMÕES, C.; DE MATTOS, J.C.P.; SABINO, K.C.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; COELHO, M.G.P.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L. Medicinal potential from *in vivo* and acclimatized plants of *Cleome rosea*. **Fitoterapia**, v.77, p.94-99, 2006.

SIMÕES-GURGEL C.; CORDEIRO, L.S.; CASTRO, T.C.; CALLADO, C.H.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Establishment of anthocyanin-producing cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl ex DC (Capparaceae). **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v.106, p.537-545, 2011.

SINGH, S.; TANWER B. S.; KHAN, M. *In vivo* and *in vitro* comparative study of primary metabolites of *Commiphora wightii* (Arnott.) Bhandari. **Int. J. App. Biol. Pharm. Technol.**, v.2, p.162-166, 2011.

SMALL, E.; CATLING, P.M. Blossoming treasures of biodiversity 11. Cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) - miracle of water conservation. **Biodivers.**, v.5, n.1, p.27-31, 2004.

SMETANSKA, I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v.111, p.187-228, 2008.

[SMITH, P.K.](#); [KROHN, R.I.](#); [HERMANSON, G.T.](#); [MALLIA, A.K.](#); [GARTNER, F.H.](#); [PROVENZANO, M.D.](#); [FUJIMOTO, E.K.](#); [GOEKE, N.M.](#); [OLSON, B.J.](#); [KLENK, D.C.](#) Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v.150, n.1, p.76-85, 1985.

SMULDERS, M.J.M.; KLERK, G.J.D. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regul.**, v.63, p.137-146, 2011.

SON, J.E.; LEE, B.H.; NAM, T.G.; IM, S.; CHUNG, D.K.; LEE, J.M.; CHUN, O.K.; KIM, D.O. Flavonols from the ripe fruits of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten protect neuronal PC-12 cells against oxidative stress. **J. Food Biochem.**, v.38, p.518-526, 2014.

SPASIC, M.; MILIC, B.; OBRENOVIC, S. Superoxide dismutase activity versus betacyanin induction under continuous red illumination in *Amaranthus* seedlings. **Biochem. Physiol. Plant**, v.180, p.319-322, 1985.

SQUENA, A.P.; SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; MUDEL, G. Análise morfoanatômica de partes vegetativas aéreas de *Pereskia aculeata* Mill., Cactaceae. **Cadernos da Escola de Saúde**, v.8, p.189-207, 2012.

SREEKANTH, D.; ARUNASREE, M.K.; ROY, K.R.; CHANDRAMOHAN, T.; REDDY, G.V.; REDDANNA, P. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. **Phytomed.**, v.14, p.739-746, 2007.

SREELEKSHMI, R.; LATHA, P.G.; ARAFAT, M.M.; SHYAMAL, S.; SHINE, V.J.; ANUJA, G.I.; SUJA, S.R.; RAJASEKHARAN. Antiinflammatory, analgesic and anti-lipid peroxidation studies on stem bark of *Ficus religiosa* Linn. **Nat Prod Rad.**, v.6, p.377-381, 2007.

SRI NURESTRI, A.B.; NORHANOM, A.W.; HASHIM, Y.; SIM, K.S.; HONG, S.L.; LEE, G.S.; SYARIFAH, N.S.A.R. Cytotoxic activity of *Pereskia bleo* (Cactaceae) against selected human cell lines. **Int. J. Cancer Res.**, v.4, p.20-27, 2008.

SRI NURESTRI, A.M.; KIM, K.S.; NORHANOM, A.W. Phytochemical and Cytotoxic investigations on *Pereskia grandiflora* Haw. (Cactaceae) leaves. **J. Biol. Sci.**, v.9, n.5, p.488-493, 2009.

STILES, A.R.; LIU, C.Z. Hairy Root culture: bioreactor design and process intensification. **Adv. Biochem. Eng. Biotech.**, 2013.

STINTZING, F.C.; CARLE, R. Betalains in food: occurrence, stability, and postharvest modifications. In: Socaciu C (eds) **Food colorants: chemical and functional properties**. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton/London, p.277-302, 2008.

STOSCHECK, C. Quantification of Protein. **Method. Enzymol.**, v.182, p.50-68, 1990.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochem.**, v.62, p.247-269, 2003.

SU, ZUSHANG. Anthocyanins and Flavonoids of *Vaccinium* L. **Pharm. Crops**, v.3, p.7-37, 2012.

SUGIHARTO, B.; SUGIYAMA, T. Effects of nitrate and ammonium on gene expression of

phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. **Plant Physiol.**, v.98, n.4, p.1403-1408, 1992.

SUN, L.; SU, H.; ZHU, Y.; XU, M. Involvement of abscisic acid in ozone-induced puerarin production of *Pueraria thomsonii* Benth. suspension cell cultures. **Plant Cell. Rep.**, v.31, p.179-185, 2012.

TADHANI, M.B.; PATEL, V.H.; SUBHASH, R. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **J. Food Compos. Anal.**, v.20, p.323-9, 2007.

TAIRA, J.; NANBU, H.; UEDA, K. Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb on LPS-induced RAW264.7 macrophages. **Food Chem.**, v.115, p.1221-1227, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.ed. Tradução Eliane Romanato Santarém ...[et al]. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

TAKEITI, C.Y.; ANTONIO, G.C.; MOTTA, E.M.P.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; PARK, K.J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.60, S1, p.148-160, 2009.

TAN, M.L.; SULAIMAN, S.F.; NAJIMUDDIN, N.; SAMIAN, M.R.; TENGKU MUHAMMAD, T.S. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. **J. Ethnopharm.**, v.96, p.287-294, 2005.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant J.**, v.54, p.733-749, 2008.

TANG, Z.; RAO, L.; PENG, G.; ZHOU, M.; SHI, G.; LIANG, Y. Effects of endophytic fungus and its elicitors on cell status and alkaloid synthesis in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **J. Med. Plants Res.**, v.5, p.2192-2200, 2011.

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. **Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 2005.

TERASHIMA, M.; KAKUNO, Y.; KITANO, N.; MATSUOKA, C.; MURASE, M.; TOGO, N.; WATANABE, R.; MATSUMURA, S. Antioxidant activity of flavonoids evaluated with myoglobin method. **Plant Cell Rep.**, v.31, p.291-298, 2012.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais: Morfogênese e crescimento *in vitro***. 1ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2005.

TERRAZAS SALGADO, T.; MAUSETH, J.D. Shoot anatomy and morphology. In: Nobel PS, ed. **Cacti: biology and uses**. Berkeley, CA: University of California Press, 23-40, 2002.

TESORIERE, L.; ALLEGRA, M.; BUTERA, D.; LIVREA, M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.80, p.941-945, 2004a.

TESORIERE, L.; BUTERA, D.; ALLEGRA, M.; FAZZARI, M.; LIVREA, M.A. Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. **J. Agric. Food**

Chem., n.53, p.1266-70, 2005.

TESORIERE, L.; BUTERA, D.; PINTAUDI, A.M.; ALLEGRA, M.; LIVREA, M.A. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.80, p.391-395, 2004b.

THEIL, E.C. Ferritin iron minerals are chelator targets, antioxidants, and coated, dietary iron. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1202, p.197-204, 2010.

TIWARI, P.; KUMAR, A.; BALAKRISHNANA, S.; KUSHWAHAA, H.S.; MISHRA, K.P. Radiation-induced micronucleus formation and DNA damage in human lymphocytes and their prevention by antioxidant thiols. **Mutation Res**, v. 676, p.62-68, 2009.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: SPI, v.1, p.11-19, 1998.

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: Ed. da Embrapa, 2000.

TRIPATHY, G.; PRADHAN, D. Evaluation of *in-vitro* anti-proliferative activity and *in vivo* immunomodulatory activity of *Beta vulgaris*. **Asian J. Pharm. Clin. Res.**, v.6, Suppl.1, p.127-130, 2013.

UMBRELLO, M.; DYSON, A.; FEELISCH, M.; SINGER, M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. **Antioxid. Redox Signal**, v.19, n.14, p.1690-1710, 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.39, p.44-84, 2007.

VANDENBUSSCHE, F., HABRICOT, Y., CONDIFF, A.S., MALDINEY, R., VAN DER STRAETEN, D., AND AHMAD, M. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, v.49, p.428-441, 2007.

VANISREE, M.; LEE, C.Y.; LO, S.F.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H.S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v.45, p.1-22, 2004.

VARJDA, R.; VARJDA, T. The effect of cytokinin type and concentration and number of subcultures on the multiplication rate of some decorative plants. **Proceed. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol.**, v.50, p.22-32, 2001.

VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. Cell death in development. **Cell**, v.96, p.245-254, 1999.
VELIKY, Y.A.; ROSE, D. Nitrate of ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. **Can. J. Bot.**, v.51, p.1837-1844, 1973.

VENUGOPALA, K.N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed. Res. Int.** Article ID 963248, 2013.

VERMA, A.K.; SINGH, R.R.; SINGH, S. Improved alkaloid content in callus culture of *Catharanthus roseus*. **Botânica SERBICA**, v.36, n.2, p.123-130, 2012.

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochem. Rev.**, v.1, p.13-25, 2002.

VIDAL, A.M.; DIAS, D.O.; MARTINS, E.S.M.; OLIVEIRA, R.S.; NASCIMENTO, R.M.S.; CORREIA, M.G.S. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Cadernos de Graduação**. v.1, n.15, p.43-52, 2012. Disponível em: https://periodicos.set.edu.br/index.php/caderno_biologicas/article/view/284. Acesso em março de 2012.

VIÑAS, M.; FERNÁNDEZ-BRENES, M.; AZOFEIFA, A.; JIMÉNEZ, V.M. In vitro propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.48, p.469-477, 2012.

VISCONTI, R.; GRIECO, D. New insights on oxidative stress in cancer. **Curr. Opin. Drug Discov. Dev.**, v.12, p.240-245, 2009.

VOGELSANG, K.; SCHNEIDER, B.; PETERSEN, M. Production of rosmarinic acid and a new rosmarinic acid 3-O-beta-D-glucoside in suspension cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis* Paton. **Planta**, v.223, p.369-73, 2006.

VON ELBE, J.H. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. F3.1.1-F3.1.7, 2001.

VON ELBE, J.H.; SCHWARTZ, S.J. Absence of mutagenic activity and short-term toxicity study of beet pigments as food colorants. **Arch. Toxicol.**, v.49, p.93-98, 1981.

VUJOVIĆ, T.; RUŽIĆ, D.J.; CEROVIĆ, R. In vitro shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. **Hort. Sci.**, v.39, n.3, p.101-107, 2012.

VULIC, J.J.; CEBOVIC, T.N.; CANADANOVIC, V.M.; CETKOVIC, G.S.; DJILAS, S.M.; CANADANOVIC-BRUNET, J.M., et al. Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. **Food Funct.**, v.4, p.713-21, 2013.

WAKHLU, A.K.; BAHU, S.B. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. **In Vitro Cell. Dev. Plant**, v.36, p.211-214, 2000.

WALLACE, T.C. Anthocyanins in cardiovascular disease. **Adv. Nutr.**, v.2, p.1-7, 2011.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chem.** v.116, p.240-248, 2009.

WEN, L.; YOU, L.; YANG, X.; YANG, J.; CHEN, F.; JIANG, Y.; YANG, B. Identification of phenolics in litchi and evaluation of anticancer cell proliferation activity and intracellular

antioxidant activity. **Free Rad. Biol. Med.**, v.84, p.171-184, 2015.

WESTON, L.A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. **J. Chem. Ecol.**, v.39, p.283-297, 2013.

WHELTON, S.P.; HYRE, A.D.; PEDERSEN, B.; YI, Y.; WHELTON, P.K.; HE, J. Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta analysis of randomized, controlled clinical trials. **J. Hypertens.**, v.23, p.475-481, 2005.

WILLIAM, W.N. JR.; HEYMACH, J.V.; KIM, E.S.; LIPPMAN, S.M. Molecular targets for cancer chemoprevention. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.8, p.213-25, 2009.

WU, C.T.; VANISREE M.; SATISH M.N.; CHEN, C.L.; YANG, T.F.; TSAY, H.S. Isolation and quantitative analysis of cryptotanshinone, an active quinoid diterpene formed in the callus of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, n.6, p.845-848, 2003.

WU, Y.; RUI, W.; ZHANG, B.; JIANG, T.; LI, N.; QIAN, K.; LIU, B.; ZHANG, J. Epigenetic instability in genetically stable micropropagated plants of *Gardenia jasminoides* Ellis. **Plant Growth Regul.**, v.66, p.137-143, 2012.

WYLER, H.; DREIDING, A.S. Kristallisiertes Betanin. **Helv. Chim. Acta.**, v.40, p.191-192, 1957.

XIAO, W.H.; CHENG, J.S.; YUAN, Y.J. Spatial-temporal distribution of nitric oxide involved in regulation of phenylalanine ammonialyase activation and taxol production in immobilized *Taxus cuspidata* cells. **J. Biotechnol.**, v.39, n.3, p.222-228, 2009.

YAMAGUCHI, T.; TAKANURA H.; MATOBA, T.; TERAJO, J. HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of food by using 1, 1-diphenyl-2-Picryl hydrazyl **Biosc. Biotech. and Biochem.**, v.62, p.1201-1202, 1998.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos Métodos existentes. **Quim. Nova**, v.21, n.6, p.787-793, 1998.

ZHAO, J.Z.; CAO, J.; COLLINS, H.L.; BATES, S.L.; ROUSH, R.T.; EARLE, E.D.; SHELTON, A.M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants Proceed. **Nat. Acad. Sci. USA**, v.102, p.8426-8430, 2005.

ZOU, D.M.; BREWER, M.; GARCIA, F.; FEUGANG, J.M.; WANG, J.; ZANG, R.Y.; LIU, H.G.; ZOU, C.P. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. **Nutr. J.**, v.4, n.25, p.75-95, 2005.

ZRŮD, J.P.; CHRISTINET, L. BETALAINS. In: Davies K (eds) Plant pigments and their manipulation. **Annu. Plant Rev.**, v.14, p 185-213, 2004.

ZUGHAIER, S.M.; SHAFER, W.M.; STEPHENS, D.S. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. **Cell Microbiol.**, v.7, p. 1251-1262, 2005.

ZULAK, K.G.; LISCOME, D.K.; ASHIHARA, H.; FACCHINI, P.J. Alkaloids. In: CROZIER, A., CLIFFORD, M.N., ASHIHARA, H. (Eds.), **plant secondary metabolites: occurrence structure, and role in the human diet**. Blackwell, Oxford, p.102-136, 2006.



Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable

Débora de Aguiar Lage¹ · Matheus da Silva Tirado¹ · Shade Ribeiro Vanicore¹ · Kátia Costa de Carvalho Sabino² · Norma Albarello¹

Received: 14 January 2015 / Accepted: 2 April 2015 / Published online: 10 April 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Betalains are hydrophilic pigments found in Caryophyllales species, considered important as food colorants, a source of essential amino acids and as a phyto-medicine. Pigmented friable calluses were induced from leafy cotyledon and hypocotyl segments of *Pereskia aculeata* Mill. cultivated on MS basal medium supplemented with 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid (Picloram). The highest callus biomass accumulation with reddish-pink pigmentation was achieved in cultures initiated from hypocotyl explants on medium supplemented with 10 μ M Picloram. Instead of improving callus proliferation, the use of Picloram together with either 6-Benzylaminopurine or Kinetin induced cell oxidation. In contrast, the use of half-strength MS medium ($\frac{1}{2}$ MS) with Picloram supplementation resulted in the proliferation calli, and the pigments were characterized as betalains. Betalain production was enhanced on modified MS medium (30 mM total nitrogen and 1:4 or 1:8 ratio of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$). Cell suspension cultures were established in liquid media after transfer of 1 g of betalain-producing calli which had been

kept on $\frac{1}{2}$ MS medium with 10 μ M Picloram. After 15 days of culture, cell suspensions achieved eight-fold increase in biomass accumulation. Cell suspensions were maintained through three subcultures for 12–16 days through the exponential growth phase. The in vitro system that induced the highest betalain content and biomass accumulation was achieved from cell suspension cultures on modified MS (1:4 ratio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$). Therefore, this study established an efficient protocol for betalain and biomass accumulation from callus and cell suspensions of *P. aculeata* Mill. under the same culture conditions, thus providing a new source of betalain production for commercial purposes.

Keywords Cactaceae · Nutraceutical · Nitrogenous pigments · Picloram · Tissue culture

Abbreviations

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	6-Benzylaminopurine
DW	Dry weight
FW	Fresh weight
KIN	Kinetin
NAA	Naphthalene acetic acid
Picloram	4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid
TDZ	Thidiazuron

✉ Débora de Aguiar Lage
deboraalage@yahoo.com.br

¹ Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, PHLC, Sala 509, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ CEP 20550-013, Brazil

² Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Boulevard 28 de Setembro, 87, Fundos, 4º Andar, PAPC, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ CEP 20550-170, Brazil

Introduction

During the past few decades, increasing concerns over human health have altered consumers' buying habits, leading to the prohibition of a large number of synthetic

substances and increased demand for the use of plant pigments as natural colorants in foods, drugs, and cosmetics (Pavokovic and Krsnik-Rasol 2011; Sakuta 2013).

Betalains are water-soluble nitrogenous vacuolar pigments comprised of the red-purple betacyanins and the yellow betaxanthins (Azeredo 2009), which provide color to various roots, flowers, and fruits (Gandía-Herrero et al. 2006; Kugler et al. 2007; Castellanos-Santiago and Yahia 2008), while, at the same time, acting to protect against UV radiation (Sakuta 2013). Betalains have significant taxonomic and evolutionary value (Brockington et al. 2011) based on their mutual exclusivity with anthocyanins, which are not found in the same plants (Clement and Mabry 1996; Gandía-Herrero and García-Carmona 2013), and their restriction to thirteen families of the order Caryophyllales, including Cactaceae species (Strack et al. 2003).

Pereskia aculeata Mill., a native cactus found in the Americas, has edible and highly nutritious leaves resulting from the presence of high-protein arabinogalactan biopolymers, as well as amino acid and mineral content (Mercê et al. 2001; Takeiti et al. 2009). In traditional medicine, *P. aculeata* leaves are used in the treatment of inflammatory conditions and in burn cases (Sartor et al. 2010), while its fruits are used as an expectorant and for anti-syphilitic purposes (Rosa and Souza 2003). In addition, leaf extracts have shown antioxidant (Souza et al. 2014) and analgesic potential (Pinto et al. 2012).

Recently, increasing interest has been shown in the use of betalains as food colorants, since they are chemically stable over a larger pH range (Tanaka et al. 2008), can be used as a source of essential amino acids (Delgado-Vargas et al. 2000), and possess antioxidant (Tesoriere et al. 2004a, b), anti-inflammatory (Allegra et al. 2005; Campos et al. 2006), hepatoprotective (Galati et al. 2005), and anticarcinogenic (Kapadia et al. 1997, 2003; Sreekanth et al. 2007) properties.

The chemical synthesis of betalains has, thus far, been unsuccessful because the multiple steps involved in the synthesis of betalamic acid can result in low yield of the final product (Gandía-Herrero et al. 2006). Currently, these pigments are uniquely obtained from *Beta vulgaris* L. in the form of powders and/or concentrates produced using well-established protocols for production and extraction (Sajilata and Singhal 2006; Chethana et al. 2007; Stintzing and Carle 2008).

In this sense, biotechnological techniques constitute valuable tools for the study of cells, tissues, organs, or whole plants. The modulation of chemical and physical conditions of the cultures allows a homogeneous production of secondary metabolites with high yield under controlled conditions (Rao and Ravishankar 2002; Vanisree et al. 2004). In vitro betalain production from different plant tissue culture techniques has been achieved in several

species of Chenopodiaceae, Cactaceae, and Amaranthaceae (Moßhammer et al. 2005; Castellar et al. 2006; Moreno et al. 2008), with emphasis on hairy roots (Pavlov et al. 2003; Savitha et al. 2006), calluses (Trejo-Tapia et al. 2008; Biswas et al. 2013) and cell suspension cultures (Akita et al. 2002; Bhuiyan et al. 2002).

In the present work, we aimed to establish an efficient protocol for callus and cell suspension cultures for *P. aculeata* Mill. to offer a new source of natural betalains with high biomass under controlled in vitro conditions.

Materials and methods

Plant material

Seeds of *P. aculeata* Mill. obtained from mature fruits donated by the Sítio Flora Bioativas do Sertão do Valongo (Porto Belo, State of Santa Catarina, Brazil) were disinfected with 2 % NaOCl (sodium hypochlorite) solution plus 0.05 % Tween 80 for 20 min and then washed three times in sterile distilled water. The seeds were inoculated in test tubes containing 10 mL MS basal medium (Murashige and Skoog 1962) with 30 g L⁻¹ sucrose and solidified with 8 g L⁻¹ agar (Merck). The test tubes were closed with double-aluminum caps and kept in a growth chamber at 26 ± 2 °C under 16 h photoperiod, which was provided by cool-white fluorescent tubes (45 μmol m⁻² s⁻¹). Seedlings grown in vitro were used as source of explants for callus induction.

Establishment of callus cultures

Leaf blade and cotyledons (1 cm²) and hypocotyl (1 cm) segments from 50-day-old seedlings grown in vitro were inoculated into culture flasks (65 mm × 85 mm) containing 30 mL of MS basal medium with the addition of 30 g L⁻¹ sucrose and supplementation of naphthalene acetic acid (NAA); 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); or 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid (Picloram) at different concentrations (0, 2, 4, 10 or 20 μM). In a second experiment, explants more suited to callus induction were cultivated in MS media with the addition of either 6-benzylaminopurine (BA) or kinetin (KIN) at low rates (0.2, 0.4, 1 or 2 μM).

Media were adjusted to pH 5.8 prior to adding agar (8 g L⁻¹, Merck), closed with polypropylene caps and autoclaved (121 °C, 104 kPa) for 15 min. All cultures were kept in a growth chamber in the same physical conditions described above. Five culture flasks containing four explants each were cultured per treatment, and each experiment was repeated twice. The calluses were subcultured to fresh culture medium with the same

composition at 21-day intervals. Callus biomass accumulation was estimated after three subcultures based on fresh (FW) and dry (DW) weight measurements. Dry mass was obtained after drying at 45 °C to constant weight.

Betalain identification, extraction and quantification

Initial identification of pigments produced from callus cultures was performed by submitting samples of pigmented calluses to saturated atmosphere with vapors of hydrochloric acid (acid pH) or ammonium hydroxide (alkaline pH). Since anthocyanins and betalains exhibit mutual exclusivity, this methodology allows the identification of betalain pigments based on color maintenance, irrespective of pH variation. Calluses of *Cleome rosea* Vahl, producing anthocyanins (Simões et al. 2009) were used as control.

Stock pigmented calluses were extracted with 80 % methanol during 30 min, filtered, and centrifuged at 4000 rpm for 10 min, and then the concentrated extract of betalains was obtained. Betalain quantification was performed according to the protocol described by Von Elbe (2001), in which absorbance is measured at 538 nm to calculate betanin concentration (main betacyanin) and at 476 nm to calculate vulgaxanthin-I content (main betaxanthin). Total betalain concentration was obtained from the sum of betacyanin and betaxanthin concentrations present in the extracts.

Modulation of pigment production

Aiming to increase the pigment production from cultures, stock calluses were cultivated on media with modifications in mineral, vitamin and amino acid composition and concentration.

In the first experiment, stock pigmented calluses were transferred to “high betalain” (HB) medium, as proposed by Akita et al. (2002), in order to optimize the in vitro betalain production in *Beta vulgaris* L., the main source of botanical material commercially used to extract betacyanin for food coloring. This medium was produced from modifications to the LS basal medium (Linsmaier and Skoog 1965) with respect to nitrogen total concentration (30 mM) and the ratio of ammonium to nitrate (1:14), in addition to changes in microelements, such as 100-fold reduction in the zinc rate (0.0003 mM) and the absence of copper and cobalt.

In the second experiment, pigmented calluses were transferred to MS basal medium containing 30 mM of total inorganic nitrogen and different ratios of NH_4^+ to NO_3^- (1:4; 1:8), compared to the 1:2 ratio found in the original MS medium.

Calluses were subcultured every 3 weeks and evaluated after three subcultures for biomass accumulation and betalain content. Twelve flasks containing calluses were cultured per treatment, and each experiment was repeated three times.

Establishment of cell suspension cultures

Pigmented friable calluses that proliferated in 1/2 MS stock medium were used to initiate cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. Samples of 1 g of callus were transferred to liquid MS media with the same composition as that used for callus proliferation. Media were adjusted to pH 5.8 prior to autoclaving (121 °C, 104 kPa) for 15 min, and afterwards, media were dispensed into 125 mL Erlenmeyer flasks (30 mL of culture medium per flask) and closed with double-aluminum caps. Suspension cultures were incubated on a gyratory shaker (114 rpm) under the same physical conditions as those for callus culture. Five flasks were used per treatment, and the assays were repeated three times.

To determine cell growth kinetics, the cultures were evaluated during a 40-day period, where cell biomass accumulation was estimated by measurement of fresh (FW) and dry (DW) weights from three culture flasks chosen at random. Dry mass was determined after drying the cells at 45 °C to constant weight. Every 4 days, cells were harvested by filtering through a nylon mesh (45 μm) using a filter unit (Nalgene™ Cat. No. 320-2533) connected to a vacuum pump (GAST® Manufacturing). Thus, each point of the cell growth curve represents the mean of three independent samples. After the establishment of growth kinetics, cell suspensions were subcultured in the exponential growth phase, aiming to ensure a high biomass production. Furthermore, in order to determine the period of greatest betalain accumulation in the cultures, total betalain content was evaluated along the growth curve of the cell suspensions.

Cell suspension cultures were also initiated from callus biomass cultivated on MS media modified with 30 M total nitrogen and ratios of 1:4 or 1:8 of NH_4^+ to NO_3^- .

All cell suspensions were evaluated during three subcultures to determine the biomass production, and betalain accumulation was quantified after the third subculture.

Statistical analysis

The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), and the differences among means were tested by the Tukey test at 5 % level of significance ($p \leq 0.05$), using the statistical program GraphPad Prism 5.

Results

Callus cultures

Callus induction was only observed in response to the growth regulator Picloram. After 3 weeks of culture, hypocotyl explants became swollen with reddish-pink coloration, while leaf blade and cotyledon segments showed oxidation and the development of small calogenic formation at the cut ends. Leaf blade and cotyledon explants kept on media supplemented with 2,4-D presented direct rhizogenesis, while the hypocotyl segments showed no morphogenic response. The absence of morphogenic response was also observed in all explants cultured in the presence of NAA.

All explants cultured on MS media containing Picloram exhibited the formation of friable calluses of light beige coloration with the presence of many reddish-pink regions. However, complete calogenic formation of tissues was observed only in cultures initiated from hypocotyls, while calluses induced from leaf blade segments were not evaluated as a result of low explant response rate. After three subcultures, the highest biomass accumulation (4.496 ± 0.56 g) was obtained in cultures maintained on MS medium supplemented with 20 μ M Picloram, but without significant difference from calluses that proliferated on media containing 10 μ M Picloram (3.922 ± 0.33 g) (Table 1).

The use of BA or KIN with Picloram did not result in satisfactory callus proliferation in *P. aculeata* Mill. in that biomass production did not surpass the values obtained from cultures kept on cytokinin-free media (Table 2). Moreover, the calluses induced on media with cytokinins were not completely friable and showed browning areas, compared to calluses obtained on media containing only Picloram.

Although the calluses produced on media supplemented with Picloram were friable, cultures on medium with 10 μ M Picloram showed reddish-pink coloration, while the calluses that proliferated on MS medium containing 20 μ M Picloram were predominantly non-pigmented, showing only a light beige aspect. Therefore, calluses produced on MS medium

Table 2 Effects of Picloram combined with BA or KIN on callus biomass accumulation of *P. aculeata* Mill. from hypocotyl explants after three subcultures

Growth regulators (μ M)			Biomass accumulation (g)	
Picloram	BA	KIN	Fresh weight	Dry weight
2	0.2		$3.191 \pm 0.27a$	$0.281 \pm 0.14a$
4	0.4		$3.318 \pm 0.38a$	$0.314 \pm 0.33a$
10	1		$3.701 \pm 0.55a$	$0.380 \pm 0.21a$
20	2		$2.305 \pm 0.24b$	$0.192 \pm 0.30b$
2		0.2	$0.942 \pm 0.36c$	$0.077 \pm 0.25c$
4		0.4	$1.214 \pm 0.38c$	$0.108 \pm 0.08c$
10		1	$1.232 \pm 0.26c$	$0.113 \pm 0.13c$
20		2	$1.410 \pm 0.14c$	$0.136 \pm 0.20c$

Data represent mean \pm standard deviation

Same letters on each column are not significantly different by Tukey test at 5 %

supplemented with 10 μ M Picloram were maintained in stock, aiming to evaluate metabolite production.

During the subcultures of stock calluses, an increase in biomass accumulation was observed in the days preceding the next subculture, just after the depletion of nutrient concentration in the medium. Based on this development, calluses were transferred to half-strength MS medium ($1/2$ MS) during subsequent subcultures. During these subcultures, pigmented areas of the calluses were mechanically isolated and cultured in fresh medium aiming to produce calogenic biomass with an increasingly homogeneous pigmentation (Fig. 1a).

Calluses of *P. aculeata* Mill. maintained the reddish-pink color when submitted to alkaline and acid atmosphere, respectively. Since betalains are restricted to the order Caryophyllales and are stable in a broad pH range, it is suggested that these callus cultures of *P. aculeata* Mill. did, in fact, produce betalains.

In order to increase betalain production, pigmented stock calluses were transferred to HB medium with

Table 1 Callus biomass production from hypocotyl and leafy cotyledon explants of *P. aculeata* Mill. inoculated on MS media supplemented with different concentrations of Picloram after 63 days of culture

Picloram (μ M)	Biomass production (g)			
	Hypocotyl		Leafy cotyledon	
	Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight
2	$1.022 \pm 0.17c$	$0.093 \pm 0.14c$	$0.679 \pm 0.23a$	$0.054 \pm 0.14a$
4	$2.368 \pm 0.08b$	$0.198 \pm 0.12b$	$0.753 \pm 0.33a$	$0.086 \pm 0.19a$
10	$3.922 \pm 0.33a$	$0.406 \pm 0.10a$	$1.150 \pm 0.28a$	$0.109 \pm 0.22a$
20	$4.496 \pm 0.56a$	$0.431 \pm 0.09a$	$0.914 \pm 0.30a$	$0.082 \pm 0.11a$

Data represent mean \pm standard deviation

Same letters on each column are not significantly different by Tukey test at 5 %

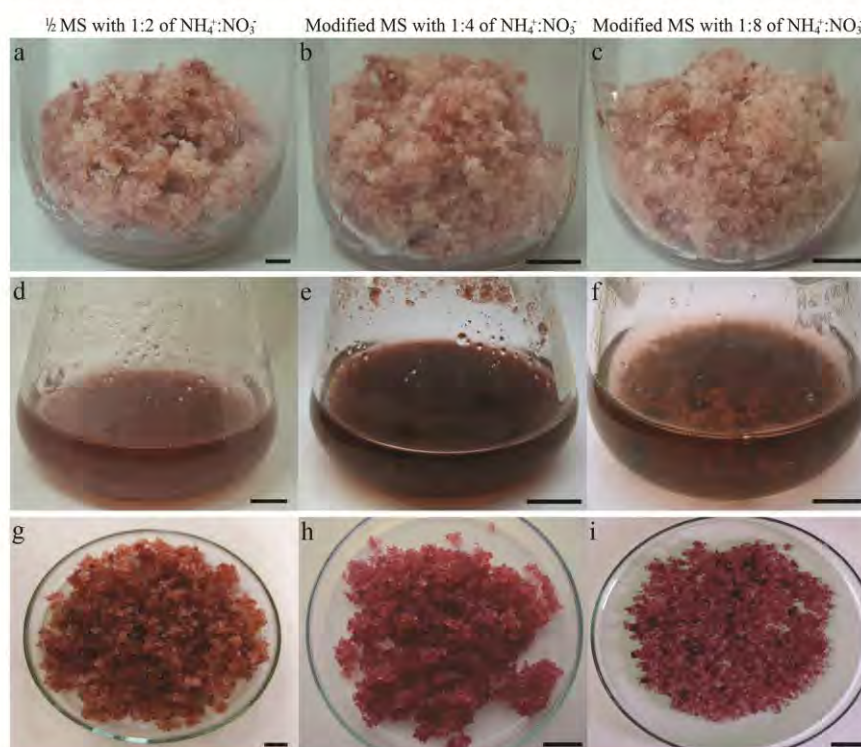


Fig. 1 Betalain-producing cultures of *P. aculeata* Mill. established on modified MS basal medium containing different ratios of NH_4^+ to NO_3^- and supplemented with 10 μM Picloram. Callus cultures (a–c), cell suspension cultures (d–f) and cell suspensions after filtration (g–i). Bar 1 cm

variable composition of mineral salts, vitamins and amino acids, but with the same hormonal supplementation. For three subcultures, calluses maintained on HB medium showed a friable texture, but slower growth and the gradual loss of the reddish-pink pigmentation.

Betalain-producing calluses of *P. aculeata* Mill. were also transferred to modified MS basal medium (30 mM total nitrogen and ratios of either 1:4 or 1:8 of NH_4^+ to NO_3^-), but with the same hormonal supplementation (10 μM Picloram). Callus maintained in these conditions were friable and showed reddish-pink pigmentation, irrespective of NH_4^+ to NO_3^- ratio. In addition, these calluses exhibited rapid cell proliferation and high rates of pigment production when compared to cultures kept in previous culture conditions (Fig. 1b, c).

Cell suspension cultures

Studies performed to establish the appropriate amount of inoculum to initiate cell suspension culture showed no significant difference in growth rates between cultures initiated

from 1 or 2 g of friable pigmented calluses (data not shown). Therefore, considering the high cell proliferation from the relatively small amount of callus biomass, 1 g of inoculum was selected to start the cell suspensions of *P. aculeata* Mill.

Cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. presented a lag phase of 4 days, followed by an exponential phase with intense cell multiplication up to 16 days of culture. The most significant growth occurred between the 12th and 16th days, during which cell suspensions achieved an eight-fold increase in biomass accumulation (Fig. 2a). The stationary phase was characterized by low-capacity cell division, thereby reducing cell proliferation up to the 28th day of culture and stabilizing through the 40th day, the end of the evaluation period. Based on the establishment cell growth kinetics, biomass accumulation and betalain content were evaluated every 15 days of subculture.

After one week of culture, cell biomass showed a strong red-purple pigmentation, irrespective of MS media. Cell suspensions of *P. aculeata* Mill. presented high growth capacity, especially in cultures maintained on $\frac{1}{2}$ MS

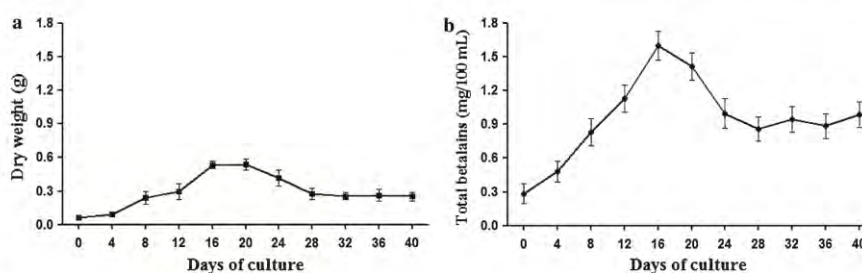


Fig. 2 Growth curve (a) and total betalain accumulation (b) in cell suspension culture of *P. aculeata* Mill. maintained on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 10 mM of Picloram

medium (stock medium) (Fig. 1d, g) and on modified MS medium (30 mM total nitrogen and 1:4 ratio of NH_4^+ to NO_3^-) (Fig. 1e, h), but with no statistical difference relative to either stock medium or MS medium modified with 30 mM total nitrogen and 1:8 ratio of NH_4^+ to NO_3^- (Fig. 1f, i) (Table 3). Moreover, the subcultures performed every 15 days favored biomass accumulation.

Betalain quantification

Total betalain production in callus and cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. was analyzed using the extinction coefficient of betanin and vulgaxanthin-I after the third subculture. Cell suspensions achieved a betalain production about three-fold higher than callus cultures, confirming the potential of the former in vitro culture system for the production of special metabolites (Table 4). The production of total betalains from cell suspensions maintained on $\frac{1}{2}$ MS medium containing 10 μM Picloram occurred during the exponential growth of cultures (Fig. 2b). In these cultures, the highest betalain content was achieved after 12 days; thereafter, betalain accumulation showed a slight reduction and then remained stable through the 40th day of culture.

Cultures of *P. aculeata* Mill. showed a red-purple pigmentation, although the amount of betaxanthin (yellow betalains) was higher than that of betacyanin (purple betalains) in all in vitro systems and culture media evaluated.

In both biotechnological systems, we verified that changes in the NH_4^+ to NO_3^- ratios used in the MS medium had a positive influence on the production of betalains from *P. aculeata*. In callus cultures, the highest total betalain content (1.14 ± 0.18 mg/100 mL) was obtained in cultures established on medium with a 1:8 ratio of NH_4^+ / NO_3^- , but without statistical difference to medium with a 1:4 ratio of NH_4^+ / NO_3^- (Table 4). However, in the cell suspension cultures, the highest total betalain accumulation (4.10 ± 0.47 mg/100 mL) was achieved in cultures kept on a 1:4 ratio of NH_4^+ / NO_3^- .

Discussion

This work showed that friable betalain-producing calluses with high biomass accumulation were successfully established from hypocotyl explants of *P. aculeata* Mill. cultured in MS medium supplemented with Picloram, a growth regulator with auxin-like activity (Escobedo-GraciaMedrano et al. 2014; Martínez et al. 2014).

Table 3 Biomass accumulation from cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. on different MS media supplemented with 10 μM of Picloram during three subcultures

$\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	Biomass accumulation (g)					
	1st subculture		2nd subculture		3rd subculture	
	Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight
1:2	$11.56 \pm 0.30a$	$0.36 \pm 0.18b$	$21.44 \pm 0.12a$	$0.57 \pm 0.19a$	$19.86 \pm 0.29a$	$0.51 \pm 0.23a$
1:4	$3.20 \pm 0.83b$	$0.11 \pm 0.67b$	$5.84 \pm 0.27b$	$0.18 \pm 0.45b$	$6.25 \pm 0.37b$	$0.19 \pm 0.29b$
1:8	$13.53 \pm 0.62a$	$0.37 \pm 0.43a$	$23.56 \pm 0.34a$	$0.59 \pm 0.38a$	$22.71 \pm 0.54a$	$0.56 \pm 0.32a$

Data represent mean \pm standard deviation

Same letters on each column are not significantly different by Tukey test at 5 %

Table 4 Betalain content from callus and cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. on different MS media supplemented with 10 μ M of Picloram containing modifications in the nitrogen source after the third subculture

In vitro systems	NH ₄ ⁺ : NO ₃ ⁻	Betalain content (mg/100 mL)		
		Betanin	Vulgaxantin-I	Total betalain
Callus cultures	1:2	0.17 \pm 0.04b	0.49 \pm 0.06c	0.65 \pm 0.10b
	1:4	0.28 \pm 0.09ab	0.63 \pm 0.11b	0.91 \pm 0.21ab
	1:8	0.34 \pm 0.12a	0.80 \pm 0.09a	1.14 \pm 0.18a
Cell suspensions	1:2	0.59 \pm 0.06b	1.10 \pm 0.16b	1.60 \pm 0.22c
	1:4	1.10 \pm 0.11a	2.70 \pm 0.35a	4.10 \pm 0.47a
	1:8	0.91 \pm 0.08a	1.30 \pm 0.09b	2.21 \pm 0.19b

Data represent mean \pm standard deviation

Same letters on each column are not significantly different by Tukey test at 5 %

Although medium supplementation with auxin is necessary for callus proliferation in many species (Simões et al. 2009; Kuo et al. 2012), this process can only be induced by the presence of cytokinins (Wu et al. 2003) or the use of both auxins and cytokinins (Bernabé-António et al. 2010). In the Cactaceae family, auxin used with cytokinin induced high calogenic biomass production in many species (Oliveira and Machado 2003; Shedbalkar et al. 2010). However, in the present study, cultures of *P. aculeata* Mill. maintained on media supplemented with Picloram in combination with reduced rates of BA or KIN showed low biomass production and oxidation, especially in the presence of KIN. According to Ouelhazi et al. (1994), the interaction between auxins and cytokinins is complex and involves a modulation of cytokinin response by auxins, such as glycosylation or the effects of ribosylation, resulting in synergistic or antagonistic activity.

Betalain production in callus cultures of *P. aculeata* Mill. occurred spontaneously and simultaneously with biomass proliferation on media containing Picloram. A similar response was also observed in stem explants of *Zaleya decandra* L. N. Burm. F. cultivated on medium with 2,4-D and TDZ (Thidiazuron) (Radfar et al. 2012). On the other hand, betalain production in *Amaranthus tricolor* Linn. cultures was stimulated after transfer of calluses induced on media with 2,4-D to culture media containing BA and NAA (Biswas et al. 2013). According to Zhao et al. (2011), several studies have revealed that the addition of cytokinins can increase or decrease in vitro betacyanin accumulation, although the regulatory mechanism remains unclear.

The reduction of some mineral element ratios present in culture medium can exert different effects on primary and secondary metabolism of plants and in vitro cultures (Nagella and Murthy 2011). In callus cultures of *Rosa hybrida* L., anthocyanin production was stimulated by reducing ammonium ions (Ram et al. 2011), while the complete absence of this ion optimized carotenoid synthesis in *Calendula officinalis* L. (Legha et al. 2012). In *C.*

rosea Vahl., total nitrogen rates above 60 mM promote reduction of anthocyanin production, although no effect was observed on callus growth (Simões et al. 2009). In relation to the synthesis of betalains under plant in vitro systems, it can be regulated by light, temperature, carbon source, nitrate ions, microelements and growth regulators (Georgiev et al. 2008). In this sense, callus cultures of *P. aculeata* Mill. on media containing 30 mM of total nitrogen in combination with lower ratios of NH₄⁺ to NO₃⁻ (1:4 and 1:8) presented high biomass accumulation with the proliferation of friable and pigmented calluses.

Friable betalain-producing calluses maintained on different MS media were used as a source of inoculum for the establishment of cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. According to Saito and Mizukami (2002), cell suspensions are considered as one of the most efficient biotechnological techniques for in vitro production of special metabolites, favoring the formation of a more homogeneous system with high cellular proliferation. In the present study, a fast adaptation of cultures to liquid medium and agitation was observed since cells exhibited a high proliferation rate from 1 g of initial inoculum. Furthermore, after one week in culture, the cell suspensions showed a strong pigmentation, especially in cultures established on media containing 1:4 and 1:8 ratios of NH₄⁺ to NO₃⁻. Cell suspensions maintained in 1/2 MS media and in modified MS medium with a 1:4 or 1:8 ratio of NH₄⁺ to NO₃⁻ showed high cell proliferation. These cultures were subcultured at 15-day intervals, since longer subculture periods resulted in a decrease of culture pigmentation.

According to Mastuti (2012), in general, secondary metabolite production reaches maximum values during the stationary phase of cell growth, with only a few cases showing higher productivity during the logarithmic phase of active growth.

In studies by Hirose et al. (1990), betacyanin production from cell suspension cultures of *Phytolacca americana* L. was inhibited after addition of aphidicolin, a DNA synthesis inhibitor, in the nutrient medium, suggesting a

positive correlation between betalain production and cell growth. In the present study, betalain accumulation in cell suspensions of *P. aculeata* Mill. was shown to be directly related to cell growth, as assessed in cultures of other betalain producers, such as *B. vulgaris* L. (Leathers et al. 1992; Akita et al. 2000), *P. americana* L. (Sakuta et al. 1986), *Chenopodium rubrum* L. (Berlin et al. 1986), and *Portulaca sp.* Jewel (Bhuiyan et al. 2002).

The evaluation of betalain production in callus cultures and cell suspensions of *P. aculeata* Mill. was performed by the quantification of two widely distributed betalains: betanin, the major betacyanin, and vulgaxanthin-I, a betaxanthin. In this study, the total betalain rates reached could be confirmed by visual inspection in both in vitro systems, since betalain accumulation in cell suspensions was about three-fold higher than the production obtained in callus cultures. In all cultures, the amount of betaxanthin produced was greater than the amount of betacyanin, although both callus cultures and cell suspension cultures exhibited reddish-pink and purple coloration, respectively. Therefore, since quantification was conducted using the extinction coefficient of two specific compounds, it is supposed that cultures of *P. aculeata* Mill. also produce other betacyanins. According to Amaral and Silva (2003), in vitro cultures can interfere with metabolic pathways, making it possible to reduce, increase, or biotransform special metabolites, as well as synthesize new molecules not found in the field plants.

Several studies indicate that in vitro betalain synthesis is inhibited in cultures maintained in the presence of high levels of total nitrogen. In *B. vulgaris* L. cell suspensions, nitrogen amounts higher than 30 mM resulted in a reduction in betacyanin production (Akita et al. 2000). Additionally, for *Phytolacca americana* L., the increase of total nitrogen content of 0–40 mM favored betacyanin synthesis, although the production remained constant at concentrations between 40 and 80 mM (Sakuta et al. 1987). On the other hand, low ratios of ammonium to nitrate have promoted betacyanin accumulation in cell suspension cultures of *B. vulgaris* L. (Leathers et al. 1992), *P. americana* L. (Sakuta et al. 1987), and *Portulaca grandiflora* Hook. (Böhm et al. 1991).

Modifications in the nitrogen source also contributed positively to betalain production from both callus and cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. Changing the ratio of NH_4^+ to NO_3^- from 1: 4 to 1: 8 increased pigment synthesis, especially in cell suspensions maintained in MS medium modified with a 1:4 ratio of NH_4^+ to NO_3^- , which resulted in a betalain production of 4.10 ± 0.47 mg/100 mL. Considering the results obtained in this study, medium with a 1:4 ratio of NH_4^+ to NO_3^- was considered the most suitable condition for in vitro betalain production on a large scale, considering the high biomass production

and elevated betalain yield obtained by callus and cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. Finally, this study showed the development of efficient protocol for high biomass accumulation associated to production of betalains from both callus and cell suspension cultures of *P. aculeata* Mill. without requiring additional cultivation steps, reducing in vitro manipulation and equipment costs. In this sense, in vitro cultures of *P. aculeata* Mill. can be used as a new source of betalain production for commercial purposes.

Acknowledgments The authors are grateful to Dr. Alexandre Gabriel Christo (*in memoriam*) for indication and identification of plant species, and Dra. Claudia Simões-Gurgel for the valuable suggestions. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

References

- Akita T, Hina Y, Nishi T (2000) Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). *Biosci Biotech Biochem* 64:1807–1812
- Akita T, Hina Y, Nishi T (2002) New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). *Biosci Biotech Biochem* 66:902–905
- Allegra M, Furtmuller PG, Jantschko W, Zederbauer M, Tesoriere L, Livrea MA, Obinger C (2005) Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochem Biophys Res Commun* 332:837–844
- Amaral CF, Silva AB (2003) Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. *Rev Biotechnol* 30:55–59
- Azeredo HMC (2009) Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *Int J Food Sci Technol* 44:2365–2376
- Berlin J, Sieg S, Strack D, Bokern M, Harms H (1986) Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 5:163–174
- Bernabé-Antonio A, Estrada-Zúñiga ME, Buendía-González L, Reyes-Chilpa R, Chávez-Ávila VM, Cruz-Sosa F (2010) Production of anti-HIV-1 calanolides in a callus culture of *Calophyllum brasiliense* (Cambes). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103:33–40
- Bhuiyan M, Murakami K, Adachi T (2002) Variation in betalain content and factors affecting the biosynthesis in *Portulaca sp.* “Jewel” cell cultures”. *Plant Biotech* 19:369–376
- Biswas M, Das SS, Dey S (2013) Establishment of a stable *Amaranthus tricolor* callus line for production of food colorant. *Food Sci Biotechnol* 22:1–8
- Böhm H, Böhm L, Rink E (1991) Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 26:75–82
- Brockington SF, Walker RH, Glover BJ, Soltis PS, Soltis DE (2011) Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytol* 190:854–864
- Campos D, Noratto G, Chirinos R, Arbizu C, Roca W, Cisneros-Zevallos L (2006) Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz; Pavon), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). *J Sci Food Agric* 86:1481–1488

- Castellanos-Santiago E, Yahia EM (2008) Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 56:5758–5764
- Castellar MR, Obon JM, Fernandez-Lopez J (2006) The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *J Sci Food Agric* 86:122–128
- Chethana S, Nayak CA, Raghavarao KSMS (2007) Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *J Food Eng* 81:679–687
- Clement JS, Mabry TJ (1996) Pigment evolution in the Caryophyllales: a systematic overview. *Bot Acta* 109:360–367
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40:173–289
- Escobedo-GraciaMedrano RM, Maldonado-Borges JI, Burgos-Tan MJ, Valadez-González N, Ku-Cauich JR (2014) Using flow cytometry and cytological analyses to assess the genetic stability of somatic embryo-derived plantlets from embryogenic *Musa acuminata* Colla (AA) ssp. *malaccensis* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 116:175–185
- Galati EM, Mondello MR, Lauriano ER, Taviano MF, Galluzzo M, Miceli N (2005) *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit juice protects liver from carbon tetrachloride induced injury. *Phytother Res* 19:796–800
- Gandía-Herrero F, García-Carmona F (2013) Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci* 18:334–343
- Gandía-Herrero F, García-Carmona F, Escribano J (2006) Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem Anal* 17:262–269
- Georgiev V, Ilieva M, Bley T, Pavlov A (2008) Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiol Plant* 30:581–593
- Hirose M, Yamakawa T, Kodama T, Komamine A (1990) Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis sp.* cells in relation to cell division in suspension cultures. *Plant Cell Physiol* 31:267–271
- Kapadia GJ, Balasubramanian V, Tokuda H, Iwashima A, Nishino H (1997) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein-Barr virus early antigen activation by natural colorants. *Cancer Lett* 115:173–178
- Kapadia GJ, Aзуine MA, Sridhar R, Okuda Y, Tsuruta A, Ichiishi E, Mukainake T, Takasaki M, Konoshima T, Nishino H, Tokuda H (2003) Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacol Res* 47:141–148
- Kugler F, Stintzing FC, Carle R (2007) Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea sp.* by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Anal Bioanal Chem* 387:637–648
- Kuo CI, Chao CH, Lu MK (2012) Effects of auxins on the production of steroidal alkaloids in rapidly proliferating tissue and cell cultures of *Solanum lyratum*. *Phytochem Anal* 23:400–404
- Leathers R, Davin C, Zrýd J (1992) Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. (red beet). *In vitro Cell Dev Biol Plant* 28:39–45
- Legha MR, Prasad KV, Singh SK, Kaur C, Arora A, Kumar S (2012) Induction of carotenoid pigments in callus cultures of *Calendula officinalis* L. in response to nitrogen and sucrose levels. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 48:99–106
- Linsmaier EF, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18:100–127
- Martínez MT, Ballester A, Vieitez A, Corredoira E (2014) Induction of somatic embryogenesis in leaf and shoot apex explants derived from red oak trees. Effects of explant type, silver thiosulphate and activated charcoal on the embryogenic system. In: Proceedings of the Third International Conference of the IUFRO unit 2.09.02 on “woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies”. Vitoria-Gasteiz, Spain, pp 58–65. file:///C:/Users/D%2C3%A9bora/Downloads/2014%20El-Kassaby%20Klapste%20Vitoria%20S-pain%20IUFRO%20Proc%20(7).pdf. Accessed 10 March 2015
- Mastuti R (2012) Role of *in vitro* system as continuous betalain sources. <http://retinomastutibiologi.lecture.ub.ac.id/files/2012/06/paper-BaSic-2012-18-Feb.pdf>. Accessed 20 January 2013
- Mercê ALR, Landaluz JS, Mangrich AS, Szpoganicz B, sierakowski MR (2001) Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} . *Bioresour Technol* 76:29–37
- Moreno DA, García-Viguera C, Gil JI, Gil-Izquierdo A (2008) Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochem Rev* 7:261–280
- Moßhammer MR, Stintzing FC, Carle R (2005) Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. *Innov Food Sci Emerg* 6:221–231
- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nagella P, Murthy HN (2011) Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:119–124
- Oliveira AJB, Machado MFPS (2003) Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Appl Biochem Biotechnol* 104:149–155
- Ouelhazi L, Hamdi S, Chenieux JC, Rideau M (1994) Cytokinin and auxin-induced regulation of protein synthesis and poly(A) RNA accumulation in *Catharanthus roseus* cell cultures. *J Plant Physiol* 144:167–174
- Pavlov A, Georgiev V, Kovatcheva P (2003) Relationship between type and age of the inoculum cultures and betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* hairy root culture. *Biotech Lett* 25:307–309
- Pavokovic D, Krsnik-Rasol M (2011) Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. *Biotechnological Production of Betalains*. *Food Technol Biotechnol* 49:145–155
- Pinto NCC, Duque APN, Pacheco NR, Mendes RF, Motta EVS, Bellozi PMQ, Ribeiro A, Scio E (2012) Atividade antinociceptiva da partição hidrometanólica do extrato bruto das folhas de *Pereskia aculeata* Miller (2012) XXXV Semana de Biologia e XXVIII Mostra de Produção Científica da UFJF. file:///C:/Users/D%2C3%A9bora/Downloads/Bio%2006.pdf. Accessed 12 August 2013
- Radfar M, Sudarshana MS, Niranjana MH (2012) Betalains from stem callus cultures of *Zaleya decandra* L. N. Burm. F. A medicinal herb. *J Med Plants Res* 6:2443–2447
- Ram M, Prasad KV, Kaur C, Singh SK, Arora A, Kumar S (2011) Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammoniacal nitrogen levels. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:171–179
- Rao S, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20:101–153
- Rosa SM, Souza LA (2003) Morfo-anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). *Act Sci* 25:415–428
- Saito K, Mizukami H (2002) Plant cell cultures as producers of secondary compounds. In: Oksman-Caldentey K-M, Barz WH (eds) *Plant biotechnology and transgenic plants*. New York, pp 77–109

- Sajilata MG, Singhal RS (2006) Isolation and stabilization of natural pigments for food applications. *Stewart Postharvest Rev* 2:1–2
- Sakuta M (2013) Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. *Plant Biotechnol Rep* 8:37–48
- Sakuta M, Takagi T, Komamine A (1986) Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *J Plant Physiol* 125:337–343
- Sakuta M, Takagi T, Komamine A (1987) Effects of sucrose of betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiol Plant* 71:455–458
- Sartor CFP, Amaral V, Guimarães HET, Barros KN, Felipe DF, Cortez LER, Veltrini VC (2010) Estudo da ação cicatrizante das folhas de *Pereskia aculeata*. *Rev Saúde Pesq* 3:149–154
- Savitha BC, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar GA (2006) Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochem* 41:50–60
- Shedbalkar UU, Adki VS, Jadhav JP, Bapat VA (2010) *Opuntia* and other cacti: applications and biotechnological insights. *Tropical Plant Biol* 3:136–150
- Simões C, Bizarri CHB, Castro TC, Coutada LCM, Silva AJR, Albarello N, Mansur E (2009) Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiol Biochem* 47:895–903
- Sousa RMF, Lira CF, Rodrigues AO, Morais SAL, Queiroz CRAA, Chang R, Aquino FJT, Muñoz RAA, Oliveira A (2014) Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos in vitro. *Biosci J* 30:448–457
- Sreekanth D, Arunasree MK, Roy KR, Chandramohan T, Reddy GV, Reddanna P (2007) Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine* 14:739–746
- Stintzing FC, Carle R (2008) Betalains in food: occurrence, stability, and postharvest modifications. In: Socaciu C (ed) *Food colorants: chemical and functional properties*. Boca Raton, London, pp 277–302
- Strack D, Vogt T, Schliemann W (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62:247–269
- Takeiti CY, Antonio GC, Motta EMP, Collares-Queiroz FP, Park KJ (2009) Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *Int J Food Sci Nutr* 60:148–160
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* 54:733–749
- Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA (2004a) Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am J Clin Nutr* 80:941–945
- Tesoriere L, Butera D, Pintauro AM, Allegra M, Livrea MA (2004b) Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am J Clin Nutr* 80:391–395
- Trejo-Tapia G, Martínez-Bonfil B, Salcedo-Morales G, Arenas-Ocampo A, Jiménez A (2008) Effect of screening and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var. 'Dark Detroit' callus culture. *Innov Food Sci Emerg Technol* 9:32–36
- Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY, Tsay HS (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sin* 45:1–22
- Von Elbe JH (2001) Betalains: Spectrophotometric determination of betacyanins and betaxanthins. In: *Current protocols in food analytical chemistry*. F3.1.1-F3.1.7, Wiley, New York. doi:10.1002/0471142913
- Wu CT, Vanisree M, Satish MN, Chen CL, Yang TF, Tsay HS (2003) Isolation and quantitative analysis of cryptotanshinone, an active quinoid diterpene formed in the callus of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Biol Pharm Bull* 26:845–848
- Zhao SZ, Sun HZ, Gao Y, Sui N, Wang BS (2011) Growth regulator-induced betacyanin accumulation and dopa-4,5-dioxygenase (DODA) gene expression in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47:391–398