



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Adriana Silva da Rocha

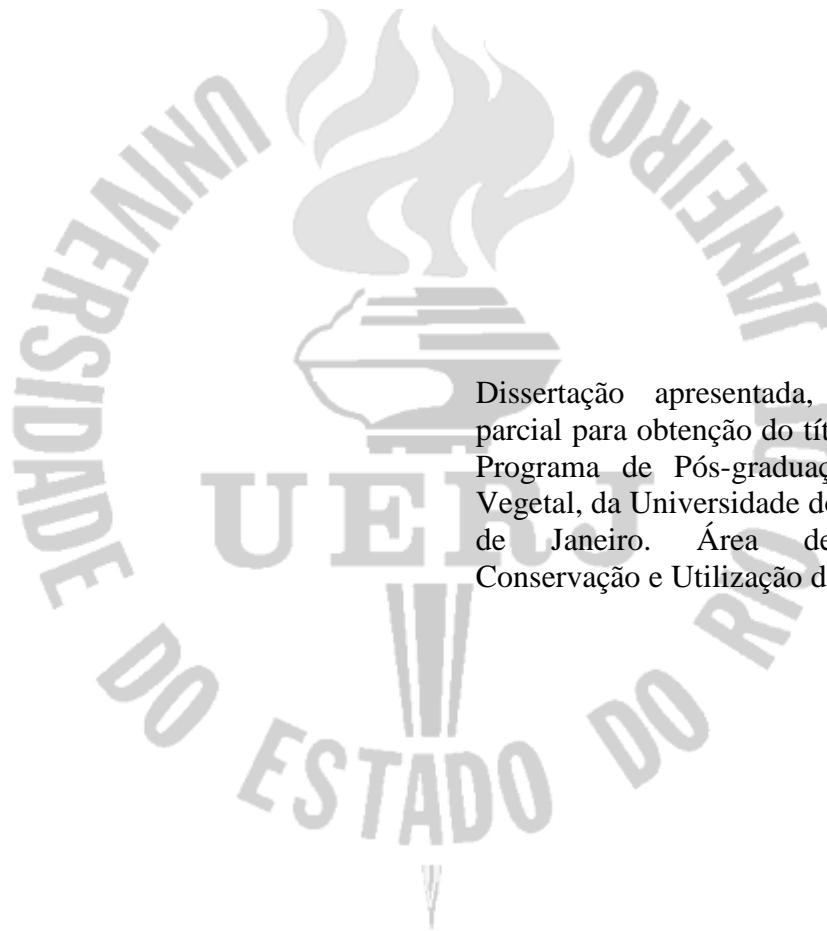
**Produção de carotenoides em culturas *in vitro* de *Cleome rosea*
Vahl ex DC (Capparaceae) e avaliação de sua toxicidade e
potencial antioxidante**

Rio de Janeiro

2012

Adriana Silva da Rocha

**Produção de carotenoides em culturas *in vitro* de *Cleome rosea* Vahl ex DC
(Capparaceae) e avaliação de sua toxicidade e potencial antioxidante**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Claudia Simões

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Norma Albarello

Rio de Janeiro

2012

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

R672

Rocha, Adriana Silva da.

Produção de carotenoides em culturas in vitro de *Cleome rosea* Vahl ex DC (Capparaceae) e avaliação de sua toxicidade e potencial antioxidante/ Adriana Silva da Rocha. - 2012.

94 f. : il.

Orientadora: Cláudia Simões.

Coorientadora: Norma Albarello

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais – Teses. 2. Carotenóides – Teses. I. Simões, Cláudia. II. Albarello, Norma. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

Assinatura

Data

Adriana Silva da Rocha

**Produção de carotenoides em culturas *in vitro* de *Cleome rosea* Vahl ex DC
(Capparaceae) e avaliação de sua toxicidade e potencial antioxidante**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2012

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Claudia Simões (Orientadora)

Departamento de Biologia Vegetal da UERJ

Prof^a. Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Departamento de Biologia Celular da UERJ

Prof^a. Dra. Helena Regina Pinto Lima

Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos

Departamento de Biofísica e Biometria da UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó, Josefa Vieira (*in Memorium*), uma grande mulher, que me ensinou, não apenas por palavras, mas principalmente por meio de suas ações, quais são os valores mais importantes na vida, e que além de tudo foi um grande exemplo de força e determinação para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me concedeu a vida e força para conseguir ultrapassar todos os obstáculos que surgiram no decorrer de todo este percurso.

À orientadora Prof^a. Claudia Simões, que depois de Deus, foi a pessoa mais importante na execução deste trabalho, sem a qual o mesmo não poderia ter se concretizado com o mesmo êxito.

À coorientadora Prof^a. Norma Albarello pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) pela a ajuda prestada em todos os momentos e pelo companheirismo de todos esses anos que se estenderam desde o período de estágio na graduação até a finalização deste mestrado.

Em especial ao Químico do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, Luciano Marques Alves, à Química do Departamento de Biologia Celular Emely Kazan Rocha, e à doutoranda Bianka Oliveira Soares, pela grande ajuda fornecida nos momentos cruciais para a finalização deste trabalho.

Ao Biólogo Carlos Roberto Machado Gayer do Departamento de Bioquímica, à Prof^a. Conceição Santos do Departamento de Biologia Celular, e ao Prof. José Carlos Pelliello de Mattos do Departamento de Biofísica, pelas importantes colaborações para a execução de parte deste trabalho.

À estagiária do LABPLAN Brenda Amaral de Moraes pelo auxílio nos experimentos iniciais dos ensaios de atividade antioxidante e toxicidade.

Ao órgão financiador CAPES, pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro por ter possibilitado toda essa grande caminhada em minha vida, tendo se tornado a minha segunda casa durante estes últimos seis anos.

Aos meus amigos que me deram apoio neste ano tão atribulado em minha vida, em especial a minha amiga e irmã de fé Alexandra.

Mesmo muitas águas não são capazes de extinguir o amor, nem podem os próprios rios levá-lo de enxurrada. Se um homem desse todas as coisas valiosas de sua casa em troca do amor, as pessoas positivamente as desprezariam.

Cânticos de Salomão 8:7

RESUMO

ROCHA, Adriana Silva da. **Produção de carotenoides em culturas *in vitro* de *Cleome rosea* Vahl ex DC (Capparaceae) e avaliação de sua toxicidade e potencial antioxidante.** 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A produção e a otimização de substâncias de valor medicinal têm sido alcançadas pelo uso das técnicas de cultura de tecidos vegetais, que têm apresentado grande relevância quando se considera o *status* de conservação de uma espécie ou sua ocorrência em ambientes ameaçados. No presente trabalho foi avaliada a produção de carotenoides em culturas de calos e células em suspensão de *Cleome rosea* Vahl ex DC, espécie nativa encontrada em áreas de restinga nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. Plantas micropropagadas obtidas a partir de raízes produzidas *in vitro* foram usadas como fonte de explantes para o início das culturas de calos. A produção de massa calogênica foi avaliada em meio MS suplementado com diferentes concentrações das auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico, na presença de luz ou no escuro. O uso de diferentes meios básicos de cultura (B5, Nitsch, White) também foi avaliado. A calogênese foi induzida em todos os tratamentos, entretanto a maior produção de biomassa foi alcançada pelas culturas mantidas na presença de luz. A maior produção de massa calogênica foi obtida em culturas iniciadas no meio MS suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. A exposição das culturas à luz foi um fator essencial para a produção de carotenoides, que só ocorreu nas culturas mantidas nessa condição. Culturas de calos foram submetidas a tratamentos com substâncias elicitoras (extrato de levedura, metil jasmonato, quitosana) em diferentes concentrações e por um período de exposição de sete ou 14 dias visando otimizar a produção do pigmento. A maior produção de carotenoides nas culturas elicidadas foi alcançada com o tratamento com metil jasmonato (MJ) na concentração de 300 µM, independentemente do tempo de exposição ao elicitor. Análises cromatográficas mostraram que o processo de elicitação com MJ induziu ao aumento na produção de β-caroteno. Calos elicitados nessa condição foram usados para iniciar culturas de células em suspensão (CCS). Estas culturas foram acompanhadas por três subculturas realizadas a cada 20 dias, durante a fase exponencial de crescimento. Embora as CCS tenham mantido uma produção de biomassa constante ao longo das subculturas, os valores de produção de carotenoides foram inferiores àqueles alcançados pelas culturas de calos e não houve diferenças estatísticas significativas quando comparadas às CCS iniciadas a partir de calos não elicitados. Extratos de calos produzidos em meio MS suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante por meio da incubação dos extratos com DNA plasmidial em presença de cloreto estânico (SnCl₂), um potente agente redutor capaz de produzir quebras na molécula de DNA. Os extratos foram avaliados em concentrações crescentes (25 - 500 µg.mL⁻¹) e apresentaram uma proteção dose dependente à ação do SnCl₂. Estudos de toxicidade com o modelo de *Artemia salina* demonstraram que os extratos não apresentaram toxicidade nas concentrações avaliadas. Os resultados alcançados mostram que a elicitação foi eficiente para a otimização da produção de β-caroteno nas culturas *in vitro* e que os extratos obtidos a partir desses materiais apresentaram atividade antioxidante, indicando o êxito das técnicas de cultura de tecidos para a produção deste metabólito sob condição *in vitro*.

Palavras-chave: Planta medicinal. Produção de metabólitos *in vitro*. Cultura de calos. Cultura de células em suspensão.

ABSTRACT

The production and optimization of plants secondary metabolites with medicinal value have been achieved by using plant tissue culture techniques, which have showed great relevance when considering the conservation status of a species or their occurrence in degraded environments. The present study assessed the production of carotenoids in callus and cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl ex DC (Capparaceae), a Brazilian native herbaceous species that occurs mainly in coastal sandy plains (restingas) in the states of Rio de Janeiro and São Paulo. Micropropagated plants obtained from *in vitro* roots were used as source of explants for callus cultures. Callus biomass accumulation was evaluated on MS medium supplemented with different concentrations of the auxins 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (PIC), in the presence of light and in the dark. The use of different culture basal media (B5, Nitsch, and White) was also evaluated. Calogenesis was induced in all treatments; however greater efficiency was achieved by cultures maintained in the light. Exposure of cultures to light was also an essential factor to induce the production of carotenoids. The highest biomass accumulation was achieved by cultures established on MS medium supplemented with 0.2 mg.L⁻¹ 2,4-D. Callus cultures were subject to treatments with a range of elicitors (chitosan, methyl jasmonate, yeast extract), at different concentrations and time of exposure (7 or 14 days). The highest production of carotenoids was achieved by cultures treated with 300 µM methyl jasmonate (MJ), regardless of time exposure. The chromatographic analysis showed that elicitation with MJ induced an increase in the production of β-carotene. Elicited calluses were used to establish cell suspension cultures (CSC). These cultures were evaluated during three subsequent subcultures performed at 20 days each during the exponential growth phase. Although the CSC have maintained a steady biomass accumulation along successive subcultures, carotenoids content were lower than those achieved by callus cultures and did not present significant differences when compared to CSC established from no elicited callus. Extracts of callus obtained from MS medium supplemented with 0.2 mg.L⁻¹ 2,4-D were evaluated for their antioxidant potential. These extracts were incubated with plasmid DNA in the presence of stannous chloride (SnCl₂), a potent reduced agent. Extracts were used at increasing concentrations (25 - 500 µg.mL⁻¹) and showed a dose-dependent protective action, regardless of their origin. Studies of toxicity using the brine shrimp lethality bioassay revealed that the extracts were not toxic at tested concentrations. This study showed that the use of elicitation was a powerful tool in the optimization of β-carotene production in *in vitro* cultures of *C. rosea* and that extracts obtained from these cultures have antioxidant activity, indicating the success of plant tissue culture techniques for production of this metabolite under *in vitro* condition.

Keywords: Medicinal plant. *In vitro* production of metabolites. Callus culture. Cell suspension culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de alguns carotenoides de interesse comercial	16
Figura 2 - Aspectos morfológicos de <i>C. rosea</i> Vahl.....	28
Figura 3 - Plantas de <i>C. rosea</i> propagadas <i>in vitro</i> a partir de explantes radiculares.....	30
Figura 4 - Preparo do ensaio antígeno-tóxico: baseado no modelo experimental desenvolvido por Caldeira-de-Araújo e colaboradores (1996).....	37
Figura 5 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L^{-1}), após 60 dias de cultivo em regime de luz ou escuro	41
Figura 6 - Produção de massa calogênica a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, após 60 dias em cultivo em regime de luz ou escuro.....	42
Figura 7 - Espectro de absorção de extratos de calos de <i>C. rosea</i> produzidos em meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, apresentando como comprimentos de onda de maior absorbância os valores de 452 nm e 478 nm.	43
Figura 8 - Cromatograma obtido por CLAE a partir (a) do padrão comercial de β -caroteno e seu respectivo (b) espectro de absorção na região visível. Cromatograma do (c) extrato de calo de <i>C. rosea</i> produzido em meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e da (d) coinjeção do extrato de calo com o padrão de β -caroteno (10:1).....	43
Figura 9 - Produção de carotenoides em calos de <i>C. rosea</i> após 30 dias em cultivo.....	44
Figura 10 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC (mg.L^{-1}), após 60 dias de cultivo em regime de luz ou escuro.....	45
Figura 11 - Produção de massa calogênica a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias em cultivo em regime de luz ou escuro.....	46
Figura 12 - Crescimento da massa calogênica nas culturas estabelecidas em meios suplementados com 2,4-D e PIC, após 60 dias em cultivo na presença de luz.	46
Figura 13 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L^{-1}), após 60 dias de cultivo na presença de luz.....	48
Figura 14 - Produção de massa calogênica, a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, após 60 dias em cultivo na presença de luz.....	49

Figura 15 - Desenvolvimento de raízes em calo de <i>C. rosea</i> produzido em meio B5 suplementado com 0,20 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, após 60 dias de cultura em presença de luz.....	49
Figura 16 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio Nitsch suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L ⁻¹), após 60 dias de cultivo na presença de luz.....	51
Figura 17 - Produção de massa calogênica a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio Nitsch suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, após 60 dias em cultivo na presença de luz.....	52
Figura 18 - Calos produzidos em meio Nitsch após 60 dias em cultura. a) Calo organogênico (setas) produzido em meio suplementado com 0,20 mg.L ⁻¹ de 2,4-D; b) Calos mantidos em meio suplementado com 1,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D apresentando secreção de β-caroteno (seta) para o meio de cultura.....	52
Figura 19 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares inoculados em meio White suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L ⁻¹), após 60 dias em cultura em regime de luz.....	53
Figura 20 - Produção de massa calogênica a partir de explantes caulinares de <i>C. rosea</i> inoculados em meio White suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, após 60 dias em cultivo na presença de luz.....	54
Figura 21 - Culturas de calos de <i>C. rosea</i> produzidas em meio MS + 0,20 mg.L ⁻¹ de 2,4-D e expostas a diferentes concentrações de quitosana por 7 ou 14 dias.....	57
Figura 22 - Culturas de calos de <i>C. rosea</i> produzidas em meio MS + 0,20 mg.L ⁻¹ de 2,4-D e expostas a diferentes concentrações de extrato de levedura por 7 ou 14 dias.....	59
Figura 23 - Culturas de calos de <i>C. rosea</i> produzidas em meio MS + 0,20 mg.L ⁻¹ de 2,4-D e expostas a diferentes concentrações de metil jasmonato por 7 ou 14 dias.	61
Figura 24 - Análises cromatográficas dos calos de <i>C. rosea</i> submetidos ao tratamento de elicitação com metil jasmonato (300 μM) por 7 dias.....	62
Figura 25 - Curva de crescimento das culturas de células em suspensão de <i>C. rosea</i> iniciadas a partir de calos produzidos em meio MS + 0,20 mg.L ⁻¹ 2,4-D.....	63
Figura 26 - Culturas de células em suspensão de <i>C. rosea</i> estabelecidas a partir (a) de calos não elicitados e (b) calos elicitados com metil jasmonato (300μM), durante a terceira subcultura.....	64
Figura 27 - Efeito sobre a molécula de DNA plasmidial, na ausência ou presença de SnCl ₂ , de diferentes concentrações de extratos de calos de <i>C. rosea</i> produzidos em meio MS + 0,20 mg.L ⁻¹ de 2,4-D	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de calos de <i>C. rosea</i> . As avaliações foram realizadas após 60 e 90 dias da transferência dos calos do meio MS + 0,2 mg.L ⁻¹ de 2,4-D para diferentes meios de cultura.	55
Tabela 2 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de calos de <i>C. rosea</i> submetidas à exposição por sete ou 14 dias a diferentes concentrações de quitosana, após 60 e 90 dias do início do tratamento	56
Tabela 3 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de calos de <i>C. rosea</i> submetidas à exposição por sete ou 14 dias a diferentes concentrações de extrato de levedura, após 60 e 90 dias do início do tratamento.....	58
Tabela 4 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de calos de <i>C. rosea</i> submetidas à exposição por sete ou 14 dias a diferentes concentrações de metil jasmonato, após 60 e 90 dias do início do tratamento.....	60
Tabela 5 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de células em suspensão iniciadas a partir de calos de <i>C. rosea</i> produzidos em meio MS suplementado com 0,20 mg.L ⁻¹ de 2,4-D sem ou com elicitação com metil jasmonato.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA	Ácido 3-indol-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido 1-naftalenoacético
BST	Teste de letalidade com <i>Artemia salina</i> (<i>Brine shrimp test</i>)
CCS	Culturas de células em suspensão
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CT	Carotenoides totais
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
CL ₅₀	Concentração letal para 50% dos indivíduos
MS	Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)
MS0	Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) sem reguladores de crescimento
PF	Peso de matéria fresca
PIC	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram)
PS	Peso de matéria seca
SnCl ₂	Cloreto estanoso

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	29
1.1	Geral	29
1.2	Específicos	29
2	MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1	Material Botânico	30
2.2	Culturas de calos	30
2.3	Extração, identificação e quantificação dos carotenoides	32
2.4	Modulação da produção de carotenoides <i>in vitro</i>	33
2.4.1	<u>Elicitação</u>	33
2.5	Culturas de células em suspensão	34
2.6	Análise estatística	35
2.7	Avaliação do potencial antioxidante das culturas <i>in vitro</i>	35
2.7.1	<u>Preparo dos extratos</u>	35
2.7.2	<u>Potencial antígenotóxico</u>	36
2.8	Avaliação da toxicidade das culturas <i>in vitro</i>	37
3	RESULTADOS	39
3.1	Culturas de calos	39
3.2	Modulação da produção de carotenoides <i>in vitro</i>	54
3.2.1	<u>Elicitação das culturas de calos</u>	55
3.3	Culturas de células em suspensão	62
3.4	Avaliação do potencial antioxidante e da toxicidade dos extratos	64
4	DISCUSSÃO	67
5	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO

Carotenoides

As plantas são fontes de um grande número de substâncias que embora não atuem diretamente nos processos vitais, desempenham importantes funções na interação dos vegetais com o meio ambiente. Essas substâncias apresentam uma origem química bastante diversificada e são sintetizadas por vias que constituem o chamado metabolismo secundário, sendo denominadas de metabólitos secundários ou especiais (CASTRO et al., 2004). Entre os metabólitos secundários encontram-se os carotenoides, hidrocarbonetos altamente insaturados, pertencentes à classe dos terpenoides. A biossíntese destas substâncias ocorre a partir da condensação de três moléculas de acetilCoA, formando o hidroximetilglutarilCoA, que é posteriormente reduzido a ácido mevalônico. O ácido mevalônico ou mevalonato é precursor primário do pirofosfato de isopentenila (IPP), que é a base de todos os terpenoides (DEWICK, 2009). Os carotenoides são geralmente tetraterpenoides (C₄₀) constituídos por oito unidades de isopreno (C₅). A cadeia poliênica pode conter de três a quinze ligações duplas conjugadas, sendo seu número responsável pelo sinal de absorção característico da molécula, que varia de 410 a 510 nm. Além disso, para que o carotenoide apresente coloração é necessária a presença de, pelo menos, sete ligações duplas conjugadas (DA SILVA, 2001; GHIGGI, 2007; TRÊS et al., 2007; UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007; VALDUGA et al., 2009). Tais pigmentos apresentam ampla distribuição na natureza, sendo responsáveis por uma grande variedade de cores, como o amarelo brilhante, o alaranjado e o vermelho. Estão presentes em plantas, algas, bactérias, fungos, em alguns pássaros, como o flamingo e o canário e também em alguns insetos e animais marinhos, como camarão, lagosta e salmão. Mais de 650 carotenoides já foram isolados e identificados (LINS; KWOK; DORAN, 2006; GHIGGI, 2007; UENOJO, JUNIOR; PASTORE, 2007).

Nas plantas, os carotenoides são produzidos nos cloroplastos e desempenham importantes funções como fotoprotetor e pigmento acessório no processo de fotossíntese, além de servirem como precursores na síntese de outras substâncias, como por exemplo, do fitormônio ácido abscísico (ABA) (SQUINA; MARCADANTE, 2003; RAMOS, 2008; TANAKA, SASAKI; OHMIYA, 2008). Essa classe de pigmentos pode ser dividida em dois grandes grupos: os carotenoides formados apenas por carbono e hidrogênio, denominados de

carotenos (hidrocarotenoides), como o β -caroteno e o licopeno; e os carotenoides oxidados (oxicarotenoides), chamados de xantofilas, como a luteína e a zeaxantina, caracterizados por apresentarem grupos substituintes com oxigênio (Figura 1).

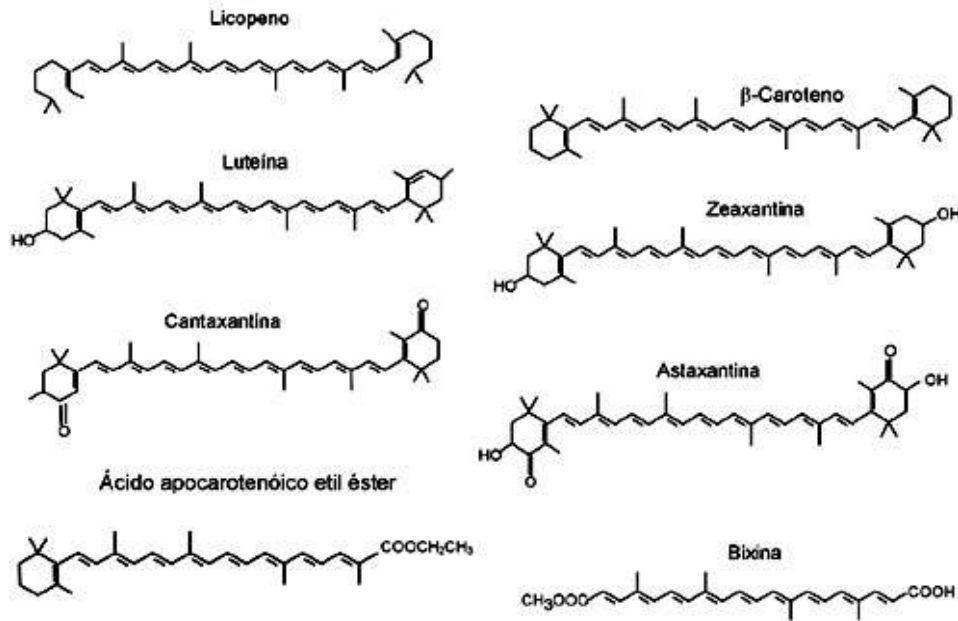


Figura 1 - Estrutura química de alguns carotenoides de interesse comercial (RAMOS, 2008).

Os tipos de carotenoides encontradas nas plantas variam de acordo com o órgão e da espécie analisada. É comum encontrar carotenoides como zeaxantina, violanxantina, anterxantina e luteína em folhas e caules. Por outro lado, os tecidos não verdes apresentam composições distintas de carotenoides, de acordo com a espécie vegetal, como por exemplo, o acúmulo de licopeno no tomate. Em geral, as plantas não acumulam carotenoides nas raízes, sendo a cenoura e a batata doce duas exceções (TANAKA, SASAKI; OHMIYA, 2008). Algumas plantas acumulam em suas pétalas carotenoides específicos exclusivos do respectivo gênero ou espécie, os quais conferem uma coloração que vai do laranja ao vermelho. Este fato é constatado nas espécies *Adonis aestivales* e a *A. annua*, que apresentam pétalas de coloração vermelha resultante do acúmulo de astaxantina, carotenoide pouco frequente em plantas, sendo mais encontrado em bactérias, fungos e algas (TANAKA, SASAKI; OHMIYA, 2008).

Importância econômica e medicinal dos carotenoides

Pesquisas indicam uma relação entre a ingestão de alimentos ricos em carotenoides e a diminuição da incidência de certos tipos de câncer, como por exemplo, de rins e de próstata, o que é atribuído ao seu potencial antioxidante. Essas biomoléculas ativas sequestram o oxigênio singlete, removem os radicais peróxido, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre as células e aumentam a resposta imune (KRINSKY, 1994; RAO; AGARWAL, 2000). Alguns estudos também sugerem que a quantidade plasmática de carotenoides poderia ser utilizada como um indicador de saúde em pessoas de idade avançada, uma vez que já foram descritas associações significativas entre baixas concentrações de carotenoides e alta incidência de mortalidade (SOUZA et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006).

Entre os carotenoides, destaca-se o β -caroteno, o mais abundante do grupo presente nos vegetais e que desempenha entre suas funções biológicas mais importantes a de atuar como precursor da vitamina A. Esta vitamina é essencial para a diferenciação celular, a visão, o crescimento ósseo, a reprodução e a integração do sistema imunológico (COSTA, 2004; SOUZA et al., 2004). Alguns estudos têm preconizado que o β -caroteno pode desempenhar um papel relevante na redução do risco de câncer de pulmão, sendo considerado um potencial anticarcinogênico de origem alimentar (NAVES, 1998; VOORRIPS et al., 2000).

Além da comprovada atividade medicinal e nutracêutica, os carotenoides pertencem ao grupo de substâncias naturais cada vez mais empregadas como corantes. Nos últimos anos têm se observado um crescente aumento da rejeição ao uso de corantes artificiais. Muitas destas substâncias sintéticas são derivadas de produtos petroquímicos, o que causa preocupações quanto a possíveis alterações orgânicas causadas por sua ingestão ao longo do tempo (GHIGGI, 2007). Diante deste fato, foram formuladas leis que regulam o uso de corantes, com o objetivo de proteger a saúde da população. Essa situação tem resultado na redução do número de corantes artificiais permitidos em alimentos em vários países (DA SILVA, 2001), o que tem aumentado o interesse em pesquisas sobre pigmentos naturais, não só para aplicação em alimentos, como também nas indústrias farmacêutica, cosmética, têxtil e de papel e celulose, além do recente interesse de fabricantes de tintas para paredes (GHIGGI, 2007). Segundo dados mencionados por Ghiggi (2007), o mercado de pigmentos naturais apresenta um crescimento de 5 a 10% ao ano, enquanto o crescimento previsto para os corantes artificiais é de 3 a 5%.

As fontes de pigmentos naturais atualmente em uso são plantas, alguns animais e micro-organismos. Os corantes naturais mais utilizados em alimentos são o carmim, betalaínas, cochonilha, antocianinas, clorofila e bixina (DA SILVA, 2001; GHIGGI, 2007).

Uma vantagem no desenvolvimento de corantes derivados de fontes naturais é que muitos possuem propriedades medicinais, como é o caso dos carotenoides astaxantina, licopeno e β -caroteno (GHIGGI, 2007).

Os carotenoides utilizados comercialmente são obtidos por síntese química ou extração a partir de plantas e/ou algas, sendo que grande parte dos processos biotecnológicos para a obtenção destes pigmentos baseia-se no cultivo de micro-organismos como leveduras e microalgas (VALDUGA et al., 2009). No entanto, a crescente demanda por pigmentos naturais e o desafio de produzir essas substâncias em escala industrial, têm levado a um aumento na busca por novas estratégias que atendam a essas exigências, resultando em um crescente interesse na produção de carotenoides por meio de processos biotecnológicos (DA SILVA, 2001; Três et al., 2007; UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007; VALDUGA et al., 2009). Neste contexto, ganha destaque o uso das técnicas de cultura de tecidos vegetais como uma potente estratégia de produção *in vitro* de substâncias de interesse comercial.

Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos em meio nutritivo, sob condições assépticas e controladas de luz e temperatura. As culturas são iniciadas a partir de pequenos fragmentos de tecidos vegetais, denominados de explantes. As técnicas de cultura de tecidos baseiam-se no princípio da totipotência celular, segundo a qual as células vegetais, em sua maioria, preservam a capacidade de retornar ao seu estado meristemático e redefinir seu padrão de diferenciação. Desta forma, nas condições *in vitro*, os explantes podem regenerar órgãos ou plantas completas por meio da indução dos processos de dediferenciação e rediferenciação, que são desencadeados, principalmente, pela suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento (TERMIGNONI, 2005).

Os primeiros trabalhos com cultura de tecidos vegetais datam de 1902, quando o botânico Gottlieb Haberlandt cultivou tecidos somáticos de várias espécies de plantas em soluções nutritivas. No entanto, o primeiro trabalho com aplicação prática foi realizado em 1925 por Laibach, que conseguiu recuperar plantas híbridas obtidas de cruzamentos incompatíveis entre *Linum austriacum* L. x *L. perenne* L. Em 1960, Morel conseguiu reduzir

o tempo de propagação de orquídeas utilizando culturas de ápices caulinares (FIGUEIREDO; TAKITA, 2004).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas com diferentes objetivos, como a produção em grande escala de mudas, o melhoramento genético e a indução e/ou otimização da produção dos metabólitos secundários. Devido à sua ação nas plantas, muitos destes metabólitos apresentam importantes atividades medicinais e sua síntese *in vitro*, via cultura de tecidos, tem sido intensamente investigada (RAMACHANDRA RAO ; RAVISHANKAR, 2002; COLLIN, 2004; NASIM et al., 2010).

Uma das principais técnicas de cultura de tecidos é a propagação *in vitro* ou micropropagação, que consiste na proliferação de plantas sob condições *in vitro*, visando à obtenção de clones selecionados que mantenham as características da planta-matriz. A aplicação desta estratégia biotecnológica possibilita a produção de um grande número de mudas em um curto período de tempo e em espaço físico reduzido, com independência de variações sazonais e condições climáticas, possibilitando, desta forma, o fornecimento contínuo de material vegetal. O processo de micropropagação pode ser alcançado por três vias: proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias ou embriogênese somática. Na primeira via, gemas axilares são estimuladas a crescer dando origem a novas partes aéreas, as quais podem repetir o mesmo processo de diferenciação e multiplicação. As gemas adventícias são aquelas que surgem, por meio do processo de organogênese, em locais diferentes daqueles onde se formam normalmente durante o desenvolvimento da planta. Na organogênese direta, as gemas são induzidas à proliferação a partir da desdiferenciação celular seguida do processo de rediferenciação em tecidos que apresentam potencial morfogenético, mas que geralmente não se expressa na planta. No caso da organogênese indireta, as células do explante passam, inicialmente, por uma fase de desdiferenciação e intensa proliferação celular, dando origem a uma massa de células desorganizadas denominada de calo. A partir das células do calo surgem gemas adventícias que se desenvolvem em novas partes aéreas (TERMIGNONI, 2005).

O processo de micropropagação por embriogênese somática é caracterizado pelo desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas. Apesar de não serem resultantes da fusão de gametas, os embriões somáticos são semelhantes a embriões zigóticos, não apresentando conexões vasculares com os tecidos de origem. Assim como na organogênese, o processo pode ocorrer por via direta, quando o desenvolvimento de embriões se dá diretamente a partir de células competentes existentes no explante, ou então de forma indireta.

Neste caso, ocorre a formação do calo, no qual células individuais ou pequenos aglomerados celulares darão origem a embriões somáticos. A embriogênese somática, normalmente, é induzida pela presença no meio de cultura de uma auxina forte, como por exemplo, o 2,4-D (TERMIGNONI, 2005; GEORGE, 2008).

A cultura de órgãos, com destaque para a cultura de raízes é outra técnica empregada, principalmente com o objetivo de produzir substâncias de interesse comercial. Na maior parte dos protocolos, é utilizada a transformação por *Agrobacterium rhizogenes*, estabelecendo-se as chamadas culturas de raízes em cabeleira (*hairy roots*), que alcançam altas taxas de proliferação sem a necessidade de suplementação hormonal (GUILLON et al., 2006; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA et al., 2007). Entretanto, a obtenção de culturas de raízes não transformadas e com alta capacidade de multiplicação, embora não tão frequente, apresenta a vantagem de não haver a necessidade de alteração do genoma da planta (MARTIN et al., 2008).

A cultura de tecidos também pode ser aplicada na obtenção de massas celulares desorganizadas, através do processo de calogênese, assim como no cultivo e proliferação de células isoladas ou em pequenos aglomerados dispersos em um meio líquido sob agitação, as chamadas culturas de células em suspensão.

Culturas de calos

Calos podem ser induzidos *in vivo*, em plantas intactas ou por ferimentos causados pela ação de insetos ou de micro-organismos. Nos sistemas *in vitro*, a calogênese é obtida através da inoculação de tecidos vegetais em meio de cultura suplementado com reguladores de crescimento, os quais estimulam as células a entrar num processo de dediferenciação seguido de divisão ativa (GEORGE, 2008). Neste processo, as células, antes diferenciadas e especializadas, dão origem a uma massa de células sem uma ordem estrutural definida. Apesar de o tecido formado se apresentar desorganizado durante o processo de calogênese, alguns tipos celulares especializados como traqueídes, elementos xilemáticos e células com cloroplastos podem ser formados por meio do surgimento de centros meristemáticos, dando início à formação de órgãos como raízes, brotos ou embriões somáticos. Este potencial morfogenético é inerente ao calo, em virtude da totipotência das células vegetais,

manifestando-se de acordo com as condições de cultura às quais é submetido (TERMIGNONI, 2005). Os calos podem ser classificados em compactos, quando são fortemente lignificados, formando um tecido resistente à desagregação, ou friáveis, formados por células sobrepostas que se desagregam facilmente (SOUZA, 2007; SADO, 2009).

Diversos tipos de explantes podem ser empregados para a indução da calogênese, de acordo com a espécie vegetal. Além disso, outros fatores interferem na indução do processo como as condições fisiológicas e o genótipo da planta matriz, o tamanho do explante, as condições físicas e a composição do meio de cultura (TERMIGNONI, 2005). Para a indução da calogênese, normalmente empregam-se fitorreguladores da classe das auxinas (SADO, 2009).

Embora a produção de metabólitos secundários esteja associada à diferenciação celular, uma vez que muitas vias biossintéticas apresentam etapas ocorrendo em diferentes compartimentos celulares, culturas de células indiferenciadas têm sido utilizadas com sucesso na produção de algumas dessas substâncias. Alguns sistemas já estabelecidos resultaram em rendimentos maiores do que aqueles alcançados pelas plantas *in vivo* (VEERPORTE; MARASCHIN, 2001; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; AMARAL; SILVA, 2003). A produção de substâncias não encontradas nas plantas, além da ocorrência da biotransformação, também foram registradas (AMARAL; SILVA, 2003). Os resultados promissores já obtidos se traduzem no interesse de empresas pelo depósito de patentes com esses sistemas (MCCOY & O'CONNOR, 2008), demonstrando a grande potencialidade do uso das culturas de calos para a produção de metabólitos *in vitro*.

Culturas de células em suspensão

As culturas de células em suspensão (CCS) são iniciadas a partir da inoculação de calos friáveis em meio de cultura líquido e mantidas sob agitação contínua em mesas agitadoras (CHATTOPADHYAY et al., 2002). Nas suspensões celulares, as células encontram-se dispersas no meio ou formando pequenos agregados, apresentando normalmente maior taxa de proliferação do que as culturas de calos (MCCOY; CONNOR, 2008). Além disso, por não sofrerem a influência da composição química dos agentes solidificantes ou de gradientes físicos ou químicos, por estarem submetidas a uma agitação

constante, são consideradas sistemas mais homogêneos para a produção de substâncias de interesse, quando comparadas às culturas de calos (SAITO; MIZUKAMI, 2002). O grau de dispersão das células em suspensão é fortemente influenciado pela concentração dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. As auxinas, que influenciam no aumento da atividade de enzimas que provocam a dissolução da lamela média da parede celular são, normalmente, empregadas isoladamente ou em combinação com citocininas (GEORGE, 2008).

As CCS são classificadas em dois tipos principais de acordo com a forma de manutenção. Nas culturas em sistema fechado (batch cultures) as células são nutridas num volume fixo de meio até o crescimento cessar por exaustão dos nutrientes ou acúmulos de metabólitos. Já nas culturas contínuas o crescimento celular é mantido pela contínua reposição de meio de cultura (CHATTOPADHYAY et al., 2002).

As CCS têm sido muito utilizadas nos estudos da produção de metabólitos *in vitro* (VANISREE et al., 2004; ZHOU; WU, 2006; PARK et al., 2008; HO et al., 2010). A grande vantagem no uso desta técnica está na possibilidade de liberação das substâncias de interesse no meio de cultura, o que permite uma maior eficiência e um menor custo no processo de extração (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008). Entretanto, assim como nas culturas de calos, o maior desafio é a manutenção de uma alta produtividade em um sistema de células indiferenciadas.

Produção de metabólitos secundários *in vitro*

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas com base nas técnicas de cultura de tecidos vegetais, com o objetivo de otimizar ou mesmo induzir a produção *in vitro* de substâncias de interesse, sendo algumas destacadas pela inovação e resultados promissores. Uma dessas estratégias é o uso de meio condicionado, que consiste na utilização de meio de cultura filtrado de uma cultura de alto rendimento para induzir crescimento celular e/ou acúmulo de metabólitos em culturas de baixa produção (MORI et al., 1994; SAKURAI et al., 1996; SAKURAI et al., 1997; YAO; ZHONG, 1999). Outro procedimento consiste na imobilização de células em um suporte fixo. Estes suportes ou matrizes devem apresentar características específicas, como por exemplo, serem preparados com substâncias não reativas

e não tóxicas, além de apresentarem alta estabilidade por longos períodos e baixo custo de produção. Os primeiros estudos referentes ao uso da imobilização de células foram realizados no final da década de 70 por Brodelius e colaboradores (1979). O confinamento das células em espaços reduzidos limita o crescimento celular direcionando, desta forma, substrato e energia para a produção de substâncias de interesse. Além disso, a imobilização torna-se um fator de estresse, o que pode levar a um aumento na produção de metabólitos (SERP et al., 2000; KOMARAI AH et al., 2003; HARA et al., 2008).

Outra estratégia empregada é o da co-cultura, que trata do cultivo em conjunto de diferentes órgãos visando à otimização da produção de substâncias bioativas *in vitro*. Esta estratégia baseia-se no fato de que um metabólito produzido por um órgão e secretado no meio de cultura possa ser utilizado por outro órgão para conversões bioquímicas. Os primeiros estudos foram realizados por Subroto e colaboradores (1996), consistindo no co-cultivo de raízes transformadas de *Atropa belladonna* e brotos de *Duboisia leichhardtii*, com o objetivo de induzir a biotransformação da hiociamina, normalmente produzida pelas raízes e liberada no meio de cultura, em escopolamina, nos brotos de *Duboisia*. A co-cultura tem sido aplicada com sucesso em culturas de algumas espécies (LIN; KWOK; DORAN, 2003; SIDWA-GORYCKA et al., 2003; WU et al., 2008).

Levando em consideração que a produção de metabólitos secundários pode ser positivamente afetada pela adição de intermediários de vias biossintéticas ao meio de cultura, a adição de precursores de vias metabólicas específicas passou a ser utilizada como mais uma estratégia na otimização da produção de metabólitos secundários *in vitro* (CHATTOPADHYAY et al., 2002; PEEBLES et al., 2006; NAMDEO et al., 2007).

Além das estratégias descritas anteriormente, existem outras já desenvolvidas, com destaque para o processo de elicitação, pelo grande número de trabalhos desenvolvidos, assim como pelos resultados positivos já alcançados.

Elicitação

Denomina-se elicitação os processos de estresse químico ou físico aplicados às culturas mantidas *in vitro*, visando à indução ou à otimização da produção de metabólitos secundários (BOURGAUD, 2001). O agente elicitor induz a ativação de genes que estão associados a respostas de defesa dos vegetais. Nas condições *in vivo*, as plantas respondem ao ataque de patógenos, insetos e herbívoros ou a outros estresses bióticos ou abióticos pela ativação de mecanismos de defesa, incluindo a indução da síntese de metabólitos secundários e a formação de barreiras estruturais defensivas, como a deposição de lignina sobre a parede celular (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008; NAMDEO, 2007; VASCONSUELO; BOLAND, 2007). Desta forma, a elicitação constitui uma ferramenta útil para aumentar a produção de substâncias vegetais de interesse.

Os elicitores são classificados segundo sua origem em bióticos e abióticos. Os elicitores bióticos têm origem biológica, sendo derivados de patógenos ou sintetizados pela própria planta. Essas substâncias podem ser de composição definida, quando suas estruturas moleculares são conhecidas. Como exemplos, podem ser citadas a quitosana, polissacarídeo obtido da desacetilização da quitina, presente em invertebrados marinhos e a glucana, sacarídeo derivado da parede celular de fungos. Elicitores bióticos também podem ter uma composição complexa, quando compreendem várias classes moleculares diferentes, tornando impossível a identificação de uma estrutura química definida, como é o caso do extrato de levedura (WEATHERS; TOWLER; XU, 2010). O tratamento de elicitores abióticos incluem as condições físicas aplicadas às culturas como pH, temperatura, estresse osmótico, luz UV, e o uso de substâncias químicas como sais de metais pesados (BOURGAUD et al., 2001).

Os fitormônios ácido jasmônico e ácido salicílico, assim como os seus sais derivados, metil jasmonato e metil salicílico, têm sido utilizados com função elicitora em diversos estudos. Estas substâncias são consideradas por alguns autores como elicitores bióticos (KITIPONGPATANA; DAVIS; PORTER, 2002; AKASH; ISHIZAK; AYABE, 2005; AIJAZ; JAIN; HARIHARAN, 2011), uma vez que são substâncias encontradas nos vegetais, enquanto outros autores as classificam como abióticas por estas poderem ser sintetizadas quimicamente (PRASAD et al., 2006; ZHANG et al., 2011). O ácido jasmônico e o ácido salicílico estão envolvidos na regulação de genes de defesa como parte de um sistema de transdução de sinal nos vegetais. Aplicados exogenamente têm demonstrado capacidade de

induzir atividade metabólica secundária e promover o acúmulo de metabólitos de interesse em numerosos sistemas de cultivo vegetal *in vitro* como, por exemplo, os de espécies do gênero *Taxus* (AERTS et al., 1994; WANG; WU; YUAN, 2007) e *Catharanthus roseus* (YUKIMUNE et al., 1996; VAZQUEZ-FLOTA et al., 2009).

Diferentes elicitores podem atuar em pontos distintos de uma determinada via biossintética, induzindo respostas específicas, dependendo da interação elicitor-célula. Os elicitores não funcionam igualmente em todas as espécies vegetais, e seu efeito é dependente da concentração, do momento de adição e do tempo de exposição da cultura. Podem ser utilizados individualmente ou em combinação, para estimular a biossíntese de substâncias alvo que são acumuladas em pequenas quantidades ou normalmente não estão presentes em todas as células. O uso combinado de dois elicitores pode ser mais efetivo, quando comparado com o uso de elicitores únicos, devido ao seu efeito sinérgico (ZHANG et al., 2002).

Gênero *Cleome* L.

O gênero *Cleome* L. é representado por cerca de 200 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na África, sendo também encontrado em regiões da Ásia e das Américas (SÁNCHEZ-ACEBO, 2005). É o segundo gênero em número de espécies da família Capparaceae e seus representantes são geralmente de hábito herbáceo, conhecidos popularmente como “mussambê”. No Brasil, ocorrem aproximadamente 30 espécies (COSTA; SILVA, 2000; CARVALHO, 2002), sendo algumas cultivadas como plantas de jardim devido à beleza de suas inflorescências.

Algumas espécies do gênero são empregadas na medicina popular. *Cleome africana*, planta nativa da África e também encontrada em regiões do Caribe, é usada na medicina tradicional no tratamento do reumatismo e de inflamações (NAGAYA et al., 1997). Com a mesma indicação, *C. brachycarpa* é utilizada em países da Ásia (AHMAD et al., 1990). A espécie *C. gynandra* é bastante usada na medicina tradicional da Índia e em países da África, sendo o pó feito com suas sementes utilizado para o tratamento de hemorragias e o óleo para doenças da pele (DAS et al., 1999). Também é empregada no tratamento da úlcera péptica (TIWARI; PADHYE, 1993) e dor de dente (HEBBAR et al., 2004). O suco da folha, misturado com açúcar, tem sido utilizado contra a febre malárica (SINGH; ALI, 1994). Na

Índia, sementes de *C. viscosa* são popularmente utilizadas como anti-helmíntico, laxativo e anti-convulsivo (RAY; CHATTOPADHYAY, 1980). Além disso, o sumo obtido de folhas é usado no tratamento de otites (CHOPRA; NAYAR; CHOPRA, 1956) e dor de dente (SINGH, 1986). No Brasil os estudos são escassos, havendo apenas o registro de uso popular de duas espécies, *C. latifolia* e *C. spinosa*. Enquanto *C. latifolia* é utilizada na Amazônia na forma de infusão como analgésico e antitérmico (DI STASI et al., 1994), o infuso preparado a partir de folhas de *C. spinosa* é usado no combate à tosse, gripe e febre, além de apresentar ação gastroprotetora (LEAL et al., 2007). A planta inteira de *C. spinosa* também é utilizada com ação digestiva e cicatrizante (CABRAL; AGRA, 1998; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

A utilização na medicina tradicional de espécies do gênero *Cleome* tem despertado o interesse em estudos farmacológicos que visam fornecer um respaldo científico ao uso popular. Esses estudos já identificaram atividades medicinais tanto nas espécies de uso popular, como em diversas outras do gênero. Por exemplo, foram descritas as atividades anti-inflamatória (SHARAF; RAGAA; NABIEL, 1992; SELLOUM et al., 1995; BOURICHE et al., 2003; BOURICHE et al., 2005; NARENDHIRAKANNAN; SUBRAMANIAN; KANDASWAMY, 2005a; SIMÕES et al., 2006; NARENDHIRAKANNAN; SUBRAMANIAN; KANDASWAMY, 2007), antioxidante (SELLOUM et al., 1997; 2004; NARENDHIRAKANNAN; SUBRAMANIAN; KANDASWAMY, 2005b; SIMÕES et al., 2006), antimicrobiana (BULHÕES; SILVA; SÁ, 1976; ALMAGBOUL et al., 1985; HASHEM; WAHBA, 2000; WILLIAMS et al., 2003; SUDHAKAR et al., 2006; MCNEIL et al., 2010; SIMÕES et al., submetido 2011), antiviral (MONTHANA et al., 2006; SIMÕES et al., 2010b), antifúngica (SUDHAKAR et al., 2006), antineoplásica (DHAR et al., 1968; NASCIMENTO; CHIAPPETA; LIMA, 1990; NAGAYA et al., 1997; BALA et al., 2010), hipoglicemiante (YANIV et al., 1987; NICOLA et al., 1996; EL NAGGAR et al., 2005), antipirética (YANIV et al., 1987) e analgésica (SINGH; WEST, 1991; PARIMALADEVI; BOOMINATHAN; MANDAL, 2003).

Os primeiros estudos fitoquímicos realizados com o gênero *Cleome* consistiram no isolamento do flavonoide rutina a partir de flores de *C. chelidonii* (SUBRAMAN; NAIR; NAGARAJA, 1965). Desde então, muitas substâncias têm sido isoladas e identificadas em diferentes espécies, com destaque para substâncias da classe dos terpenoides (MAHATO; PAL; KAWASAKI, 1979; BURKE; WILFRED; HANKAN, 1980; AHMAD; ALVI, 1987; AHMAD et al., 1990; JENTE et al., 1990; PAQUETTE et al., 1993; TSICHRITZIS; ABDEL-MOJOB; JAKUPOVIC, 1993; HUSSEIN; AHMED; DARWISH 1994; HARRAZ

et al., 1995; NAGAYA et al., 1997; DAS et al., 1999; QIN et al., 2000; EL-ASKARY, 2005; FATHY; ABOUSHOER; HARRAZ, 2008; ABDEL-KADER; ALQASOUMI; AL-TAWEEL, 2009), cumarinolignoides (NAIR, 1979; RAY; CHATTOPADHYAY; KONNO, 1982; RAY et al., 1985; KUMAR et al., 1988; SHARMA et al., 2011) e glicosinolatos (AHMED *et al.*, 1972; HASHEM; WAHBA, 2000; SONGSAK; LOCKWOOD, 2002; SONGSAK; LOCKWOOD, 2004, MITHEN; BENNETT ; MARQUEZ, 2010).

Poucas espécies do gênero *Cleome* têm sido objeto de estudos biotecnológicos. Explantes foliares de *C. viscosa* (NASEEM; JHA, 1994), assim como receptáculos florais de *C. gynandra* (NASEEM; JHA, 1997) produziram calos organogênicos quando cultivados em meio MS suplementado com a associação de ANA e BAP. Culturas de calos e de células em suspensão produtoras de glicosinolatos foram obtidas com a espécie *C. chelidonii* (SONGSAK; LOCKWOOD, 2004). Protocolos de micropropagação (ALBARELLO et al., 2006) e calogênese (ALBARELLO et al., 2007) já foram estabelecidos para *C. spinosa*. Para a espécie *C. dendroides* foi avaliado o processo de germinação sob condições *in vivo* e *in vitro* (MALVÃO, 2009).

Dentre as espécies estudadas destaca-se *Cleome rosea* Vahl (Figura 2), conhecida como mussambê cor-de-rosa. Uma espécie herbácea, nativa do Brasil, de ciclo de vida anual, encontrada próxima ao litoral nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo em matas de restinga (COSTA; SILVA, 2000; CARVALHO, 2002, MARTINS et al., 2008), ecossistemas que têm sofrido intenso impacto antrópico (ZAMITH; SCARANO, 2006). A espécie tem sido objeto de estudos farmacológicos e biotecnológicos no Núcleo de Biotecnologia Vegetal/Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A micropropagação foi alcançada por organogênese pela inoculação de explantes caulinares em meios de cultura solidificados (SIMÕES et al., 2004) e em meios líquidos (SIMÕES et al., 2009a), assim como a partir de explantes radiculares inoculados em meios solidificados (SIMÕES et al., 2009a). Nesses estudos os melhores resultados foram alcançados pela suplementação dos meios de cultura com a citocinina BA. Micropropagação pela via da embriogênese somática também foi obtida a partir de calos desenvolvidos em meio de cultura suplementado com a auxina 2,4-D (SIMÕES et al., 2010a). Além do desenvolvimento de diferentes protocolos de micropropagação, a multiplicação de raízes *in vitro* também foi estabelecida pelo cultivo de raízes oriundas de plantas propagadas *in vitro* em meio líquido suplementado com auxinas (SIMÕES et al., 2009a; CORDEIRO, 2011). O processo de calogênese e o estabelecimento de culturas de células em suspensão foram obtidos para *C. rosea*. Estas duas estratégias biotecnológicas foram aplicadas para a obtenção de linhagens celulares produtoras de

pigmentos antociânicos (SIMÕES et al., 2009b; SIMÕES-GURGEL et al., 2011). Os materiais obtidos pelas diferentes estratégias biotecnológicas foram utilizados para a obtenção de extratos brutos que foram avaliados farmacologicamente, sendo constatada a presença de substâncias com os potenciais anti-inflamatório e antioxidante (SIMÕES et al., 2006), antiviral (Simões et al, 2010b) e antibacteriano (SIMÕES et al., submetido 2011).

Em função dos resultados alcançados com *C. rosea*, foi iniciada uma nova linha de pesquisa com o objetivo de induzir a produção em culturas *in vitro* de pigmentos da classe dos carotenoides, substâncias com reconhecida importância comercial, medicinal e nutracêutica.



Figura 2 - Aspectos morfológicos de *Cleome rosea* Vahl.

Legenda: a) *Habitus*; b) Inflorescência.

Fonte: http://www.ranger146.com/N_Leighton_Drive/Flower.html.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

- Estabelecer a produção de carotenoides em culturas *in vitro* de *Cleome rosea* Vahl e avaliar o seu potencial antioxidante e a toxicidade.

1.2 Específicos

- Avaliar a influência da suplementação com diferentes auxinas ao meio de cultura MS na produção de massa calogênica, visando à produção de carotenoides;
- Comparar a influência de diferentes meios de culturas (B5, Niscth, White) na produção de massa calogênica em associação com a produção de carotenoides;
- Estabelecer protocolos otimizados para a produção de carotenoides nas culturas de calos pelo processo de elicitação;
- Estabelecer culturas de células em suspensão produtoras de carotenoides;
- Avaliar o potencial antioxidante e a toxicidade dos extratos obtidos a partir das culturas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico

Plantas propagadas *in vitro* estabelecidas a partir de explantes radiculares (SIMÕES et al., 2009a) foram utilizadas como matrizes para os ensaios de calogênese (Figura 3). Estas plantas foram mantidas através de subculturas mensais em meio MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) sem suplementação hormonal (MS0) por um período de cerca de dois anos. Durante as subculturas, as plantas tiveram sua porção apical (cerca de 2 cm) excisada e inoculada, em frascos de cultura (11 x 5 cm) contendo meio MS0. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Após cerca de 30 dias em cultura as plantas foram usadas para dar início às culturas de calos.



Figura 3 - Plantas de *C. rosea* propagadas *in vitro* a partir de explantes radiculares. Barra = 1,0 cm.

2.2 Culturas de calos

Culturas de calos foram iniciadas a partir de explantes internodais (0,5 cm) que foram inoculados em meio de cultura na posição vertical, respeitando a polaridade do órgão na planta. Inicialmente foi avaliada a resposta calogênica em meio de cultura MS contendo 30

g.L⁻¹ de sacarose, suplementado com diferentes concentrações das auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Sigma) ou ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (PIC, Sigma) nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg.L⁻¹. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de agar (8 g.L⁻¹, Merck) e a esterilização foi realizada em autoclave (121° C, 104 KPa) por 15 minutos. Os meios foram distribuídos em frascos de vidro (8 x 6 cm) vedados com tampas de polipropileno e as subculturas foram realizadas mensalmente para meio fresco de igual composição.

Para determinar a influência da luz sobre o crescimento da massa calogênica, as culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 26±2°C no escuro ou sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 45 μmol m⁻²s⁻¹.

A partir dos resultados obtidos em meio MS, novos ensaios foram realizados visando avaliar a produção de massa calogênica associada à presença de pigmento em culturas de calos estabelecidas em diferentes meios básicos de cultura. Explantes caulinares foram inoculados nos meios B5(GAMBORG et al., 1968), Nitsch (NITSCH; NITSCH, 1969) e White (WHITE, 1934), que juntamente com o meio MS, representam os meios de cultura mais frequentemente utilizados. Esses novos experimentos foram mantidos nas mesmas condições de cultura descritas anteriormente. Entretanto os ensaios foram realizados apenas na presença de luz (fotoperíodo de 16h/45 μmol m⁻²s⁻¹ de intensidade luminosa), com suplementação de 2,4-D nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg.L⁻¹ e adição de 20 g.L⁻¹ de sacarose.

Para iniciar os experimentos foram inoculados quatro explantes por frasco de cultura contendo 30 mL de meio, totalizando 20 explantes por tratamento, sendo realizada uma repetição para cada ensaio. Após 60 dias de cultivo, com subcultura para meio fresco de igual composição ao final dos primeiros 30 dias, foram avaliados o acúmulo de massa calogênica pela aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS) e a produção de pigmento na superfície dos calos foi acompanhada visualmente. Para a determinação do peso seco, os calos foram mantidos em estufa a 45 °C até peso constante.

2.3 Extração, identificação e quantificação de carotenoides

Para a extração dos pigmentos produzidos pelas culturas de *C. rosea* foi adotado o procedimento estabelecido por Jacques e colaboradores (2009) para quantificação de carotenoides totais, com algumas modificações. Dois gramas de amostra foram homogeneizados em 25 mL de acetona PA (Vetec) gelada, agitando-se o conteúdo por 10 minutos. A mistura foi filtrada em papel de filtro (Whatman n.4) e o filtrado foi transferido para um funil de separação, sendo a seguir particionado com 20 mL de éter de petróleo (Vetec). Para a remoção da acetona, o conteúdo foi lavado de duas a três vezes com água destilada (100 mL), sendo realizado o descarte da fase inferior a cada lavagem. O extrato etéreo foi filtrado usando um funil contendo cinco gramas de sulfato de sódio anidro PA (Vetec) sobre um papel de filtro para remoção da água residual e transferido para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com éter de petróleo.

Os extratos foram inicialmente submetidos a uma varredura em espectrofotômetro (Shimadzu UV - 160) para a determinação do espectro de absorção entre 300 a 600 nm.

A quantificação dos pigmentos foi realizada pela leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV - 160) a 450 nm, usando como branco o éter de petróleo. O conteúdo, determinado como carotenoides totais, foi expresso em μg de β -caroteno. g^{-1} de amostra, utilizando-se a seguinte equação (JACQUES et al., 2009):

$$\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g de } \beta\text{-caroteno.g}^{-1}) = \frac{\text{ABS} \times \text{volume (25mL)} \times 10^4}{\text{Coef.} \times \text{peso da amostra (2 g)}}$$

Onde: ABS - Absorbância a 450 nm

Coef. - Coeficiente de extinção molar do β -caroteno em éter de petróleo = 2592

Para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) amostras de calos foram extraídas com acetona PA (Vetec) até a remoção de toda a pigmentação. Os extratos foram secos a vácuo sob pressão reduzida a 40° C em rotaevaporador (Markoni), liofilizados e, em seguida, ressuspensos em acetona PA (1:1). Foi utilizado um cromatógrafo com detector de arranjos de diodos (Dionex, modelo Ultimate 3000) com sistema quaternário de bombeamento de solventes, injetor “Rheodyme” com alça de amostra (loop) de 20 μL e sistema de aquisição e processamento de dados Chromeleon (Dionex). A separação foi

realizada em uma coluna C18 (Acclaim) de 250 mm x 4,6 mm com tamanho da partícula de 5 µm, vazão de 2 mL/min e temperatura da coluna mantida em forno a 29°C. Os espectros foram adquiridos entre 190 e 800 nm e os cromatogramas processados a 450 nm. O método aplicado consistiu em uma fase móvel de metanol:acetonitrila:acetato de etila (80:10:10) (CAMPOS et al., 2003). Os extratos de calo foram comparados ao padrão comercial de β - caroteno (Merck).

2.4 Modulação da produção de carotenoides *in vitro*

Com o objetivo de estabelecer condições de cultura que associassem acúmulo de biomassa e produção de carotenoides, calos com 60 dias em cultivo que alcançaram o maior acúmulo de massa calogênica foram transferidos para as condições *in vitro* onde foi observada uma maior produção de pigmento na superfície dos calos. Após 60 e 90 dias nestas novas condições, com subculturas para meio fresco de igual composição a cada 30 dias, foi realizada a quantificação de carotenóides totais segundo metodologia descrita no item 3.C. O acúmulo de biomassa foi avaliado pela aferição de PF e PS. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo transferidos para as novas condições de cultura quatro calos por frasco contendo 30 mL de meio, totalizando 20 calos por tratamento.

2.4.1 Elicitação

Visando otimizar a produção de carotenoides em calos de *C. rosea*, culturas já estabelecidas na condição que propiciou a maior produção de massa calogênica foram submetidas à exposição aos elicitores quitosana, metil jasmonato e extrato de levedura. Embora não haja trabalhos de elicitação *in vitro* visando à obtenção de carotenoides, os elicitores selecionados para o presente trabalho têm sido utilizados na indução de terpenos, grupo químico do qual fazem parte os carotenoides. Calos com 60 dias de cultivo foram

transferidos para o meio de igual composição suplementado com diferentes concentrações dos elicitores: extrato de levedura (200; 400 mg.L⁻¹) (GE; WU, 2005; CHO et al., 2008), quitosana (1,0; 2,5; 5,0 mg.L⁻¹) (RAHMANI; ZAKARIA; KADIR, 2003; KIM et al., 2006) e metil jasmonato (100; 200; 300 µM) (PI et al., 2010; MANGAS et al., 2006). As culturas foram mantidas na presença dos elicitores por sete ou quatorze dias, sendo a seguir transferidas para meio fresco sem a presença destas substâncias. A quantificação de carotenoides, assim como o acúmulo de biomassa foram avaliados 60 e 90 dias após o início do tratamento de elicitação, conforme descrito no item 2.3. Para a realização dos experimentos foram mantidos quatro calos por frasco contendo 30 mL de meio, totalizando 20 calos por tratamento, sendo realizada uma repetição para cada tratamento.

2.5 Culturas de células em suspensão

Para dar início às culturas de células em suspensão (CCS), foram selecionados calos produzidos nas condições de cultura que resultaram no maior acúmulo de massa calogênica. 1,5 gramas de calos foram inoculados em meio MS líquido contendo, inicialmente, a mesma composição salina e hormonal utilizada para a calogênese. As culturas foram estabelecidas em frascos erlenmeyers (50 mL) contendo 25 mL de meio de cultura, vedados com tampas duplas de folha de alumínio. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento a 26±2°C sob fotoperíodo de 16 h (45 µmol m⁻²s⁻¹) em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), empregando uma velocidade de agitação de 100 rpm.

Para a determinação da curva de crescimento foi utilizado um sistema de filtração (NalgeneTM Cat.No. 320-2533) conectado a uma bomba de vácuo (GAST[®] manufacturing Inc.). O acúmulo de biomassa foi estimado pela aferição de PF e PS. Para a obtenção do PS, o material foi seco em estufa a 45°C até atingir peso constante. O crescimento das culturas foi acompanhado por um período de 43 dias, com filtração de três culturas a cada quatro/cinco dias para a avaliação do acúmulo de biomassa. Uma vez estabelecida a curva de crescimento, as CCS passaram a ser subcultivadas na fase exponencial de crescimento visando a manutenção de um alto acúmulo de biomassa.

Para o estabelecimento de CCS produtoras de carotenoides, culturas foram iniciadas a partir de calos submetidos ao tratamento de elicitação que resultou na maior produção de

pigmento. As CCS foram acompanhadas por três subculturas realizadas a intervalos de 20 dias em culturas. Em cada subcultura eram avaliados a produção de biomassa (PF e PS) e realizada a quantificação do pigmento conforme metodologia descrita anteriormente no item 2.3. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo mantidos cinco frascos de culturas para cada tratamento.

2.6 Análise estatística

Os resultados referentes à produção de biomassa e à quantificação de carotenoides 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.

2.7 Avaliação do potencial antioxidante das culturas *in vitro*

2.7.1 Preparo dos extratos

Para a avaliação do potencial antioxidante, calos frescos, obtidos a partir da melhor condição de cultura para o crescimento da massa calogênica e produção de carotenoides, foram extraídos com acetona PA (Vetec) até a remoção de toda a sua pigmentação. Os extratos foram secos a vácuo sob pressão reduzida a 40° C em rotaevaporador (Markoni), liofilizados, armazenados no escuro a 4°C e diluídos em solução aquosa de tween a 5 % para a realização dos experimentos.

2.7.2 Potencial antigenotóxico

Foi avaliada a proteção do DNA à quebra causada pelo cloreto estanoso (SnCl_2), pelo modelo experimental desenvolvido por Caldeira-de-Araújo e colaboradores (1996). As lesões induzidas pelo SnCl_2 são responsáveis por alterações conformacionais do DNA, levando a modificações no padrão de migração, durante a eletroforese em gel de agarose. Enquanto o DNA íntegro encontra-se na forma superenovelada (*supercoiled*), a ação do SnCl_2 acarreta em quebras na molécula de DNA que passa a uma forma denominada de círculo aberto (*open circle*), influenciando o padrão de migração durante a eletroforese que passa a ser mais lento quando comparado ao padrão da molécula de DNA íntegra.

Os ensaios realizados no presente trabalho foram baseados em estudos prévios com extratos de plantas de campo e aclimatizadas de *C. rosea* (SIMÕES et al., 2006). Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações dos extratos (5; 25; 50; 100; 150; 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre a molécula de DNA plasmidial na presença ou na ausência de uma solução de SnCl_2 à 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O plasmídeo utilizado foi o PUC 9.1 da cepa de *E. coli* DH5 α F'IQ, extraído de acordo com o protocolo do kit de purificação Invisorb Sprin Plasmid Mini Two da Invitex. Para a realização dos ensaios foram utilizados tubos tipo eppendorfs de 1,5 mL, nos quais foram adicionados 5 μL da solução de DNA, diferentes concentrações do extrato e 4 μL da solução de SnCl_2 . O volume final de reação foi ajustado para 50 μL pela adição de água Milli-Q e os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 40 min. Como controles foram utilizados tubos contendo apenas DNA plasmidial, DNA apenas em presença da solução de SnCl_2 , e DNA acrescido das diferentes concentrações do extrato (Figura 4). Após este período foi retirada de cada tubo uma alíquota (10 μL), à qual foi acrescentado 2 μL de tampão de carregamento (azul de bromofenol - 0,25%; xilenocianol - 0,25% e glicerol - 30%). Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, em tampão TAE (Tris-acetato EDTA) 1x, aplicando-se uma diferença de potencial de 70 volts, por 30 min. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e as bandas de DNA foram visualizadas em sistema de transiluminador sob luz ultravioleta (UVP transilluminator).

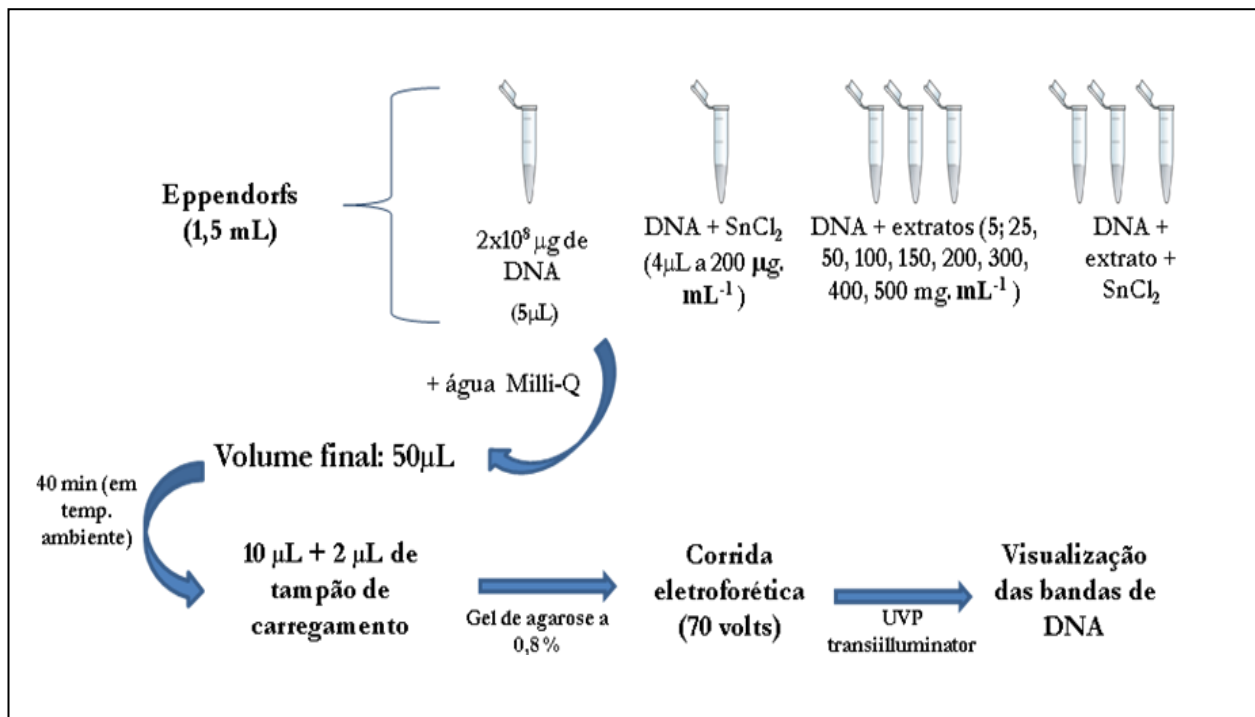


Figura 4 – Ensaio antígeno-tóxico baseado no modelo experimental desenvolvido por CALDEIRA-DE-ARAÚJO e colaboradores (1996).

Estes estudos foram realizados em colaboração com o Departamento de Biofísica e Biometria - UERJ, sob a supervisão dos Profs. Dr. Adriano Caldeira de Araújo e Dr. José Carlos P. de Mattos.

2.8 Avaliação da toxicidade das culturas *in vitro*

Para avaliar a toxicidade dos extratos foi utilizado o bioensaio de letalidade com *Artemia salina* (Brine Shrimp Test - BST) do acordo com Meyer e colaboradores (1982) com algumas modificações. Cerca de 1 g de ovos foram incubados em 100 mL de água do mar a 28 °C. Após a eclosão (48 h), dez larvas (*nauplii*) foram transferidas com o auxílio de uma pipeta Pasteur para tubos de ensaio contendo 5 mL de água do mar e concentrações crescentes dos extratos. Experimentos controle foram preparados com o cultivo das larvas apenas em água do mar e em água do mar com tween a 5%. Após 24 horas do início dos experimentos

foi contabilizado o número de larvas vivas. No caso de ocorrerem mortes nos experimentos controle, os dados foram corrigidos pela fórmula abaixo, segundo Amara e colaboradores (2008).

$$\% \text{ morte} = [(mortos \text{ no teste} - mortos \text{ no controle})/10] \times 100$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

3 RESULTADOS

3.1 Culturas de calos

Nas culturas mantidas em meios suplementados com 2,4-D, o início da resposta calogênica foi verificado na primeira semana em cultivo, caracterizado pelo intumescimento dos explantes, com posterior produção de calos friáveis de coloração branca na extremidade voltada para o meio de cultura. Esta resposta foi mais acentuada nas culturas mantidas em meios suplementados com as menores concentrações do fitorregulador, enquanto que em meios contendo 5,0 e 10,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, o intumescimento dos explantes foi menos intenso e verificado apenas durante a segunda semana em cultivo.

A concentração de 2,4-D e a luminosidade influenciaram o crescimento da massa calogênica (Figura 5). O maior crescimento foi alcançado nas menores concentrações testadas (0,2; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹) e na presença de luz, quando comparado às culturas estabelecidas no escuro (Figura 6). Já o cultivo nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg.L⁻¹ resultou em uma significativa redução da produção de biomassa, independentemente da presença ou ausência de luz, provavelmente em consequência de uma ação tóxica do fitorregulador nestas altas concentrações.

Ao longo do tempo em cultura, foi observada a produção de pigmento de coloração alaranjada na superfície dos calos. A produção desse pigmento iniciava em torno da terceira semana de cultivo, de forma pontual ao longo da massa calogênica adquirindo uma distribuição homogênea com o passar do tempo em cultura. Pela análise de varredura dos extratos de calos por espectrometria no UV-vis entre 300 a 600 nm foi obtido um espectro de absorção com perfil característico de carotenoides, apresentando como comprimentos de onda de maior absorbância os valores de 453 nm e 478 nm (Figura 7). Os extratos também foram submetidos à análise por CLAE. O cromatograma obtido a partir dos calos (Figura 8c) apresentou três picos cujos espectros de absorção na região visível mostraram características de carotenoides. O pico denominado “Pico 1” apresentou como comprimentos de onda de maior absorbância os valores de 452 nm e 475 nm, enquanto que para o “Pico 2” estes valores foram de 451nm e 478 nm. Já o “Pico 3” foi identificado como β-caroteno. A identificação foi feita através da comparação com o padrão comercial de β-caroteno (Figura 8a) que apresenta

um espectro de absorção na região visível com bandas em 452 nm e 477 nm (Figura 8b). A coinjeção do extrato de calo com o padrão de β -caroteno (10:1) resultou em um aumento da intensidade do pico 3 (Figura 8d).

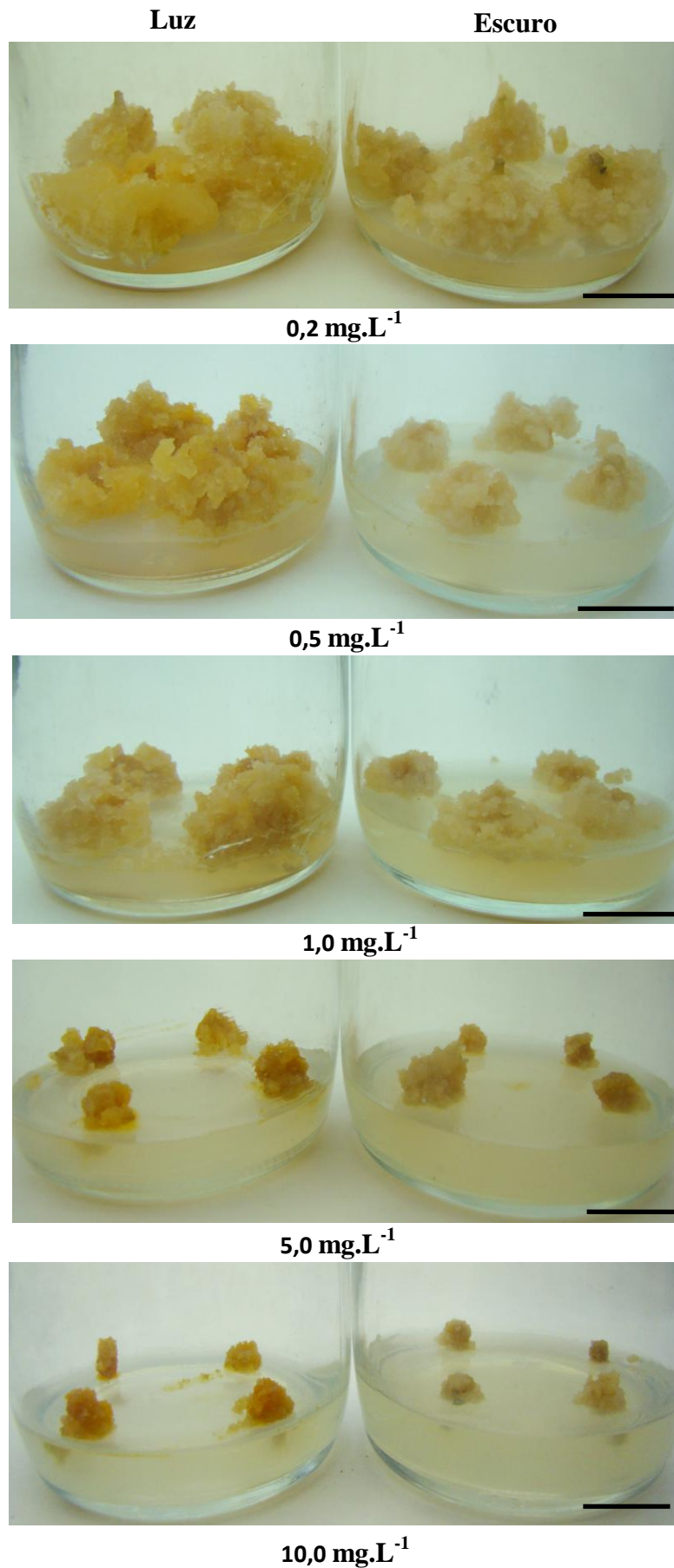


Figura 5 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L^{-1}), após 60 dias de cultivo em regime de luz ou escuro. Barras = 1,0 cm.

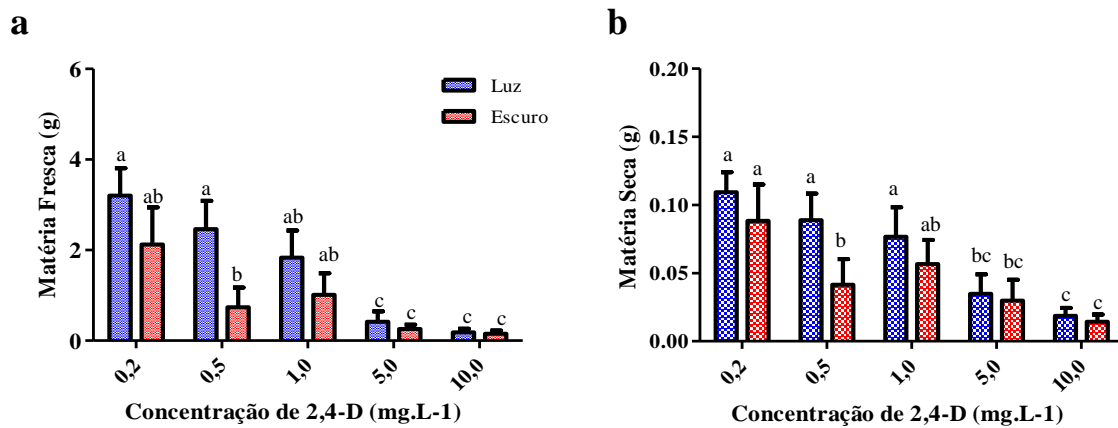


Figura 6 - Produção de massa calogênica a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, após 60 dias em cultivo em regime de luz ou escuro.

Legenda: a) Peso de matéria fresca; b) Peso de matéria seca.

Nota: Letras iguais nas colunas significa não haver diferença estatística entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

A presença da luz se mostrou essencial à síntese *in vitro* de carotenoides, uma vez que as culturas mantidas no escuro não apresentaram pigmentação em nenhuma das condições testadas. Calos produzidos nas maiores concentrações de 2,4-D (5,0 e 10,0 mg.L⁻¹) apresentavam uma maior cobertura de pigmento em sua superfície. Entretanto, como citado anteriormente, nestas concentrações o crescimento da massa calogênica foi significativamente menor quando comparado aos demais tratamentos. A produção de carotenoides foi observada de forma homogênea por toda a superfície dos calos (Figura 9a), embora, em alguns casos, tenha sido verificada uma produção pontual, mas que com o passar do tempo em cultura assumia o mesmo padrão anteriormente descrito (Figura 9b). A produção de pigmento influenciou o crescimento da massa calogênica, sendo constatado que o aumento da produção de carotenoides resultava em uma redução na taxa de crescimento dos calos.

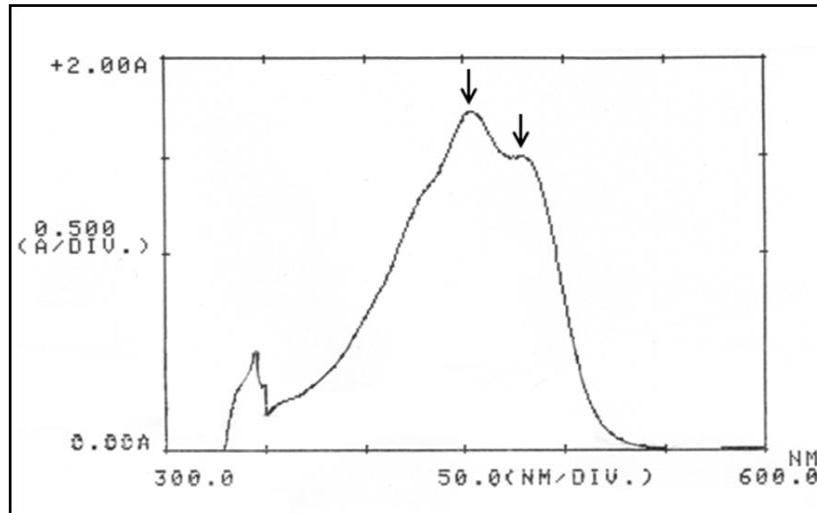


Figura 7 - Espectro de absorção de extratos de calos de *C. rosea* produzidos em meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, apresentando como comprimentos de onda de maior absorbância os valores de 453 nm e 478 nm (setas).

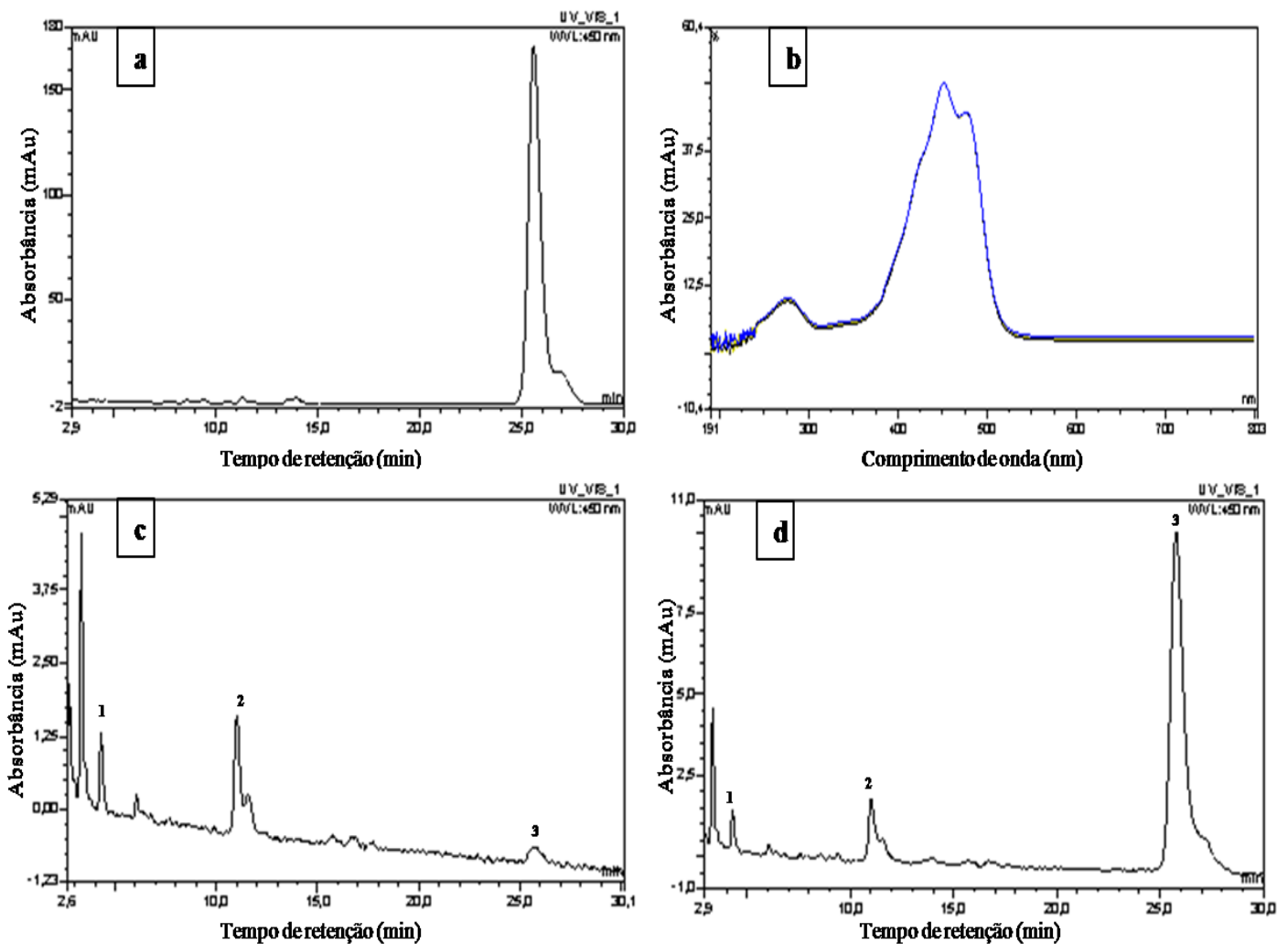


Figura 8 - Cromatograma obtido por CLAE a partir (a) do padrão comercial de β -caroteno e seu respectivo (b) espectro de absorção na região visível. Cromatograma do (c) extrato de calo de *C. rosea* produzido em meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e da (d) coinjeção do extrato de calo com o padrão de β -caroteno (10:1).

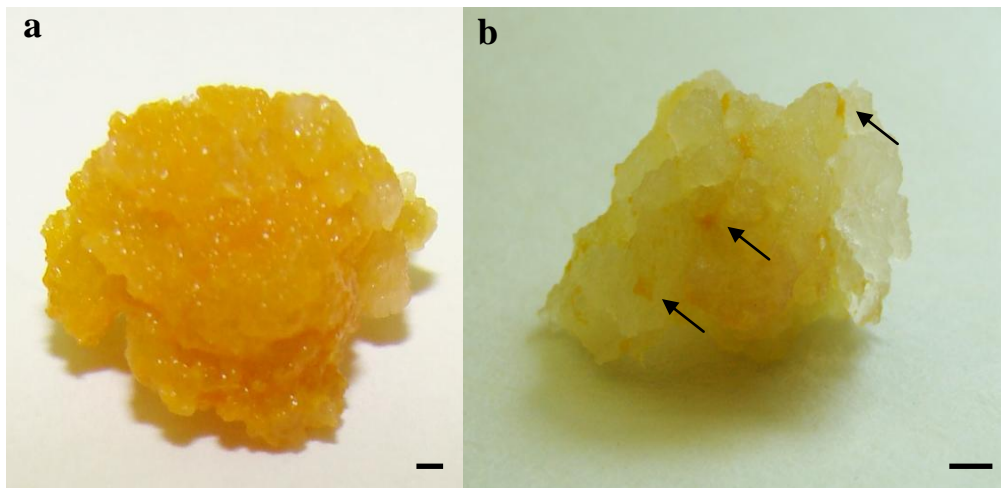


Figura 9 - Produção de carotenoides em calos de *C. rosea* após 30 dias em cultivo.

Legenda: a) Produção por toda a superfície do calo cultivado em meio contendo 10 mg.L^{-1} de 2,4-D; b) Produção pontual (setas) em calo cultivado.

Culturas estabelecidas em meio MS suplementado com PIC apresentaram resultados semelhantes àqueles obtidos nos experimentos com 2,4-D com relação ao maior crescimento da massa calogênica em presença de luz e à ausência de produção de pigmento quando as culturas foram mantidas no escuro (Figura 10). Entretanto, diferentemente do que havia sido observado com o uso de 2,4-D, a suplementação dos meios de cultura com as maiores concentrações de PIC ($5,0$ e $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$) não acarretou em uma significativa redução do crescimento da massa calogênica (Figura 11). Embora as culturas estabelecidas em meio com PIC também tenham produzido carotenoides ao longo do tempo em cultura, os calos mantidos nesse fitorregulador apresentavam visualmente uma coloração alaranjada menos intensa quando comparado às culturas em 2,4-D (Figura 10).

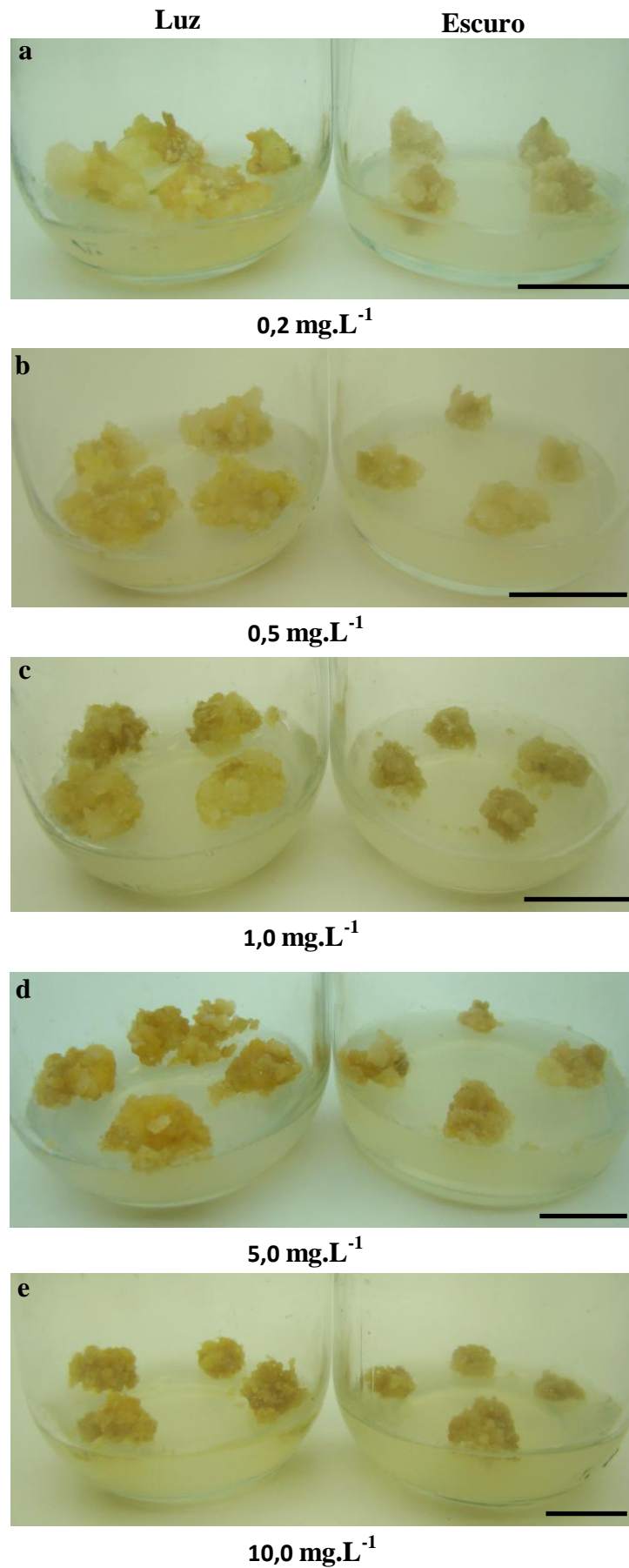


Figura 10 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC (mg.L^{-1}), após 60 dias de cultivo em regime de luz ou escuro. Barras = 1,0 cm.

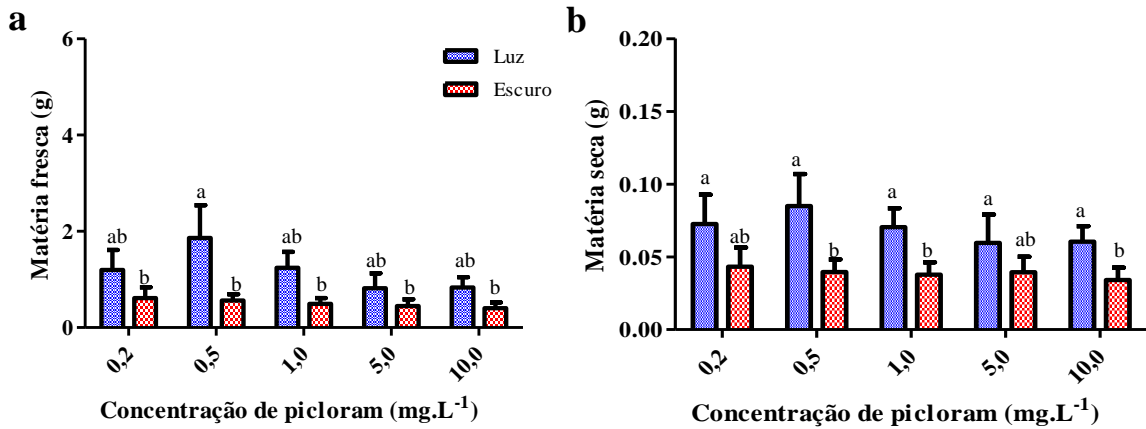


Figura 11 - Produção de massa calogênica a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultivo em regime de luz ou escuro.

Legenda: a) Peso de matéria fresca; b) Peso de matéria seca.

Nota: Letras iguais nas colunas significa não haver diferença estatística entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

Quando os ensaios com 2,4-D e PIC foram avaliados conjuntamente, foi possível observar que o crescimento da massa calogênica foi maior na presença de 2,4-D nas menores concentrações testadas. Nas maiores concentrações (5,0 e 10,0 mg.L⁻¹), uma maior produção de biomassa foi alcançada pelas culturas mantidas em meio com PIC (Figura 12).

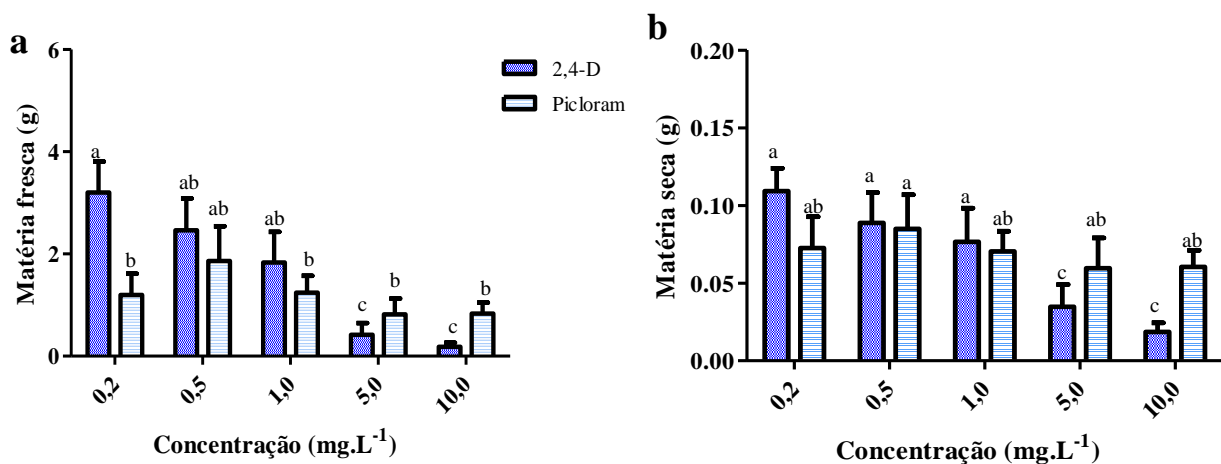


Figura 12 - Crescimento da massa calogênica nas culturas estabelecidas em meios suplementados com 2,4-D e PIC, após 60 dias de cultivo na presença de luz.

Legenda: a) Peso de matéria fresca; b) Peso de matéria seca.

Nota: Letras iguais nas colunas significa não haver diferença estatística entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

Nos ensaios realizados com diferentes meios básicos de cultura, a indução de calogênese em meio B5 foi observada a partir da primeira semana de cultivo, repetindo o mesmo padrão observado no meio MS. Assim como verificado em MS, a maior produção de massa calogênica foi alcançada nas menores concentrações hormonais (Figuras 13), sendo obtida uma maior biomassa de matéria fresca nas culturas mantidas em $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Com relação ao acúmulo de matéria seca, não houve diferença estatística entre as menores concentrações hormonais avaliadas (Figura 14). Calos estabelecidos em meio B5 suplementado com $0,2$ ou $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D apresentaram capacidade organogênica com indução de raízes. A produção de pigmento começou a ser observada a partir da terceira semana de cultivo. Calos rizogênicos, produzidos em meio com adição de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, mostraram uma maior pigmentação, principalmente quando comparado às culturas estabelecidas em meio MS nas menores concentrações de 2,4-D. Além da superfície dos calos, a produção de pigmento também foi verificada nas raízes (Figura 15).

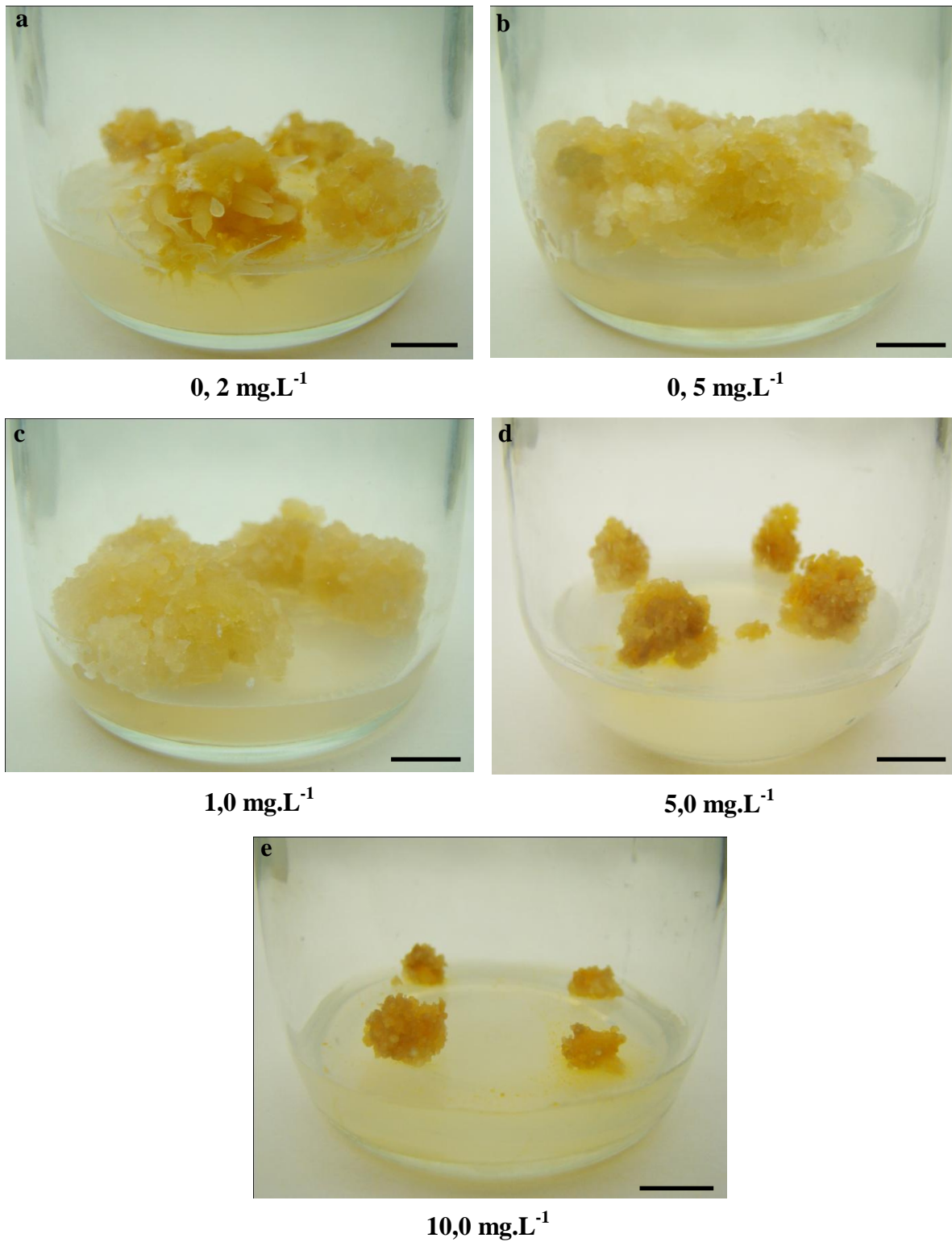


Figura 13 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L^{-1}), após 60 dias de cultivo na presença de luz. Barras = 1,0 cm.

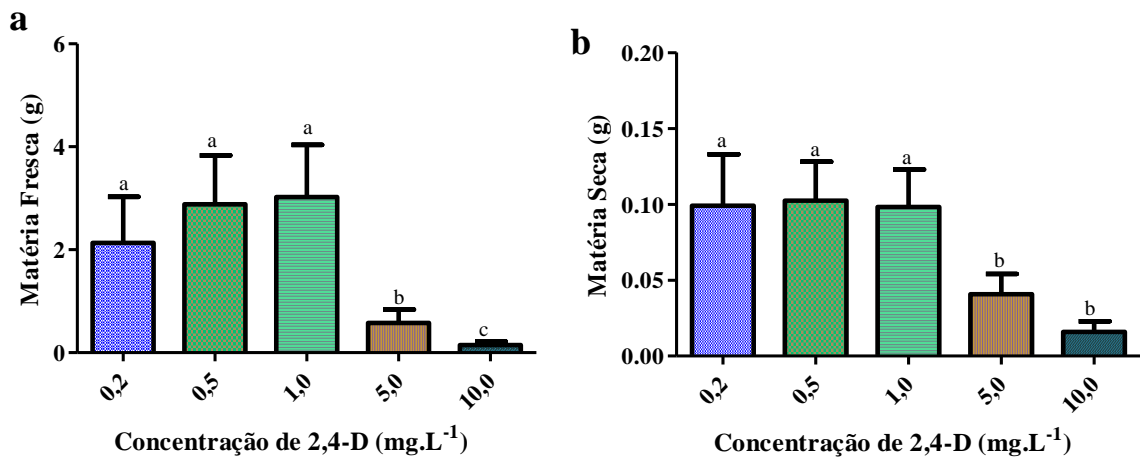


Figura 14 - Produção de massa calogênica, a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, após 60 dias de cultivo na presença de luz.

Legenda: a) Valores de matéria fresca; b) Valores de matéria seca.

Nota: Letras iguais nas colunas significa não haver diferença estatística entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).



Figura 15 - Desenvolvimento de raízes em calo de *C. rosea* produzido em meio B5 suplementado com 0,20 mg.L⁻¹ de 2,4-D, após 60 dias de cultura em presença de luz.

Nota: As setas indicam a produção de carotenoide nas raízes. Barra = 1,0 cm.

As culturas estabelecidas em meio Nitsch iniciaram o processo de calogênese na primeira semana em cultivo nas menores concentrações de 2,4-D (0,2; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹), com o intumescimento dos explantes ocorrendo a partir de sua base diretamente em contato com o meio. Nas maiores concentrações hormonais esta resposta foi observada apenas a partir da segunda semana. Como verificado anteriormente nos ensaios em MS e B5, o crescimento da massa calogênica foi maior nas culturas submetidas aos tratamentos com as menores concentrações de 2,4-D (Figuras 16). Culturas produzidas em meio contendo 0,2 mg.L⁻¹ do fitorregulador apresentaram a maior produção de biomassa, tanto com relação aos demais tratamentos em meio Nitsch (figura 17), assim como em relação aos ensaios realizados nos meios MS e B5. Entretanto, os calos apresentaram capacidade organogênica, com a produção de gemas e em alguns casos também de raízes (Figura 18a). Desta forma, este meio não se mostrou adequado para atender aos objetivos do trabalho, uma vez que a indução de brotos poderia comprometer a produção dos calos. Além disso, calos friáveis e não organogênicos seriam mais adequados para o posterior estabelecimento das culturas de células em suspensão. Quanto à produção de carotenoides, a suplementação com as maiores concentrações hormonais, apesar de resultar em um menor acúmulo de biomassa, influenciou positivamente a produção de pigmento. Uma característica observada em algumas culturas em meio Nitsch foi a secreção do pigmento para o meio de cultura (Figura 18b).

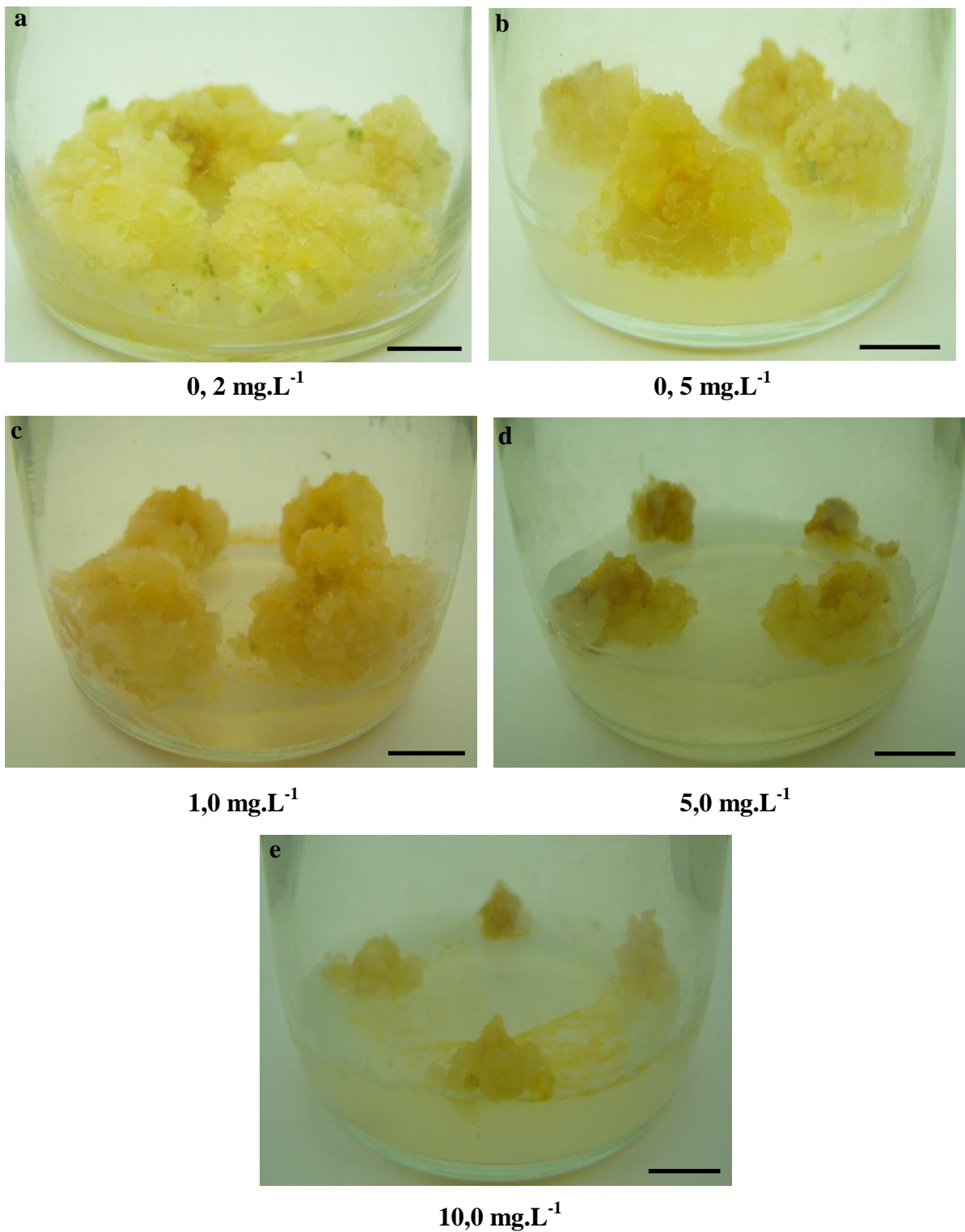


Figura 16 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio Nitsch suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L⁻¹), após 60 dias de cultivo na presença de luz. Barras = 1,0 cm.

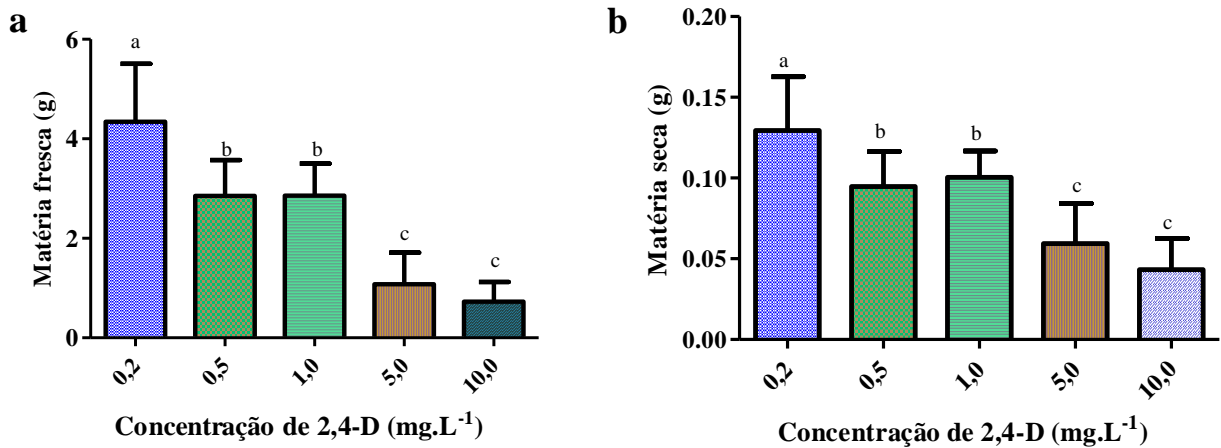


Figura 17 - Produção de massa calogênica a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio Nitsch suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, após 60 dias de cultivo na presença de luz.

Legenda: a) Peso de matéria fresca; b) Peso de matéria seca.

Nota: Letras iguais nas colunas significa não haver diferença estatística entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

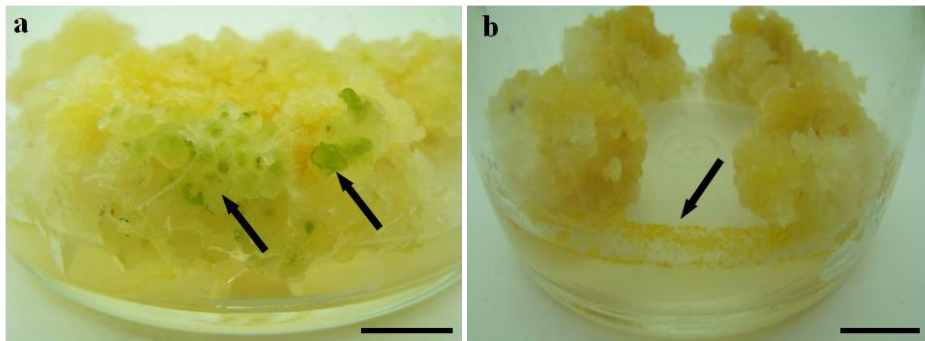


Figura 18 - Calos produzidos em meio Nitsch após 60 dias de cultura.

Legenda: a) Calo organogênico (setas) produzido em meio suplementado com 0,20 mg.L⁻¹ de 2,4-D; b) Calos mantidos em meio suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D apresentando secreção de pigmento (seta) para o meio de cultura. Barras = 1,0 cm.

O uso do meio de White não se mostrou eficiente tanto para a produção de biomassa como para a produção de pigmento. O início do processo calogênico ocorreu de forma semelhante ao observado nos demais meios de cultura avaliados anteriormente, com o intumescimento da base dos explantes. Entretanto, esta resposta só foi observada a partir da terceira semana em cultivo. Embora o uso de 2,4-D na menor concentração tenha propiciado a maior produção de biomassa, as culturas estabelecidas em meio de White apresentaram os menores valores de peso de matéria fresca e seca (Figuras 19 e 20), quando comparadas

àquelas obtidas nos demais meios básicos avaliados. Diferentemente do observado para os meios B5 e Nitsch, calos estabelecidos em meio de White não apresentaram características organogênicas. Nestes calos, a produção de pigmento foi observada apenas após a quinta semana de cultivo, sendo uma maior pigmentação verificada em calos mantidos nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

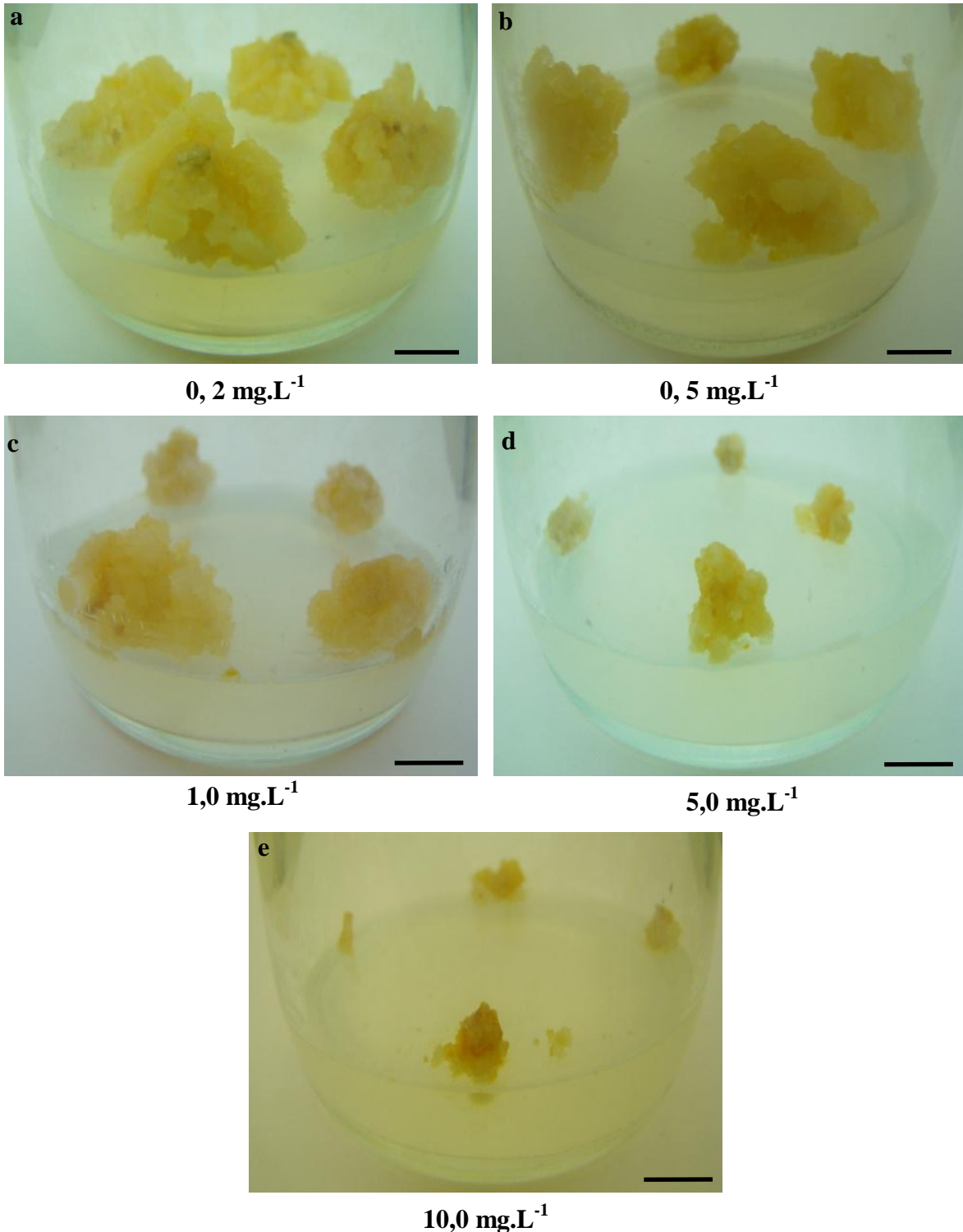


Figura 19 - Massa calogênica formada a partir de explantes caulinares inoculados em meio White suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L⁻¹), após 60 dias em cultura em regime de luz. Barras = 1,0 cm.

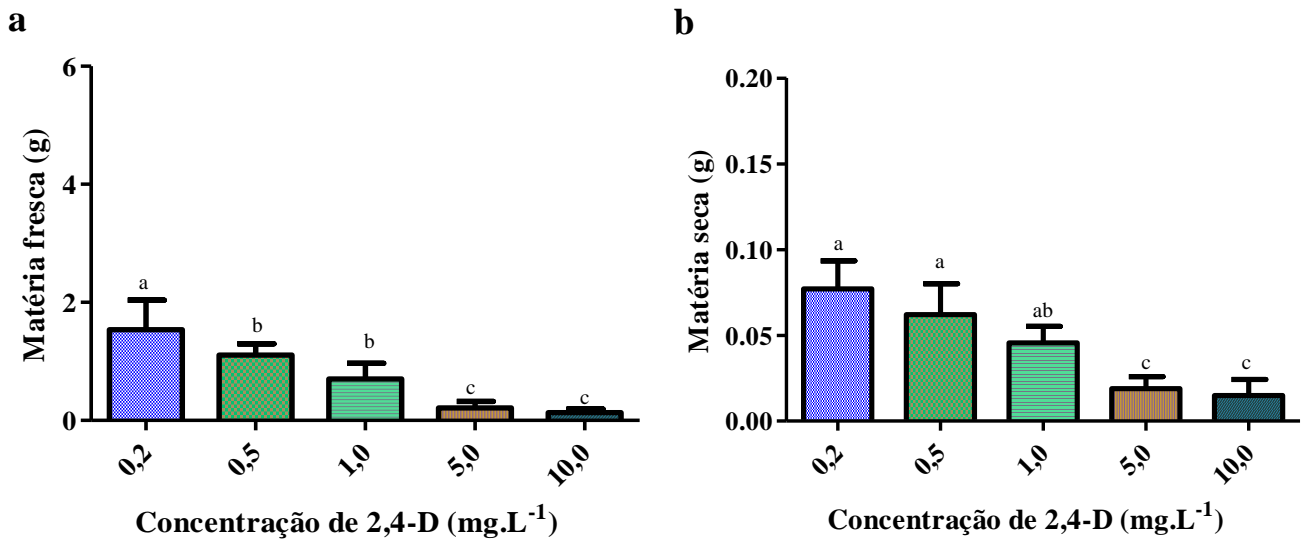


Figura 20 - Produção de massa calogênica a partir de explantes caulinares de *C. rosea* inoculados em meio White suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D, após 60 dias em cultivo na presença de luz.

Legenda: a) Peso de matéria fresca; b) Peso de matéria seca.

Nota: Letras iguais nas colunas significa não haver diferença estatística entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

Os resultados alcançados na primeira etapa do trabalho demonstraram que a produção de massa calogênica foi fortemente influenciada pelo tipo e concentração do regulador de crescimento. Estes fatores também foram importantes para a produção de carotenoides, juntamente com a necessidade de manutenção das culturas na presença de luz. Os parâmetros avaliados também foram influenciados pela concentração salina dos diferentes meios de cultura, principalmente quanto à produção de biomassa. Em função destes resultados, foi selecionado o cultivo em meio MS suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, e na presença de luz, como a condição padrão para a produção de massa calogênica

3.2 Modulação da produção de carotenoides *in vitro*

Visando estabelecer um protocolo que contemplasse o acúmulo de biomassa associado a uma alta produção de carotenoides, calos produzidos em MS suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, após 60 dias em cultura, foram transferidos para condições que, nos experimentos

anteriores, resultaram em uma maior produção do pigmento na superfície dos calos. Os calos foram transferidos para meio MS suplementado com 10,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D ou para meio B5 suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Ao final de 60 e 90 dias em cultura, foram determinados o acúmulo de biomassa e foi realizada a quantificação da produção de carotenoides. Os resultados foram comparados àqueles alcançados pelas culturas controle mantidas por todo o período experimental em meio MS + 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

A transferência dos calos para as novas condições de cultura não influenciou a produção da massa calogênica. Com relação à produção de pigmento, os maiores valores foram alcançados pelas culturas mantidas em MS + 0,2 mg.L⁻¹ 2,4-D (Tabela 1). Entretanto, as culturas transferidas para meio MS suplementado com 10,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D apresentaram o maior aumento percentual quando comparado aos valores alcançados em 60 e 90 dias de cultivo, respectivamente. O subcultivo dos calos em meio B5 não se mostrou favorável para a produção de pigmento. Culturas transferidas para este meio apresentaram os menores valores de produção do pigmento. Calos obtidos em meio MS ao serem transferidos para o meio B5 não apresentaram a formação de raízes como observado anteriormente nas culturas estabelecidas diretamente em B5.

Tabela 1 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de calos de *C. rosea*. As avaliações foram realizadas após 60 e 90 dias da transferência dos calos do meio MS + 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D para diferentes meios de cultura.

Condição de cultura	Período em cultura					
	60 dias			90 dias		
	CT (µg. g ⁻¹)	PF (g)	PS (g)	CT (µg. g ⁻¹)	PF (g)	PS (g)
MS + 0,2 mg.L ⁻¹ 2,4-D	3,45±0,01 ^a	4,00±1,49 ^a	0,24±0,10 ^a	4,70±1,30 ^a	4,40±2,45 ^a	0,26±0,14 ^a
MS + 10,0 mg.L ⁻¹ 2,4-D	2,82±0,14 ^a	2,80±0,04 ^b	0,15±0,01 ^{ab}	4,20±0,30 ^a	3,95±0,76 ^a	0,23±0,05 ^a
B5 + 0,2 mg.L ⁻¹ 2,4-D	2,45±0,84 ^a	5,72±1,69 ^a	0,28±0,17 ^a	2,00±1,00 ^b	4,46±1,21 ^a	0,27±0,14 ^a

Os dados representam média±desvio padrão. A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

3.2.1 Elicitação das culturas de calos

A maior produção de pigmento, quantificada pelo cálculo de carotenoides totais (CT), após 60 dias do início do tratamento com o elicitor quitosana, foi verificada nas culturas submetidas à concentração de 5,0 mg.L⁻¹ por um tempo de exposição de sete dias (Tabela 2). O valor de CT alcançado por essas culturas foi estatisticamente superior aos demais

tratamentos e representou um aumento de cerca de três vezes quando comparado às culturas mantidas na condição controle. Porém, quando as culturas permaneceram expostas a esta mesma concentração pelo dobro do tempo (14 dias) foi observada uma significativa redução na produção de pigmento. O tempo de exposição ao elicitor não foi um fator significativo quando foram utilizadas as menores concentrações de quitosana (1,0; 2,0 mg.L⁻¹). Após 90 dias da elicitação foi verificado um aumento nos valores de CT tanto nas culturas elicidadas, independentemente da concentração de quitosana, como nas culturas controle (Tabela 2). Neste período, embora as culturas submetidas ao tratamento de 5,0 mg.L⁻¹ por sete dias tenham alcançado valores de produção mais elevados, estes resultados não diferiram estatisticamente daqueles verificados para as culturas expostas à concentração de 1 mg.L⁻¹, independentemente do tempo de exposição ao elicitor. Além disso, as culturas submetidas a esta menor concentração de quitosana apresentaram um maior aumento percentual dos valores de CT quando avaliada a resposta de produção aos 60 e aos 90 dias após o início do tratamento (Tabela 2).

O aumento nos valores de CT nos calos mantidos em condição controle mostra a susceptibilidade dessas culturas à produção de pigmento à medida que permanecem nas condições *in vitro*, embora os tratamentos de elicitação tenham otimizado esta resposta.

Com relação ao acúmulo de massa calogênica, verificada pela avaliação dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS), independentemente dos tratamentos aos quais as culturas foram submetidas, não houve diferença estatística durante o período de acompanhamento (Tabela 2 e Figura 21).

Tabela 2 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de calos de *C. rosea* submetidas à exposição por sete ou 14 dias a diferentes concentrações de quitosana, após 60 e 90 dias do início do tratamento.

Quitosana (mg.L ⁻¹)	Período em cultura					
	60 dias			90 dias		
	CT (µg. g ⁻¹)	PF (g)	PS (g)	CT (µg. g ⁻¹)	PF (g)	PS (g)
*	1,37±0,06 ^b	3,28±0,83 ^{ab}	0,18±0,03 ^a	5,12±0,63 ^b	3,84±0,72 ^a	0,24±0,04 ^a
1,0 (7 dias)	1,95±0,72 ^b	2,73±0,36 ^b	0,17±0,02 ^a	10,73±0,82 ^a	3,19±0,73 ^a	0,21±0,05 ^a
1,0 (14 dias)	3,45±1,07 ^b	2,90±0,52 ^b	0,13±0,03 ^a	9,11±2,55 ^{ab}	3,38±0,31 ^a	0,17±0,01 ^{ab}
2,5 (7 dias)	2,80±1,50 ^b	5,23±1,46 ^a	0,26±0,13 ^a	4,16±0,86 ^b	4,37±0,99 ^a	0,29±0,08 ^a
2,5 (14 dias)	3,70±1,40 ^b	4,34±1,08 ^{ab}	0,24±0,09 ^a	5,47±1,47 ^b	4,36±0,80 ^a	0,28±0,06 ^a
5,0 (7 dias)	7,91±2,07 ^a	2,09±0,85 ^b	0,10±0,05 ^{ab}	9,43±2,20 ^{ab}	4,03±0,79 ^a	0,27±0,03 ^a
5,0 (14 dias)	4,30±1,59 ^b	2,28±0,96 ^b	0,14±0,03 ^a	7,29±2,36 ^b	3,17±1,01 ^a	0,20±0,07 ^a

* Calos não elicitados mantidos em meio MS + 0,2 mgL⁻¹ de 2,4-D.

Os dados representam média±desvio padrão. A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

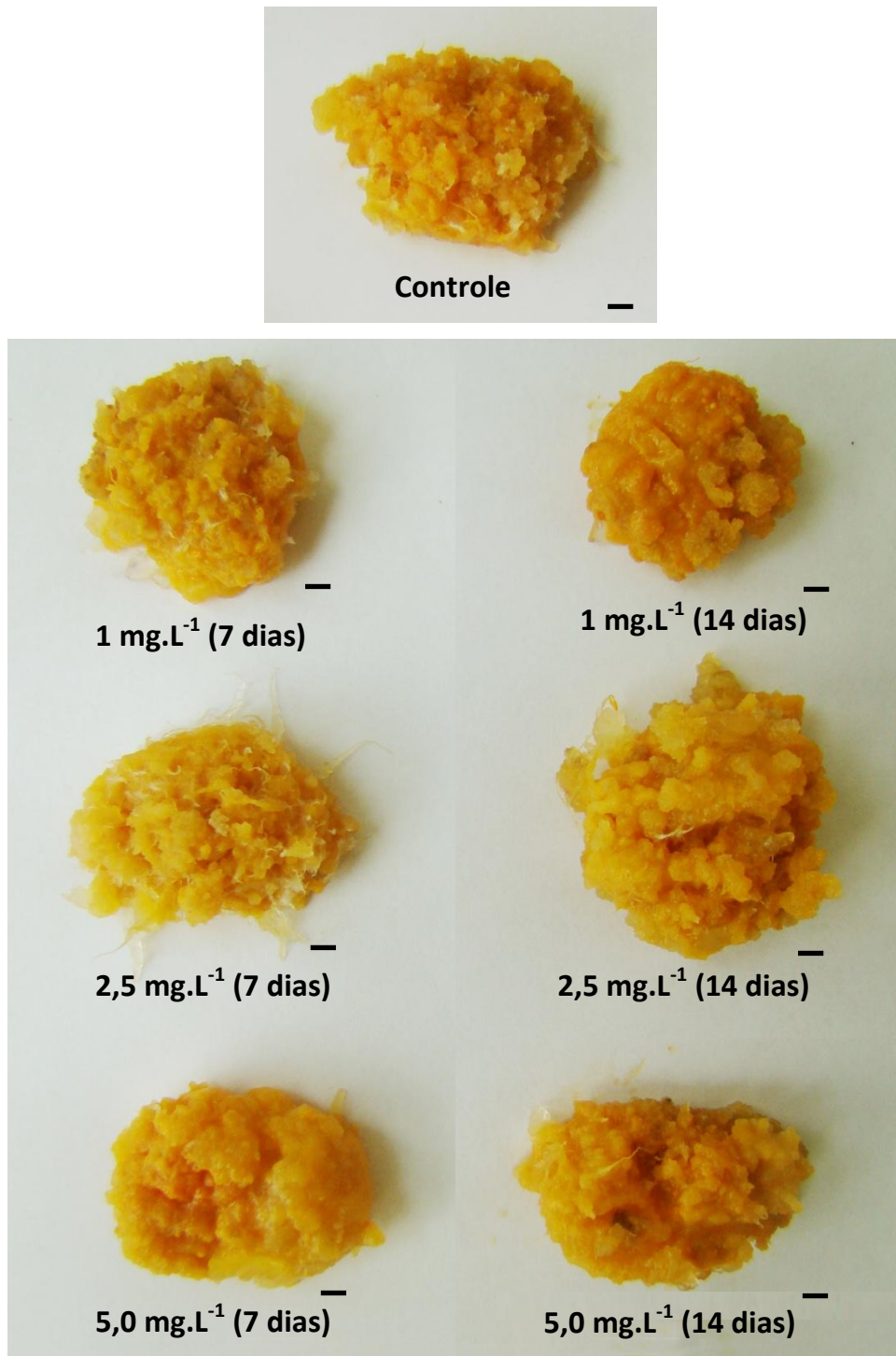


Figura 21 - Culturas de calos de *C. rosea* produzidas em meio MS + 0,20 mg.L⁻¹ de 2,4-D e expostas a diferentes concentrações de quitosana por sete ou 14 dias. Os registros fotográficos foram realizados 90 dias após a exposição ao elicitor. Barras = 1,0 cm.

O uso de extrato de levedura resultou em um aumento nos valores de CT quando comparado às culturas controle nas análises realizadas 60 dias após a elicitação (Tabela 3). A exposição dos calos por 14 dias ao extrato de levedura na concentração de 200 mg.L⁻¹ resultou na maior produção de carotenoides, embora os valores alcançados não tenham diferido estatisticamente daqueles obtidos com as culturas submetidas aos demais tratamentos. Entretanto, quando as análises foram realizadas 90 dias após a exposição ao elicitor, foi verificada uma significativa redução na produção do pigmento nas culturas elicidadas, que alcançaram valores estatisticamente semelhantes às culturas controle. Apenas as culturas elicidadas com 400 mg.L⁻¹ por 14 dias permaneceram com níveis de produção similares aos alcançados após os primeiros 60 dias. Embora o tratamento com extrato de levedura não tenha resultado em valores elevados de CT quando comparados às culturas controle, foi possível verificar que um maior tempo de exposição (14 dias) resultou em uma maior produção do pigmento. Como já verificado anteriormente nos ensaios com quitosana, a presença do extrato de levedura no meio de cultura não influenciou a produção de biomassa (Tabela 3 e Figura 22).

Tabela 3 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de calos de *C. rosea* submetidas à exposição por sete ou 14 dias a diferentes concentrações de extrato de levedura, após 60 e 90 dias do início do tratamento.

Extrato de levedura (mg.L ⁻¹)	Período em cultura					
	60 dias			90 dias		
	CT (µg. g ⁻¹)	PF (g)	PS (g)	CT (µg. g ⁻¹)	PF (g)	PS (g)
*	3,56±1,16 ^b	5,86±1,19 ^a	0,21±0,07 ^b	3,83±0,36 ^{ab}	4,83±0,82 ^a	0,27±0,05 ^a
200 (7 dias)	5,87±1,68 ^{ab}	4,65±1,11 ^a	0,20±0,05 ^b	2,25±1,66 ^b	5,99±1,09 ^a	0,35±0,05 ^a
200 (14 dias)	8,66±0,81 ^a	4,79±0,97 ^a	0,20±0,04 ^b	3,05±1,16 ^{ab}	4,68±0,78 ^a	0,29±0,04 ^a
400 (7 dias)	5,96±1,12 ^{ab}	3,88±0,63 ^a	0,19±0,03 ^b	1,73±0,62 ^b	4,86±1,13 ^a	0,26±0,05 ^a
400 (14 dias)	5,28±1,70 ^{ab}	5,62±1,06 ^a	0,38±0,09 ^a	5,70±2,10 ^a	4,71±2,66 ^a	0,29±0,15 ^a

* Calos não elicitados mantidos em meio MS + 0,2 mgL⁻¹ de 2,4-D.

Os dados representam média±desvio padrão. A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

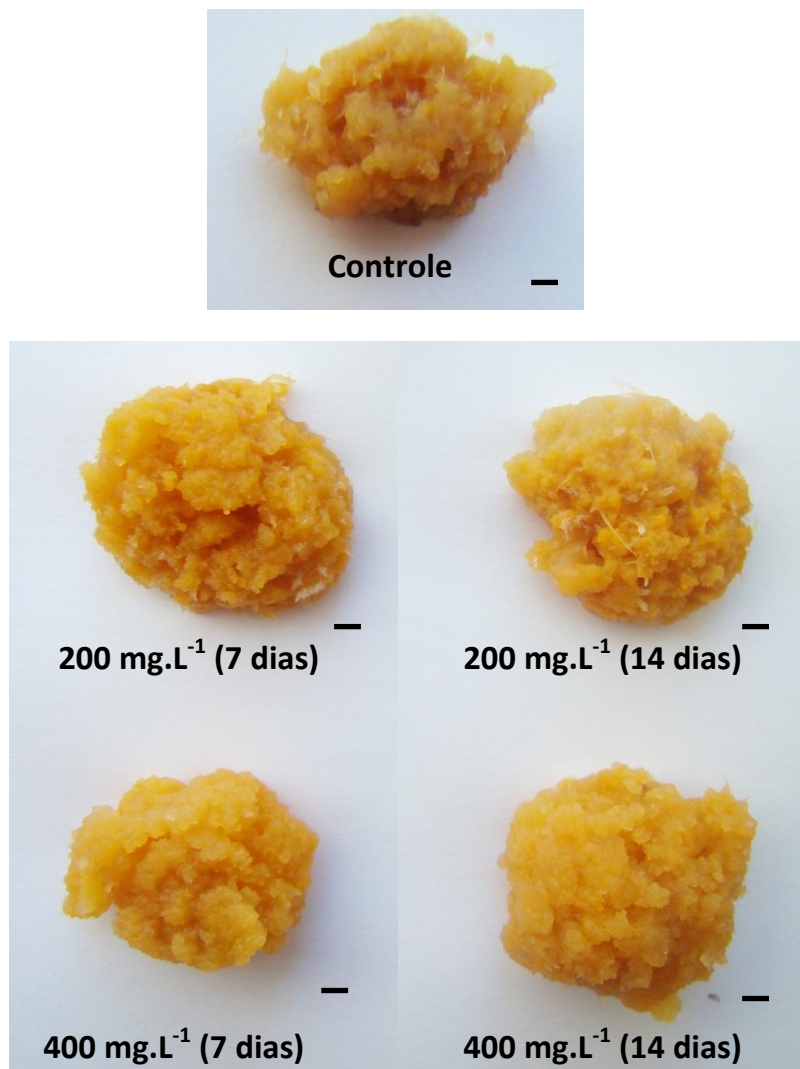


Figura 22 - Culturas de calos de *C. rosea* produzidas em meio MS + 0,20 mg.L⁻¹ de 2,4-D e expostas a diferentes concentrações de extrato de levedura por sete ou 14 dias. Os registros fotográficos foram realizados 60 dias após a exposição ao elicitor. Barras = 1,0 cm.

Os maiores valores de CT no tratamento com metil jasmonato foram alcançados após 60 dias da exposição ao elicitor (Tabela 4). Calos submetidos à elicitação com 300 μ M, independentemente do tempo de exposição ao elicitor, alcançaram os maiores valores de CT ao longo deste trabalho (13 μ g.g⁻¹), o que representou um aumento de cerca de seis vezes com relação aos valores alcançados pelas culturas controle neste mesmo período. Culturas tratadas com metil jasmonato nas concentrações de 100 e 200 μ M, por um tempo de exposição de sete dias, também alcançaram valores significativamente expressivos de CT. Assim como observado nos tratamentos com extrato de levedura e diferentemente do que havia sido observado com o uso de quitosana, a manutenção dos calos por um período de 90 dias após o

tratamento de elicitação resultou em redução da produção do pigmento. A exceção com relação a esta redução foram as culturas controle que, como verificado nos experimentos anteriores, apresentaram um aumento na produção ao longo do tempo em cultura. Entretanto, apesar da redução na produção, as culturas elicidadas com metil jasmonato ainda permaneceram com níveis de produtividade maiores do que as culturas controle. Assim, a elicitação das culturas com metil jasmonato mostrou-se o tratamento mais eficiente para a otimização da produção de carotenoides.

Como verificado nos experimentos anteriores com os outros elicitores, o tratamento com metil jasmonato, apesar de influenciar positivamente a produção de carotenoides nos calos, não acarretou em alterações no acúmulo de biomassa (Tabela 4 e Figura 23).

Calos elicitados por 7 dias com 300 μM de metil jasmonato foram submetidos à análise por CLAE. O processo de elicitação induziu ao aumento na concentração de β -caroteno (Figura 24a) quando comparado à produção deste pigmento em calos não elicitados (Figura 8c). O pico referente ao β -caroteno foi identificado pelo seu espectro de absorção na região visível que apresentou λ_{max} a 452 nm e 477 nm (Figura 24b). Embora tenham sido detectados outros picos no cromatograma obtido a partir de amostras de calos elicitados, as substâncias referentes a esses picos não apresentaram espectro de absorção característico de carotenoides. Além disso, o processo de elicitação parece ter inibido a produção dos dois outros carotenoides identificados pelos picos 1 e 2 no cromatograma obtido a partir de calos não elicitados (Figura 8c).

Tabela 4 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de calos de *C. rosea* submetidas à exposição por sete ou 14 dias a diferentes concentrações de metil jasmonato, após 60 e 90 dias do início do tratamento.

Metil jasmonato (μM)	Período em cultura					
	60 dias			90 dias		
	CT ($\mu\text{g. g}^{-1}$)	PF (g)	PS (g)	CT ($\mu\text{g. g}^{-1}$)	PF (g)	PS (g)
*	1,89 \pm 1,04 ^c	3,56 \pm 1,39 ^a	0,21 \pm 0,09 ^a	4,00 \pm 0,06 ^b	3,73 \pm 0,61 ^a	0,25 \pm 0,02 ^a
100 (7 dias)	9,09 \pm 4,82 ^{ab}	4,94 \pm 1,11 ^a	0,28 \pm 0,14 ^a	5,27 \pm 1,62 ^{ab}	3,29 \pm 1,01 ^a	0,23 \pm 0,05 ^a
100 (14 dias)	7,33 \pm 1,83 ^b	4,06 \pm 2,57 ^a	0,26 \pm 0,18 ^a	7,04 \pm 0,34 ^a	4,54 \pm 0,90 ^a	0,29 \pm 0,06 ^a
200 (7 dias)	11,49 \pm 1,54 ^{ab}	2,92 \pm 0,98 ^a	0,14 \pm 0,07 ^a	5,62 \pm 1,47 ^{ab}	3,92 \pm 0,82 ^a	0,26 \pm 0,04 ^a
200 (14 dias)	8,81 \pm 1,56 ^b	3,70 \pm 0,87 ^a	0,15 \pm 0,02 ^a	4,75 \pm 2,91 ^{ab}	4,89 \pm 0,78 ^a	0,28 \pm 0,08 ^a
300 (7 dias)	13,62 \pm 1,87 ^a	3,80 \pm 0,27 ^a	0,17 \pm 0,01 ^a	9,43 \pm 3,54 ^a	4,59 \pm 0,98 ^a	0,30 \pm 0,05 ^a
300 (14 dias)	13,59 \pm 1,34 ^a	2,16 \pm 0,29 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a	5,77 \pm 2,34 ^{ab}	4,28 \pm 1,23 ^a	0,28 \pm 0,05 ^a

* Calos não elicitados mantidos em meio MS + 0,2 mgL^{-1} de 2,4-D.

Os dados representam média \pm desvio padrão. A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

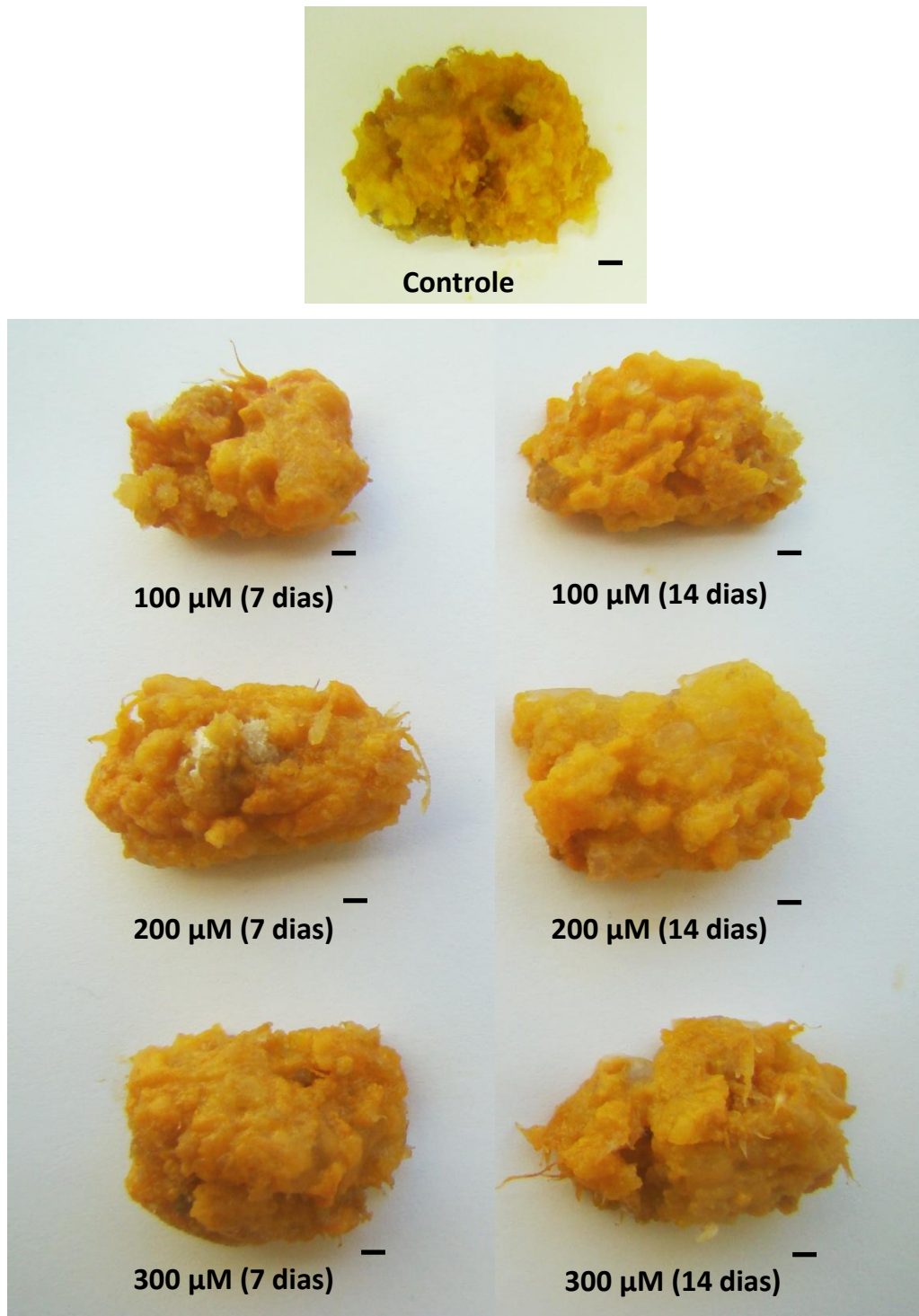


Figura 23 - Culturas de calos de *C. rosea* produzidas em meio MS + 0,20 mg.L⁻¹ de 2,4-D e expostas a diferentes concentrações de metil jasmonato por sete ou 14 dias. Os registros fotográficos foram realizados 60 dias após a exposição ao elicitor. Barras = 1,0 cm.

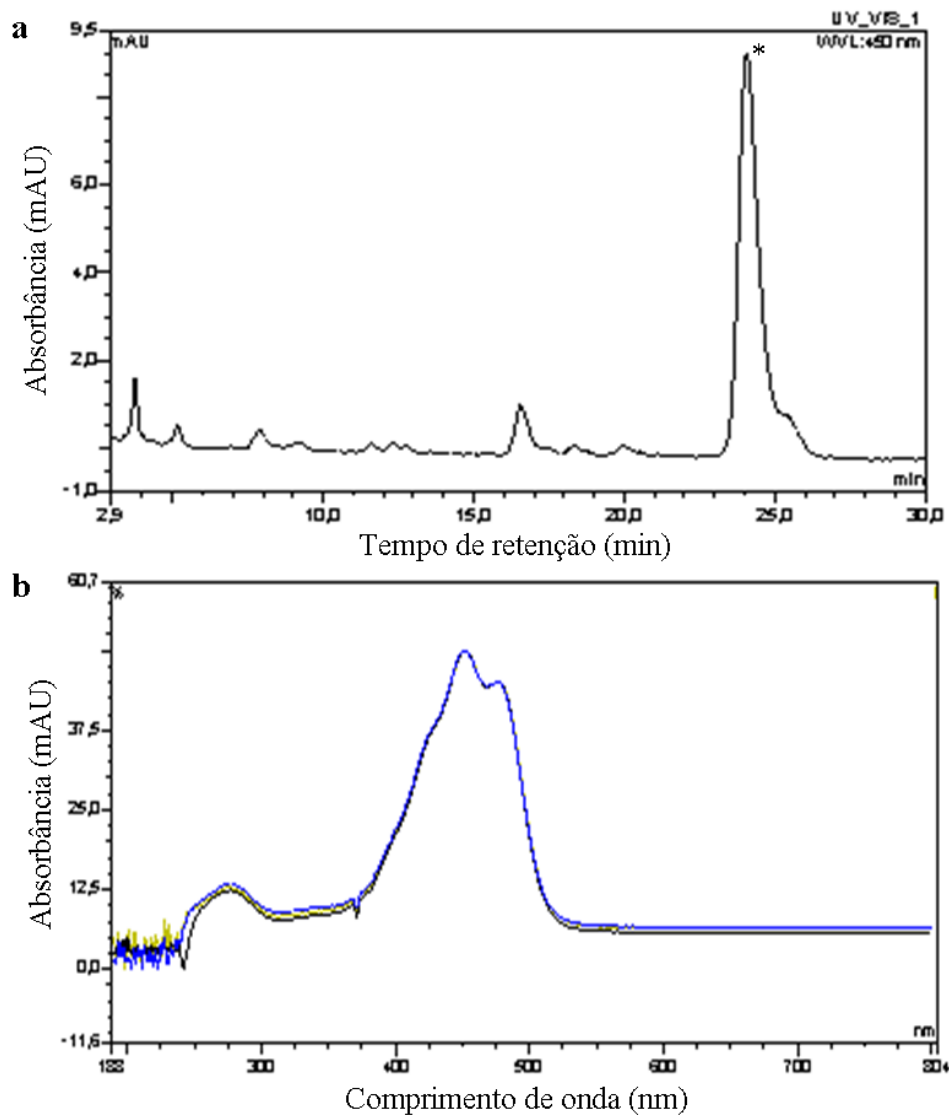


Figura 24 - Análises cromatográficas dos calos de *C. rosea* submetidos ao tratamento de elicitação com metil jasmonato (300 μ M) por 7 dias.

Legenda: (a) Cromatograma da amostra de calo após 60 dias do tratamento de elicitação, mostrando aumento do pico referente ao β -caroteno (asterisco) e seu respectivo (b) espectro de absorção no visível.

3.3 Culturas de células em suspensão

A curva de crescimento obtida das CCS (Figura 25) apresentou uma fase lag com duração de cerca de quatro dias. Esta fase caracteriza-se pelo preparo das células para a divisão celular. A partir do 4º dia as culturas apresentaram aumento da proliferação celular,

entrando na fase exponencial, considerada como a fase biossintética. As culturas permaneceram em crescimento exponencial até o 24º dia, sendo o maior crescimento observado entre o 14º e o 24º dia. Em seguida, foi verificado um período de desaceleração do crescimento, caracterizado pela gradual redução na densidade celular (24º ao 35º dia), seguido por um crescimento linear com duração até o 43º dia, quando foi encerrado o acompanhamento das culturas. Estas duas últimas etapas caracterizam a fase estacionária, onde há um maior número de células com menor capacidade de divisão celular. Após o estabelecimento da curva de crescimento, foi determinado um período de cultura de 20 dias para os experimentos com as CCS, de forma a mantê-las na fase exponencial de crescimento, proporcionando um maior acúmulo de biomassa.

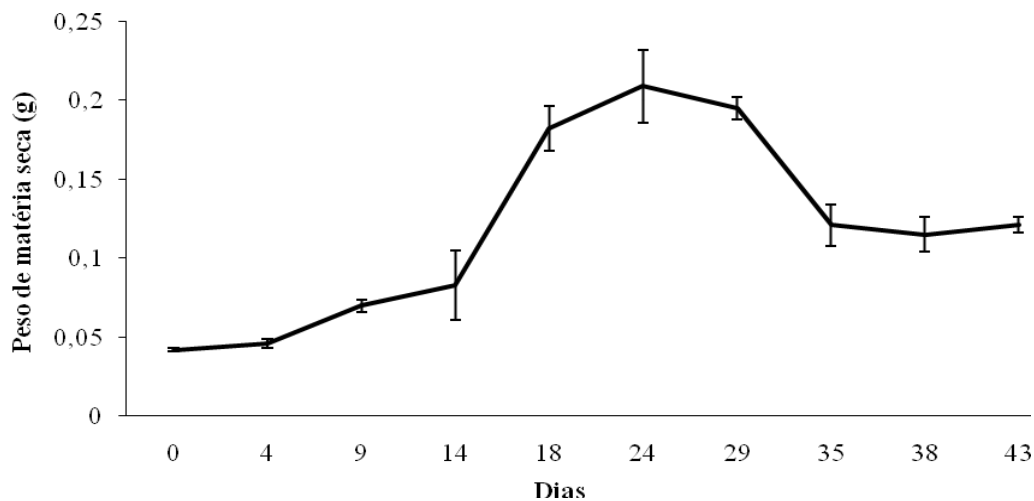


Figura 25 - Curva de crescimento das culturas de células em suspensão de *C. rosea* iniciadas a partir de calos produzidos em meio MS + 0,2 mg.L⁻¹ 2,4-D.

Culturas em suspensão foram iniciadas a partir de calos previamente submetidos ao tratamento de elicitação que resultou na maior produção de carotenoides (metil jasmonato a 300 µM por sete dias). Embora as CCS tenham alcançado valores de produção abaixo daqueles observados nas culturas de calos, foi verificado um aumento significativo no acúmulo do pigmento ao longo das subculturas. Entretanto, a produção de pigmentos não apresentou diferenças significativas quando comparada às culturas controle iniciadas com calos não elicitados (Tabela 5 e figura 26). Com relação à produção de biomassa, embora as CCS iniciadas a partir de calos elicitados tenham apresentado um aumento significativo tanto de peso de matéria fresca como de matéria seca, as CCS obtidas a partir de calos não eliciados

mostraram um maior crescimento quando considerado o acúmulo de matéria seca durante o período em cultura.

Tabela 5 - Quantificação de carotenoides totais (CT) e acúmulo de biomassa (PF e PS) alcançados por culturas de células em suspensão iniciadas a partir de calos de *C. rosea* produzidos em meio MS suplementado com 0,20 mg.L⁻¹ de 2,4-D sem ou com elicitação com metil jasmonato.

Subculturas	Calos não elicitados			Calos elicitados		
	CT (μg. g ⁻¹)	PF (g)	PS (g)	CT (μg. g ⁻¹)	PF (g)	PS (g)
1 ^a	0,87±1,20 ^b	1,77±0,26 ^b	0,11±0,04 ^b	2,76±1,19 ^b	1,33±0,37 ^b	0,09±0,02 ^b
2 ^a	2,22±1,54 ^{ab}	3,67±1,61 ^a	0,33±0,18 ^a	2,80±0,45 ^b	3,96±0,96 ^a	0,20±0,07 ^a
3 ^a	5,19±2,21 ^a	2,76±0,54 ^{ab}	0,19±0,06 ^{ab}	6,13±1,59 ^a	4,36±1,57 ^a	0,15±0,08 ^a

Os dados representam média±desvio padrão. A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%.

Os valores iniciais de biomassa para as CCS foram em média de 1,50±0,10 g (PF) e 0,12±0,06 g (PS).

Os calos elicitados foram submetidos a tratamento com metil jasmonato (300 μM) por 7 dias.

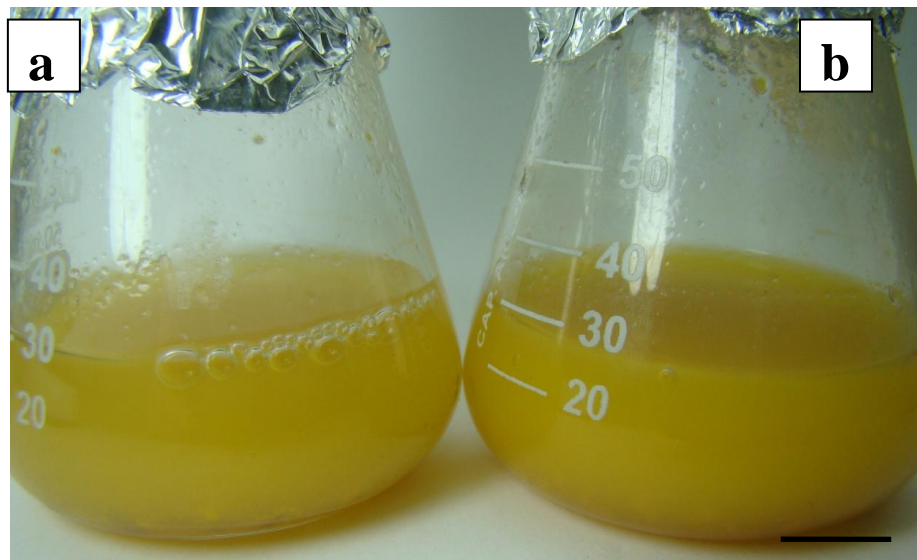


Figura 26 - Culturas de células em suspensão de *C. rosea* estabelecidas a partir (a) de calos não elicitados e (b) calos elicitados com metil jasmonato (300μM), durante a terceira subcultura. Barra = 1,0 cm.

6.4 Avaliação do potencial antioxidante e da toxicidade dos extratos

Os extratos de calos obtidos em meio MS suplementado com $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, não apresentaram atividade genotóxica nas concentrações testadas. Estes resultados podem ser observados pela presença nos géis apenas da banda relativa ao DNA íntegro (*supercoiled*) nas raias 3, 4 e 5, que correspondem aos ensaios onde foi verificado apenas o efeito dos extratos sobre a molécula de DNA (Figura 27). Além de ausência de ação genotóxica, os extratos apresentaram efeito protetor contra a ação deletéria do SnCl_2 indicando o potencial antioxidante deste material. Esta atividade é constatada pela presença de DNA íntegro nas raias 6, 7 e 8, significando a ocorrência de redução do número de quebras no molécula de DNA e, conseqüentemente uma menor quantidade de DNA na conformação de círculo aberto (*open circle*), mesmo na presença do SnCl_2 . Apenas na menor concentração testada ($5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) não foi observada a presença de banda na posição relacionada ao DNA íntegro (Figura 27, raia 6). Os extratos nas maiores concentrações ($300, 400, 500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram um nível de proteção bastante elevado, não sendo verificada a presença de quebras na molécula de DNA, mesmo na presença de um potente agente redutor como o SnCl_2 . Quando os extratos foram avaliados quanto à sua toxicidade pelo ensaio BST, foram alcançados valores de CL_{50} acima de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$, uma vez que nesta concentração foi observada a morte de uma média de apenas duas larvas em amostras de 10 indivíduos. Este resultado demonstra que as concentrações avaliadas nos ensaios de atividade antígenotóxica não apresentavam toxicidade.

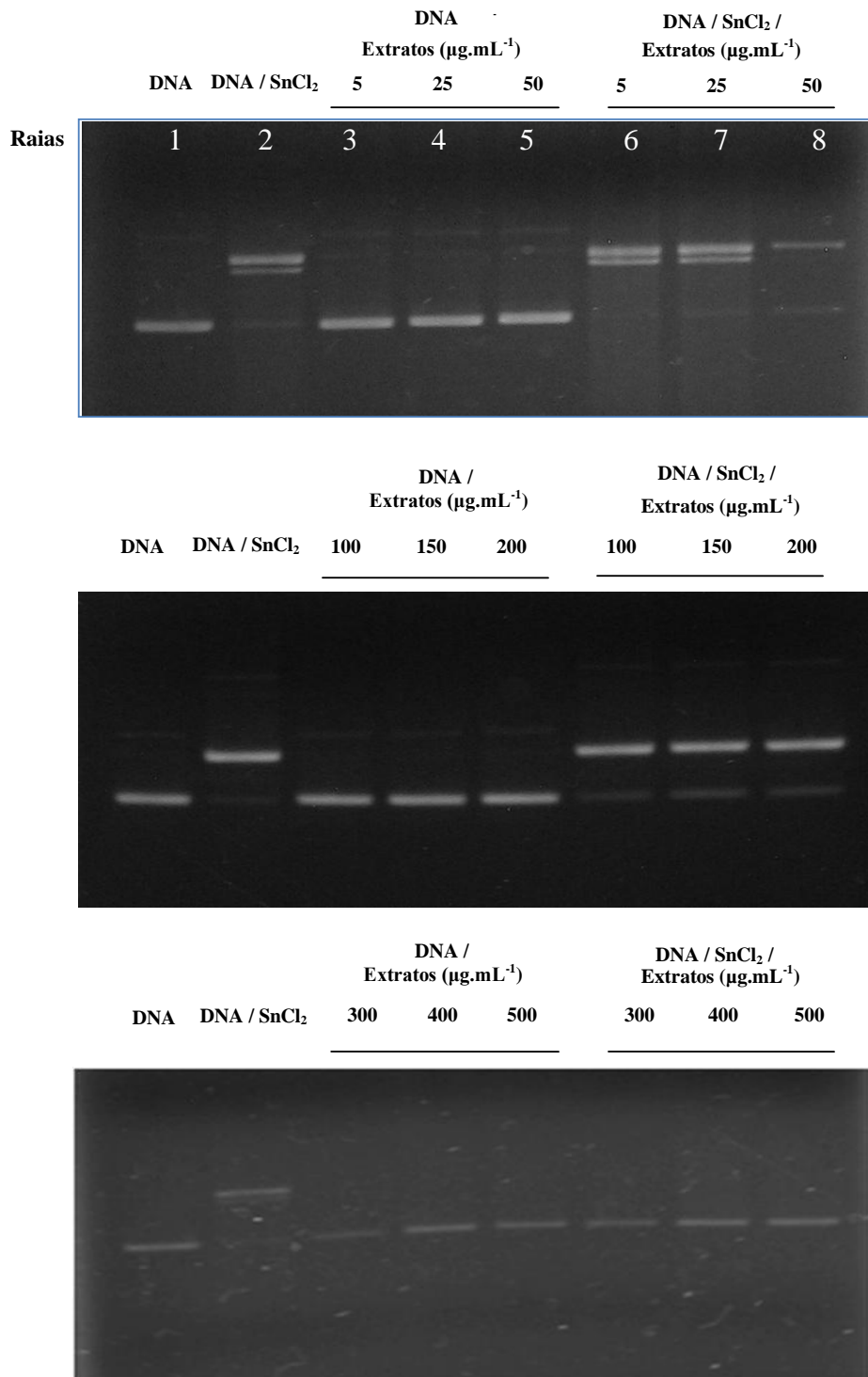


Figura 27 - Efeito sobre a molécula de DNA plasmidial, na ausência ou presença de SnCl₂, de diferentes concentrações de extratos de calos de *C. rosea* produzidos em meio MS + 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, plantas micropropagadas obtidas a partir de raízes *in vitro* de *C. rosea* (SIMÕES et al., 2009a) foram usadas como fonte de explantes para o início das culturas de calos. Estas culturas apresentaram a produção de carotenoides, fato pela primeira vez reportado para a espécie. Em estudos anteriores foi possível o estabelecimento de linhagens de calos produtores de pigmentos antociânicos (SIMÕES et al., 2009b), a partir de plantas micropropagadas obtidas de material *in vivo* (SIMÕES et al., 2004). Estes resultados demonstram que a fonte de material para o início das culturas foi um fator importante na indução de diferentes vias metabólicas para a produção de pigmentos de *C. rosea* sob condições *in vitro*. O fato de as plantas doadoras terem sido produzidas a partir de raízes pode ter influenciado a indução da via dos carotenoides. A relação entre raízes e produção de pigmentos da classe dos carotenoides também foi observada para a espécie em estudos relacionados à multiplicação de raízes *in vitro* (CORDEIRO, 2011). Nesses estudos, a produção de pigmentos carotenogênicos foi obtida em culturas de raízes estabelecidas em meio MS líquido suplementado com diferentes concentrações das auxinas AIA e AIB. Embora substâncias sinalizadoras derivadas de carotenoides desempenhem um papel importante no processo de desenvolvimento das raízes (CAZZONELLI; YIN; POGSON, 2009), estes órgãos, frequentemente, não apresentam acúmulo destes metabólitos. Entretanto, a manutenção de material sob condições *in vitro* pode levar a mudanças fisiológicas e epigenéticas relevantes, especialmente quando se trata de culturas de células indiferenciadas, como no caso dos calos.

A produção *in vitro* de pigmentos vegetais tem despertado grande interesse, visto que muitos corantes sintetizados quimicamente e usados, principalmente nas indústrias de alimentos e bebidas, podem causar efeitos danosos à saúde (DA SILVA, 2001; GHIGGI, 2007). Diversos estudos têm demonstrado a produção de diferentes pigmentos vegetais por técnicas de cultura de tecidos (FU; LU, 1999; GEORGIEV et al., 2008; MIHAI et al., 2010). Entretanto, com relação aos pigmentos da classe dos carotenoides, a produção *in vitro* ainda é obtida principalmente a partir do cultivo de micro-organismos (VALDUGA et al., 2009), o que reforça a importância dos resultados alcançados nas culturas *in vitro* de *C. rosea*.

Outro aspecto a ser avaliado na indução das diferentes linhagens de calos de *C. rosea* é o tempo de cultivo *in vitro* das plantas doadoras de explantes. As plantas utilizadas na indução dos calos carotenogênicos apresentavam um tempo em cultura mais longo, já que eram

oriundas também de material produzido *in vitro* e mantido como estoque. Tanto a linhagem de calos carotenogênicos, como a linhagem produtora de antocianinas (SIMÕES et al., 2009b) foram estabelecidas a partir de explantes caulinares mantidos nas mesmas condições físicas (luz e temperatura) e químicas (meio básico de cultura e suplementação hormonal). Desta forma, é possível que o tempo sob condições *in vitro* das plantas matrizes tenha sido um fator diferencial para a indução de substâncias a partir de vias biossintéticas bastante distintas, uma vez que os carotenoides são oriundos, principalmente da via do ácido mevalônico, enquanto que as antocianinas são sintetizadas pela via do ácido chiquímico (SANTOS, 2004).

A influência da fonte de explantes na produção de carotenoides também foi verificada em culturas de calos da espécie *C. spinosa*. Para esta espécie, apenas culturas iniciadas a partir de explantes oriundos de plantas micropropagadas apresentaram a produção de β -caroteno, em contraste com culturas iniciadas a partir de explantes de plantas germinadas *in vitro* (ALBARELLO, 2005; ALBARELLO et al., 2007).

Como a aplicação das estratégias biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários deve priorizar não só a indução da(s) substância(s) de interesse, mas também a obtenção de um alto acúmulo de biomassa, inicialmente foi avaliada a influência das condições de cultura na obtenção da massa calogênica. A manutenção das culturas na presença de luz influenciou de forma positiva o crescimento dos calos. A influência da luz sobre a indução e eficiência do processo calogênico já foi reportado em diversos estudos. Uma maior produção de massa calogênica foi alcançada por culturas de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) mantidas em meio MS suplementado com 2,4-D e na presença de luz quando comparado a culturas mantidas no escuro (CASTRO et al., 2009). Resultados similares foram alcançados em culturas de calos de *Oryza sativa* (AFRASIAB; JAFAR, 2011). Entretanto, para algumas espécies a manutenção dos calos sob luminosidade acarretou numa menor eficiência do processo calogênico (SHA VALLIKHAN; PRAKASH; RAO, 2002; NOGUEIRA et al., 2007; ALI et al., 2008; AFSHARI; ANGOSHTARI; KALANTARI, 2011). Esta inibição pode estar associada à produção de inibidores do crescimento, assim como favorecer a produção de compostos fenólicos, os quais podem interferir na atividade dos reguladores de crescimento (GEORGE, 2008). Embora para *C. rosea* a presença de luz tenha se mostrado mais eficiente para a produção de biomassa, culturas de calos de *C. spinosa*, também produzidas em meio MS suplementado com 2,4-D, não apresentaram diferenças significativas de produtividade quando mantidas no escuro ou sob luminosidade (RIBEIRO, 2004).

A suplementação do meio MS com 2,4-D se mostrou mais eficiente para a produção de calos quando foram utilizadas as menores concentrações deste fitorregulador (0,2; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹), sendo verificada uma significativa redução no crescimento na presença de 5 e 10 mg.L⁻¹. Diferentemente da resposta observada com o 2,4-D, culturas produzidas em meio suplementado com PIC, não apresentaram redução significativa na produção de biomassa em função das concentrações utilizadas. Estudos anteriores de calogênese em *C. rosea* não haviam avaliado concentrações hormonais acima de 2 mg.L⁻¹ (SIMÕES et al., 2009b; SIMÕES et al., 2010a). Esta inibição do crescimento pode estar relacionada a um efeito tóxico do 2,4-D. Redução da massa calogênica em função do aumento da concentração de 2,4-D também foi observada em culturas de *Litchi chinensis* (MESQUITA, 1999) e de *Salix humboldtiana* (SANTOS et al., 2005). Embora o 2,4-D e o PIC sejam reguladores do crescimento frequentemente utilizados para a indução de calogênese *in vitro*, estudos sobre o seu efeito herbicida mostraram que a eficiência de absorção, translocação e metabolização dessas substâncias dependem da espécie. Na erva daninha *Euphorbia esula* o 2,4-D apresentou uma eficiência de absorção e translocação cerca de duas vezes maior do que o PIC (LYM; MOXNESS, 1989). Resultados opostos foram observados para a espécie *Populus tremula* (ELIASSQN, 1972).

A partir dos ensaios utilizando o meio MS foram estabelecidas as condições de manutenção das culturas sob luz, e a suplementação com 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D como as mais eficientes para a produção de massa calogênica. Como observado nos demais tratamentos com 2,4-D, assim como também na presença de PIC, calos estabelecidos nessas condições apresentavam a produção de carotenoides em sua superfície ao longo do tempo em cultura. Entretanto, diferentemente das culturas de calos antociânicos, onde foi alcançada a associação de altas taxas de crescimento conjuntamente com a produção dos pigmentos (SIMÕES et al., 2009b), para as culturas de calos carotenogênicos, o acúmulo de biomassa não foi tão expressivo, e uma redução na taxa de crescimento foi constatada a medida que a produção do pigmento tornava-se mais evidente. A ocorrência de redução na proliferação celular quando se inicia a produção de metabólitos é uma situação constatada em muitas culturas *in vitro* (LUCZKIEWCZ; CISOWSKI, 2001; ANGELOVA et al. 2001; MARSHAL et al., 2002; FRANÇA, 2004). Esta alternância entre os dois processos ocorre em função da estreita relação existente entre os metabolismos primário e secundário. Muitos precursores do metabolismo secundário, além de serem sintetizados a partir do metabolismo primário, também fazem parte de reações relacionadas à síntese de constituintes celulares, ou seja, desempenham um papel importante no próprio metabolismo primário. Esse fato gera uma

competição por esses precursores entre os processos de crescimento e síntese de metabólitos (HAGENDOORN; VAN DER PLAS; SEGERS, 1994; VAN DER PLAS; EIJKELBOOM; HAGENDOORN, 1995; COLLIN, 2001).

Visando verificar a influência de diferentes meios básicos no processo de calogênese, foram testados os meios B5 (GAMBORG; MILER; OJIMAK, 1968), Nitsch (NITSCH; NITSCH, 1969) e White (WHITE, 1934) no estabelecimento das culturas, suplementados com as mesmas concentrações de 2,4-D avaliadas para o meio MS e sendo mantida a condição de luminosidade. Estudos sobre a indução da calogênese com espécies do gênero *Cleome* só haviam sido realizados utilizando-se o meio MS (NASSEM; JHA, 1994; NASEEM; JHA, 1997; RIBEIRO, 2004; SONGSAK; LOCKWOOD, 2004; ALBARELLO, 2005; ALBARELLO et al., 2007, SIMÕES et al., 2009b). Os calos de *C. rosea* produzidos nos meios B5 e Nitsch, embora tenham alcançado boas taxas de crescimento, apresentaram características organogênicas, o que não foi observado nas culturas mantidas em meio MS. Calos mantidos em meio B5 desenvolveram raízes quando cultivados nas menores concentrações hormonais. Estes calos apresentaram a produção de pigmento por toda a sua superfície e também em algumas raízes. Embora calos friáveis não organogênicos sejam requeridos quando se objetiva o estabelecimento de culturas de células em suspensão, a presença de certo grau de diferenciação nas culturas de calos tem mostrado ser um fator favorável à produção de alguns metabólitos secundários (BAIS; SUDHA; RAVISHANKAR, 1999; ZHAO et al., 2001). As culturas estabelecidas em meio de White atingiram os menores valores de massa calogênica. Esse menor crescimento, provavelmente, está relacionado à fraca composição salínica do meio de White. Este meio, originalmente estabelecido para culturas líquidas, apresenta baixos níveis de nutrientes como o nitrogênio e o potássio (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995).

Uma maior relação entre o desenvolvimento da massa calogênica e a produção de pigmento foi alcançada por culturas mantidas em meio MS suplementado com 2,4-D. Embora a produção de carotenoides pelas técnicas de cultura de tecidos vegetais ainda seja pouco explorada, os estudos já estabelecidos mostram a indução de pigmentos deste grupo em culturas mantidas em meio com 2,4-D, como no caso de culturas de células em suspensão de *Vaccinium ashei* (NAWA et al., 1993) e culturas de calos e células em suspensão de *Barringtonia racemosa* (BEHBAHANI; SHANEHSAZZADEH; HESSAMI, 2011). A indução de carotenoides *in vitro* também tem sido alcançada pela suplementação do meio de cultura com 2-(4chlorophenyl-thio) triethylamine (CPTA), como no caso da produção de

licopeno em culturas de células em suspensão de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (FOSKET; RADIN, 1983; RHODES, SPENCER; HAMILL, 1991).

Diferentemente dos resultados observados com *C. rosea*, para culturas de calos de *C. spinosa*, a suplementação do meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de PIC resultou em uma maior produção de β -caroteno (ALBARELLO, 2005). Porém, assim como verificado em *C. rosea*, nas culturas de *C. spinosa*, a luz mostrou ser um fator essencial para a indução do pigmento, não sendo verificada sua produção nas culturas mantidas no escuro. A luz também foi um importante fator para a indução de licopeno em culturas de calos e células em suspensão de *Barringtonia racemosa* (BEHBAHANI; SHANEHSAZZADEH; HESSAMI, 2011). Embora a maior parte dos genes envolvidos na via biossintética dos diferentes carotenoides já tenha sido identificada, alguns dos processos relacionados à biossíntese desses pigmentos ainda não foram elucidados. Entretanto, sabe-se que a luz tem uma grande influência na mediação da regulação da biossíntese dos carotenoides, influenciando a expressão gênica (BRAMLEY, 2002; SIMKIN et al., 2003; PIZARRO; STANGE, 2009).

Embora a luz seja um pré-requisito para a produção de um grande número de metabólitos secundários sob condições *in vitro* (KIERAN; MACLOUGHLIN; MALNE, 1997), com relação à produção de pigmentos vegetais, nem sempre a condição de luminosidade é necessária. Grande parte dos trabalhos referentes à produção de antocianinas em culturas de calos e de células em suspensão comprova que o cultivo na presença de luz é uma condição importante (ZHONG; YOSHIDA, 1995; BLANDO *et al.*, 2005; PASQUA et al., 2005; SIMÕES et al., 2009b). No entanto, o estabelecimento de linhagens antociânicas no escuro já foi alcançado para algumas espécies (KONCZAC-ISLAM et al., 2000; NAKAMURA et al., 1999). Na maior parte dos sistemas estabelecidos *in vitro* para a produção de betalainas embora a luz não tenha se mostrado um fator essencial, sua presença resultou no aumento da síntese destes pigmentos (YEOMAN; YEOMAN, 1996).

Uma vez estabelecidas as melhores condições para o crescimento da massa calogênica associada à síntese de carotenoides, foram aplicadas estratégias para otimizar a produção *in vitro* de pigmentos. O processo de elicitação foi utilizado pela primeira vez para a espécie e mostrou-se eficiente para a otimização da produção dessas substâncias. Independentemente do tipo de elicitor empregado, foi verificada alteração nos níveis de produção de carotenoides totais. Assim como um mesmo elicitor pode estimular o metabolismo secundário em diferentes culturas, certas culturas são responsivas a diferentes elicitores. Estudos têm mostrado que, de um modo geral, os metabólitos induzidos pelo processo de elicitação são

específicos das culturas submetidas ao tratamento e não dependentes do tipo de elicitor empregado (NAMDEO, 2007; VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

O uso de metil jasmonato e de quitosana resultou em um significativo aumento da produção de carotenoides. A maior produção foi alcançada após a elicitação com metil jasmonato na concentração de 300 μM , que resultou em um aumento de cerca de seis vezes na concentração de carotenoides totais quando comparado às culturas controle. Calos submetidos a este tratamento apresentaram um significativo aumento na concentração de β -caroteno. O ácido jasmônico e seu metil éster, o metil jasmonato, são coletivamente chamados de jasmonatos. São sintetizados a partir do ácido linolênico e têm papel importante como transdutores na sinalização de defesa das plantas, estando relacionados à indução de diferentes vias biossintéticas de metabólitos secundários, incluindo os terpenoides (MEMELINK; VERPOORTE; KIJNE, 2001). Diversos estudos têm mostrado o aumento de substâncias terpenoídicas pela elicitação com o metil jasmonato (SINGH et al., 1998; KEINANEN; OLDHAM; BALDWIN, 2001; MARTIN et al., 2002; KIM et al., 2006; FRANKFATER; DOWD; TRIPLETT, 2009; EXPOSITO et al., 2010).

A resposta ao tratamento com quitosana também foi satisfatória, sendo alcançada uma maior produção em culturas elicidadas com 5 mg.L^{-1} , que apresentaram um aumento de cerca de três vezes nos valores de carotenoides totais quando comparado às culturas controle. A quitosana é um polissacarídeo natural extraída do exoesqueleto de crustáceos e também encontrada na parede de micélio de muitos fungos. Ela apresenta efeito na interação planta-patógeno, sendo reconhecida pelas plantas como indicador da presença de fungos patogênicos, levando à ativação de diferentes sistemas de defesa (LINDEN; PHISALAPHONG, 2000; MAIA et al., 2010). A elicitação com quitosana foi efetiva em aumentar a produção de substâncias terpenoídicas em culturas de células de diferentes espécies (CHANG et al., 1998; ZHANG et al., 2007; FAN et al., 2010).

A elicitação com extrato de levedura resultou na resposta menos expressiva de otimização da produção de pigmentos. O extrato de levedura é constituído de uma variedade de substâncias, além de aminoácidos, vitaminas e minerais (ERTOLA; HOURS, 1998). Embora seja um elicitor biótico, alguns autores sugerem que seu efeito possa ser atribuído a íons metálicos como zinco, cobalto e cálcio presentes em sua composição e que, na verdade, atuariam como elicitores abióticos (PITTA-ALVAREZ; SPOLLANSKY ; GIULIETTI, 2000; KARWASARA et al., 2005).

Para *C. rosea*, o tempo de exposição aos elicitores não exerceu influência significativa na produção de carotenoides, com exceção da elicitação com quitosana na maior concentração

(5 mg.L⁻¹). Embora no presente trabalho o tempo de exposição não tenha resultado em diferenças significativas na produção do metabólito, este fator tem se mostrado importante para a resposta de elicitação em muitos estudos, e assim como a concentração dos elicitores, deve ser estabelecido empiricamente para cada espécie. Em geral, o tempo necessário para um máximo acúmulo do metabólito é característico de cada espécie vegetal e normalmente é precedido por um aumento nas atividades enzimáticas envolvidas na via biossintética do metabólito alvo (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

A cinética de indução dos carotenoides e a manutenção dos níveis de produção variaram em função do elicitor. A maior produção foi alcançada por culturas expostas ao metil jasmonato e ao extrato de levedura após 60 dias da elicitação. Entretanto, após 90 dias do tratamento os valores foram reduzidos. Culturas expostas à quitosana apresentaram uma resposta distinta, com uma maior produção sendo alcançada 90 dias após a elicitação. Em plantas de *Ocimum basilicum*, a elicitação com metil jasmonato resultou em uma produção mais expressiva de substâncias terpenoídicas quando comparado ao tratamento com quitosana, porém após um maior período de tempo (DESCHAMPS; SIMON, 2006). Segundo Vasconsuelo & Boland (2007), embora a(s) classe(s) de metabólito(s) induzida(s) pelo processo de elicitação esteja estreitamente relacionada à espécie vegetal, a cinética de indução e o acúmulo do metabólito são dependentes do tipo de elicitor utilizado.

Independentemente do tipo e concentração do elicitor, assim como do tempo de exposição, não houve alteração no desenvolvimento da massa calogênica quando comparado às culturas controle. Entretanto, estudos mostram que o tratamento com elicitores, além de influenciar na indução de metabólitos, pode levar a alterações significativas na taxa de crescimento. Culturas de calos de *Taxus x media* var. *Hatfieldii*, apresentaram uma significativa redução no crescimento após elicitação com metil jasmonato (FURMANOWA et al., 1997). Resposta semelhante foi observada em culturas de raízes transformadas de algodão (FRANKFATER; DOWD; TRIPLETT, 2009). Por outro lado, Walker e colaboradores (2002) verificaram um significativo aumento na biomassa de culturas em suspensão de *Hypericum perforatum* após elicitação com ácido jasmônico. Da mesma forma, a elicitação de culturas de *Solanum tuberosum* var. *Chieftain* com o elemento químico cério promoveu um maior acúmulo de biomassa (LU; YANG; ZOU, 2006). Entretanto, como verificado em *C. rosea*, a elicitação com metil jasmonato e com extrato de levedura não influenciou de forma significativa o crescimento de culturas de *Panax ginseng* (LU; WONG; TENG, 2001).

As culturas de células em suspensão de *C. rosea* estabelecidas tanto a partir de calos não elicitados, como aquelas iniciadas com calos elicitados, apresentaram uma menor

produção de pigmentos quando comparado às culturas de calos. Além disso, também não alcançaram um nível de acúmulo de biomassa compatível com os resultados observados com culturas estabelecidas a partir de calos produtores de antocianinas (SIMÕES-GURGEL et al., 2011). As culturas de células em suspensão são consideradas sistemas mais homogêneos e eficientes para a produção de metabólitos secundários quando comparadas às culturas de calos. Esta maior eficiência está relacionada ao uso de meio líquido, que reduz a formação de gradientes físicos e químicos (SAITO; MIZUKAMI, 2002), além da possibilidade de eliminação dos metabólitos no meio de cultura, o que otimiza o processo de obtenção destes produtos, uma vez que não há a necessidade de extração a partir das células (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008). Com base na potencialidade já observada anteriormente para a espécie no que se refere à produção *in vitro* de pigmentos vegetais (SIMÕES et al., 2009b; SIMÕES-GURGEL et al., 2011), pode-se concluir que, no presente estudo, embora as culturas em suspensão tenham apresentado a manutenção da produção de carotenoides ao longo das subculturas, novos protocolos devem ser testados visando à obtenção de uma maior eficiência tanto com relação à produção do metabólito, como ao acúmulo de biomassa.

Para a avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de calos foi selecionado o modelo de quebras na molécula de DNA causadas pelo cloreto estanoso (SnCl_2) que indica indiretamente essa atividade. Vários estudos têm demonstrado a capacidade do SnCl_2 em provocar quebras na molécula de DNA mediadas pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CALDEIRA-DE-ARAÚJO et al., 1996; FELZENSZWALB et al., 1998; MATTOS, 2000). A ação de substâncias que apresentem atividade antioxidante pode ocorrer impedindo a formação das ERO ou captando tais moléculas (Mattos *et al.*, 2000). Este modelo tem sido aplicado na avaliação do potencial antioxidante de extratos e metabólitos vegetais (REINIGER et al., 1999; DANTAS et al., 1999; BERNARDO et al., 2002; PAES-LEME et al., 2005; BISO et al., 2010).

Os resultados da avaliação antioxidante dos extratos dos calos carotenogênicos foram promissores, mostrando uma eficiente proteção à molécula de DNA, especialmente nas maiores concentrações testadas. Extratos metanólicos de plantas de campo e aclimatizadas de *C. rosea* também foram eficazes em proteger a molécula de DNA da ação oxidante do SnCl_2 (SIMÕES et al., 2006). Entretanto, extratos metanólicos obtidos a partir de calos não produtores de pigmentos, quando avaliados pelo mesmo modelo experimental, não

apresentaram potencial antioxidante (C. SIMÕES, comunicação pessoal)¹. Assim como verificado para os extratos de *C. rosea*, extratos de calos de *C. spinosa*, produtores de β -caroteno, também foram capazes de proteger a molécula de DNA da ação deletéria do SnCl_2 (ALBARELLO, 2005). Contudo, diferentemente dos resultados alcançados em *C. rosea*, onde foi verificada uma maior proteção nas maiores concentrações (300 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), para *C. spinosa* o maior potencial antioxidante foi obtido com concentrações até 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Além da avaliação da capacidade antioxidante, o modelo utilizado também permitiu que fosse determinado o potencial efeito genotóxico dos extratos. Quando os extratos foram incubados isoladamente com o DNA sem a presença de SnCl_2 , não foram verificadas quebras na molécula em todas as concentrações testadas, indicando que esses extratos não apresentam potencial genotóxico. Estes resultados são bem relevantes, principalmente quando comparado aos estudos anteriores, quando foi verificado que extratos de plantas de campo e aclimatizadas de *C. rosea* induziram algumas quebras na molécula de DNA (SIMÕES et al., 2006). Similar ao observado para *C. rosea*, extratos de calos de *C. spinosa* também não apresentaram genotoxicidade (ALBARELLO, 2005).

Em relação à avaliação da toxicidade dos extratos pelo bioensaio BST foram obtidos valores de CL_{50} acima de 3,0 mg.mL^{-1} . O BST, que utiliza a concentração letal média como parâmetro para a avaliação da toxicidade de produtos biológicos, é um modelo experimental de baixo custo, rápido e de fácil manutenção (MEYER et al., 1982) e tem sido bastante empregado em estudos com extratos vegetais (HERRERA-MATA; ROSAS-ROMERO; CRESCENTE, 2002; OGUNNUSI; DOSUMU, 2008; LACHUMY et al., 2010; TAVIANO et al., 2011). De acordo com Dolabela (1997), extratos vegetais que apresentam $\text{CL}_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados pouco tóxicos ou não tóxicos; entre 250 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são moderadamente tóxicos e com $\text{CL}_{50} < 80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados altamente tóxicos. Deste modo, os valores alcançados pelos extratos de calos de *C. rosea* indicam que este material não apresenta toxicidade, e que as concentrações empregadas na avaliação da atividade antioxidante estavam bem abaixo da concentração letal média.

Do exposto, podemos concluir que os resultados alcançados neste trabalho demonstram a eficiência do estabelecimento de uma nova linhagem de células produtoras de pigmentos para a espécie *C. rosea* e que o material produzido sob condições *in vitro* apresenta potencialidade para ser explorado economicamente.

¹ Claudia Simões - Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Departamento de Biologia Vegetal - 2011.

5 CONCLUSÕES

- O estabelecimento das culturas de calos em meio MS resultou na maior produção de calos friáveis e não organogênicos;
- A auxina mais eficiente para a produção de biomassa e produção de carotenoides foi o 2,4-D na concentração de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$;
- A luz foi um fator importante para o crescimento dos calos e essencial para a indução da produção de pigmentos nas culturas;
- O uso de metil jasmonato ($300\mu\text{M}$), independentemente do tempo de exposição nas condições testadas (7 e 14 dias), foi definido como melhor tratamento para a otimização da produção de carotenoides nas culturas de calos;
- A elicitação com metil jasmonato induziu ao aumento na concentração de β -caroteno nas culturas de calos;
- As condições utilizadas para o estabelecimento das culturas de células em suspensão não se mostraram ideais para o aumento significativo de biomassa, necessitando serem otimizadas;
- A utilização de calos elicitados para o início das culturas de células em suspensão não influenciou a produção de pigmentos;
- Os métodos propostos mostraram-se adequados à produção *in vitro* de carotenoides, com destaque para o β -caroteno, com atividade antígeno-tóxica, potencial antioxidante e baixa toxicidade.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M.S.; ALQASOUMI, S.I.; AL-TAWEEL, A.M. Hepatoprotective constituents from *Cleome droserifolia*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 6, p. 620-624, 2009.
- AERTS, R.J.; GISI, D.; DECAROLIS, E.; DELUCA, V.; BAUMANN, T.W. Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. **Plant Journal**, v. 5, p. 635–643, 1994.
- AFRASIAB, H.; JAFAR, R. Effect of different media and solidifying agents on callogenesis and plant regeneration from different explants of rice (*Oryza sativa L*) varieties super basmati and irri-6. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 1, p. 487-501, 2011.
- AFSHARI, R.T.; ANGOSHTARI, R.; KALANTARI, S. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus L.*) genotypes. **Plant Omics Journal**, v. 4, n. 2, p. 60-67, 2011.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AHMAD, V.U.; ALVI, K.A. Deacetoxybrachycarpone, a trinortriterpenoid from *Cleome brachycarpa*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 1, p. 315-316, 1987.
- AHMAD, V.U.; QAZI, S.; ZIA, N.B.; XU, C.; CLARDY, J. Cleocarpone, a triterpenoid from *Cleome brachycarpa*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 670-672, 1990.
- AHMED, Z.F.; RISZK, A.M.; HAMMOUDA, F.M.; SEIF EL-NASR, M.M. Naturally occurring glucosinolates with special reference to those of family Capparidaceae. **Planta Medica**, v. 21, n. 2, p. 35-60, 1972.
- AIJAZ, A.; JAIN, S.; HARIHARAN, A.G. Effect of elicitation on the production of phyto-constituents through plant tissue culture technique – A review. **International Journal of Drug Discovery and Herbal Research**, v. 1, n. 2, p. 84-90, 2011.
- AKASH, T.; ISHIZAK, M.; AYABE, S. Isoflavonoid production by adventitious-root cultures of *Iris germanica* (Iridaceae). **Plant Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 207-215, 2005.
- ALBARELLO, N. *Aplicação de métodos biotecnológicos para estudos fitoquímicos e farmacológicos de Cleome spinosa Jacq.(Capparaceae)*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia, UERJ, Rio de Janeiro, 2005.
- ALBARELLO, N.; RIBEIRO, I.G.; SIMÕES, C.; CASTRO, T.C.; GIANFALDONI, M.; CALLADO, C.H.; KUSTER, R.M.; COELHO, M.G.P.; MANSUR, E. Histological analysis of calluses from *in vitro* propagated plants of *Cleome spinosa* Jacq. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 5, n. 2, p. 699-701, 2007.

ALBARELLO, N.; SIMÕES, C.; ROSAS, P.F.G.; CASTRO, T.C.; GIANFALDONI, M.G.; CALLADO, C.H.; MANSUR, E. *In vitro* propagation of *Cleome spinosa* (Capparaceae) using explants from nursery-grown seedlings and axenic plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 42, p. 601-606, 2006.

ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F.A.; IQBAL, J. Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum*) through callogenesis and organogenesis. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 123-138, 2008.

ALMAGBOUL, A.Z.; FAROUK, A.; BASHIR, A.K.; KARIM, A.; SALIH, M. Antimicrobial activity of certain sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity - Part II. **Fitoterapia**, v. 56, n. 2, p. 103-109, 1985.

AMARA, A.A.; EI-MASRY, M.H.; HOGDADY, H.H. Plant crude extracts could be the solution: extracts showing *in vivo* antitumorigenic activity. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 159-171, 2008.

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

ANGELOVA, Y.; PETKOVA, S.; ZOZIKOVA, E.; KOTSEVA, E.; ILIEV, L. Effects of kinetin and 4pu-30 on the growth and the content of polyphenols in tobacco callus tissue. **Bulgarin Journal of Plant Physiology**, v.27, n.1-2, p.36-42, 2001.

AZEVEDO, H.M.C.; ABREU, F.A.P.; SOUSA, L.L.; SOUZA, A.C.R.; BRITO, E.S. Avaliação do impacto de pré-tatamentos sobre a extração de carotenóides por prensagem seqüencial de bagaço de caju. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v.24, n.2, p.397-404, jul/dez. 2006.

BAIS H. P.; SUDHA G.; RAVISHANKAR G.A. Putrescine influences growth and production of coumarines in hairy root cultures of *Cichorium intybus*, L. cv. Lucknow local (Witloof Chicory). **Journal of Plant Growth Regulator**, v. 18, p. 59-165, 1999.

BALA, A.; KAR, B.; HALDAR, P.K.; MAZUMDER, U.K.; BERA, S. Evaluation of anticancer activity of *Cleome gynandra* on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 1, p. 131-134, 2010.

BEHBAHANI, M.; SHANEHSAZZADEH, M.; HESSAMI, M.J. Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 1, p. 69-76, 2011.

BERNARDO, L.C.; OLIVEIRA, M.B.N.; SILVA, C.R.; DANTAS, F.J.S.; MATTOS, J.C.P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; SOARES DE MOURA, R.; BERNARDO-FILHO, M. Biological effects of rutin on the survival of *Escherichia coli* AB1157 and on the electrophoretic mobility of plasmid PUC 9.1 DNA. **Cellular and Molecular Biology**, v.48, p.517-520, 2002.

BISO, F.I.; RODRIGUES, C.M.; RINALDO, D.; REIS, M.B.; BERNARDI, C.C.; MATTOS, J.C.P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; VILEGAS, W.; CÓLUS, I.M.S.; VARANDA, E.A. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). **Mutation Research**, v. 72, p. 92-99, 2010.

- BLANDO, F.; SCARDINO, A.P.; DE BELLIS, L.; NICOLETTI, I.; GIOVINAZZO, G. Characterization of *in vitro* anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. **Food Research International**, v. 38, p. 937-942, 2005.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.
- BOURICHE, H.; MILES, E.A.; SELLOUM, L.; CALDER, P.C. Effect of *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 72, p. 195-201. 2005.
- BOURICHE, H.; SELLOUM, L.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C. Effect of *Cleome arabica* leaf extract in rat paw edema and human neutrophil migration. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 10-15, 2003.
- BRAMLEY, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2107-2113, 2002.
- BRODELIUS, P.; DEUS, B.; MOSBACH, K.; ZENK, M.H. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. **FEBS Letters**, v. 103, n.1, p. 93-97, 1979.
- BULHÕES, G.C.C.; SILVA, A.M.; SÁ, M.A.M. Abordagem fitoquímica de plantas do nordeste brasileiro. Parte II. **Anais do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 5, p. 39-44, 1976.
- BURKE, B.A.; WILFRED, R.C.; HANKAN, V.A. The structure of cleomeolide, an unusual bicyclic diterpene from *Cleome viscosa* L. (Capparaceae). **Tetrahedron**, v. 36, p. 3489-3493, 1980.
- CABRAL, S.C.M.; AGRA, M.F. Etnomedicina e farmacobotânica das Capparaceae da caatinga paraibana, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1/2, p. 2-6, 1998.
- CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; DANTAS, F.J.S.; MORAES, M.O.; FELZENSZWALB, I.; BERNARDO-FILHO, M. Stannous chloride participates in the generation of reactive oxygen species. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 48, p. 109-113, 1996.
- CAMPOS, F.M.; PINHEIRO-SANT'ANA, M.H.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J.B.P. Teores de beta-caroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa-MG. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n.2, p. 163-169, 2003.
- CARVALHO, H.A.L. **Capparaceae Juss. na restinga de Maricá, RJ - Estudo sobre a biologia da reprodução de *Capparis lineata* Domb. ex Pers., *C. flexuosa* (L) L. e *Cleome rosea* Vahl. ex DC.** 2002. Tese de Doutorado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- CASTRO, A.H.F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; VITOR, S.M.M. Callogenesis and contents of total phenols and tannins in barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 33, n. 2 , p. 385-390, 2009.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2ed. Visconde do Rio Branco [s.n.]: Viçosa, 2004.

CAZZONELLI, C.I., YIN, K., POGSON, B.J. Potential implications for epigenetic regulation of carotenoid biosynthesis during root and shoot development. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n.4, p. 339-341, 2009.

CHANG, J.H.; SHIN, J.H.; CHUNG, I.S.; LEE, H.J. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 12, p. 1097-1099, 1998.

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

CHO, HAWA-YOUNG et al. Differential Induction of Protein Expression and Benzophenanthridine Alkaloid Accumulation in *Eschscholtzia californica* Suspension Cultures by Methyl Jasmonate and Yeast Extract. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 255-262, 2008.

CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. **Glossary of Indian medical plants**. Concil of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India, 1956.

COLLIN, H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 119-134, 2001.

CORDEIRO, L.S. **Produção in vitro e criopreservação de raízes de *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2011.

COSTA E SILVA, M.B. **O gênero *Cleome* L. (Capparaceae Juss.) no Brasil**. 2000. Tese de Doutorado, UFRPE, Recife.

COSTA, N.M.B. Biotecnologia aplicada ao valor nutricional dos alimentos. **Biociência e Desenvolvimento**, n.32, p. 47-54, 2004.

DA SILVA, A.G. **Extração e estabilidade dos carotenoides totais obtidos de tomate processado (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

DANTAS, F.J.S.; MORAES, M. O.; MATTOS, J.C.P.; BEZERRA, R.J.A.C.; CARVALHO, E.F.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. **Toxicology Letters**, v.110, p.129-136, 1999.

DAS, P.C.; PATRA, A.; MANDAL, S.; MALLICK, B.; DAS, A.; CHATTERJEE, A. Cleogynol, a novel dammarane triterpenoid from *Cleome gynandra*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 616-618, 1999.

- DESCHAMPS, C.; SIMON, J.E. Terpenoids essential oil metabolism in basil (*Ocimum basilicum* L) following elicitation. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 6, p. 618-621, 2006.
- DEWCK, P.M (2009). **Medicinal natural product – A biosynthetic approach**, 3^a ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester (546 pp).
- DHAR, M.L.; DHAR, M.M.; DHAWAN, B.N.; MEHROTRA, B.N.; RAY, C. Screening of Indian plants for biological activity I. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 6, p. 232-247, 1968.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, n. 6, p. 529-540, 1994.
- DOLABELA, M.F. *Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-Tripanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substancias sintéticas*. Dissertação de Mestrado - UFMG, Belo Horizonte, 1997.
- EL NAGGAR, E.B.; BARTOSIKOVA, L.; ZEMLICKA, M.; SVAJDLENKA, E.; RABISKOVA, M.; STRNADOVA, V.; NECAS, J. Antidiabetic effect of *Cleome droserifolia* aerial parts: Lipid peroxidation-induced oxidative stress in diabetic rats. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 74, n. 3, p. 347- 352, 2005.
- EL-ASKARY, H.I. Terpenoids from *Cleome droserifolia* (Forssk.) **Molecules**, v. 10, n. 8, p. 971-977, 2005.
- ELIASSQN, L. Responses of *Populus tremula* to picloram and other translocated herbicides, **Physiologia Plantarum**, v. 27, n. 2, p. 101-104, 1972.
- ERTOLA, R.J.; HOURS, R. Role of yeast extract components in microbial cultures not associated with amino acids, vitamins and minerals: a review. **Applied in Biological Sciences**, v. 4, p. 1-15, 1998.
- EXPOSITO, O.; SYKLOWSKA-BARANEK, K.; MOYANO, E.; ONRUBIA, M.; BONFILL, M.; PALAZON J.; CUSIDO, R.M. Metabolic responses of *Taxus media* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 4, p. 1145-1153, 2010
- FAN, G.Z.; LI, X.C.; WANG, X.D.; ZHAI, Q.L.; ZHAN, Y.G. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 19, p. 2816-2820, 2010.
- FATHY, H.M.; ABOUSHOER, M.I.; HARRAZ, F.M. Dolabellane diterpenes from *Cleome droserifolia*. **Natural Products Communications**, v. 3, n. 9, p. 1479-1482, 2008.
- FELZENSZWALB, I.; DE MATTOS, J.C.P.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Shark cartilage-containing preparation: protection against reactive oxygen species. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.1079-1084, 1998.

FIGUEIREDO, L.H.M.; TAKITA, M.A. Cultura de tecidos e transformação genética de citros. **Laranja**, v.25, n.2, p.439-459, 2004.

FOSKET, D.E.; RADIN, D.N. Induction of carotenogenesis in cultured cells of *Lycopersicon esculentum*. **Plant Science Letters**, n.30, p. 165-175, 1983.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004. p. 123-146.

FRANKFATER, C.R.; DOWD, M.K.; TRIPLETT, B.A. Effect of elicitors on the production of gossypol and methylated gossypol in cotton hairy roots. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 98, p. 341-349, 2009.

FU, X-Q.; LU, D-W. Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and *in situ* extraction in suspension cultures of *Arnebia euchroma*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 243-246, 1999.

FURMANOWA, M.; GOWNIAK, K.; SYKOWSKA-BARANEK, K.; ZGÓRKA, G.; JÓZEFczyk, A. Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 75-79, 1997

GAMBORG, O.L.; MILER, R.A.; OJIMAK, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GE, XIUCHUN; WU, JIANYONG. Tanshione production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. **Plant Science**, v. 168, p. 487-491, 2005.

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, 2008, p. 1-28.

GEORGIEV, V.; ILIEVA, M.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant in vitro systems. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 5, p. 581-593, 2008.

GHIGGI, V. *Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por Haematococcus pluvialis*. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2007.

GUILLOIN, S.; TREMOUILLAU-GUILLER, J.; PATI, P. K.; RIDEAU, M.; GANTET, P. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 403-409, 2006.

HAGENDOORN, M.J.M.; VAN DER PLAS, L.H.W.; SEGERS, G.J. Accumulation of anthraquinones in *Morinda citrifolia* cell suspensions. A model system for the study of the

interaction between secondary and primary metabolism. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 38, 227-234, 1994.

HARA, T.; ARITA, T.; TACHIBANA, S.; ITOH, K. Paclitaxel production by immobilized cell suspension cultures of *Taxus cuspidata* var. nana. **Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 557-562, 2008.

HARRAZ, F.M.; ULUBELEN, A.; ÖKSÜZ, S.; TAN, N. Dammarane triterpenes from *Cleome amplyocarpa*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 1, p. 175-178, 1995.

HASHEM, F.A.; WAHBA, H.E. Isothiocyanates in myrosinase treated herb extract of *Cleome chrysantha* Decne. and their antimicrobial activities. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 4, p. 284-287, 2000.

HEBBAR, S.S.; HARSHA, V.H.; SHRIPATHI, V.; HEDGE, G.R. Ethnomedicine of Dharwad district in Karnataka, India - Plants used in oral health care. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 261-266, 2004.

HERRERA-MATA, H.; ROSAS-ROMERO, A.; CRESCENTE, O. Biological activity of "Sanguinaria" (*Justicia secunda*) extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 3, p. 206-212, 2002.

HO, H-Y.; LIANG, K-Y.; LIN, W-C.; KITANAKA, S.; WU, J-B. Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of *Eriobotrya japonica* Lindl. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 5, p. 588-592, 2010.

HUSSEIN, N.S.; AHMED, A.A.; DARWISH, F.M.K. Sesquiterpenes from *Cleome droserifolia*. **Pharmazie**, v. 49, n. 1, p. 76-77, 1994.

JACQUES A.C.; PERTUZATTI P.B.; BARCIA, M.T.; ZAMBIAZI, R.C. Bioactive compounds in small fruits cultivated in the southern region of Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 123-127, 2009.

JENTE, R.; JAKUPOVIC, J.; OLATUNJI, G.A. A cembronoid diterpene from *Cleome viscosa*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 666-667, 1990.

KARWASARA, V.S.; JAIN, R.; TOMAR, P.; DIXIT, V.K. Elicitation as yield enhancement strategy for glycyrrhizin production by cell cultures of *Abrus precatorius* Linn. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 46, p. 354-362, 2005.

KEINANEN, M.; OLDHAM, N.; BALDWIN, I.T. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuate*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, 3553-3558, 2001.

KIERAN, P.M.; MACLOUGHLIN, P.F.; MALNE, D.M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 39-52, 1997.

KIM, H.J.; CHEN, F.; WANG, X.; RAJAPAKSE, N.C. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2327-2332, 2006.

KITTIPONGPATANA, N.; DAVIS, D.L.; PORTER, J.R. Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, n. 1, p. 65-75, 2002.

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

KOMARAIHAH, P.; RAMAKRISHNA, S.V.; REDDANNA, P.; KAVI KISHOR, P.B. Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and *in situ* adsorption. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 181-187, 2003.

KONCZAC-ISLAM, I.; YOSHINAGA, M.; NAKATAMI, M.; TERAHARA, N.; YAMAKAWA, O. Establishment and characteristic of an anthocyanin-producing cell line from sweet potato storage root. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 472-477, 2000.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure Applied Chemistry**, v.66, p.1003- 1010, 1994.

KUMAR, S.; RAY, A.B.; KONNO, C.; OSHIMA, Y.; HIKINO, H. Cleomiscosin D, a coumarino-lignan from seeds of *Cleome viscosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 2, p. 636-638, 1988.

LACHUMY, S.J.T.; SASIDHARAN, S.; SUMATHY, V.; ZURAINI, Z. Pharmacological activity, phytochemical analysis and toxicity of methanol extract of *Etlingera elatior* (torch ginger) flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n.10, p. 769-774, 2010.

LEAL, R.S.; MACIEL, M.A.M.; DANTAS, T.N.C.; MELO, M.D.; PISSINATE, K.; ECHEVARRIA, A. Ethnobotanic profile and antioxidant activity of *Cleome spinosa* (Brassicaceae) and *Pavonia varians* (Malvaceae). **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 25-31, 2007.

LEIFERT, C.; MURPHY, K.P.; LUMSDEN, P.J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, n. 2, p. 83-109, 1995.

LIN, H-W.; KWOK, K.H.; DORAN, P.M. Production of Podophyllotoxin Using Cross-Species Coculture of *Linum flavum* Hairy Roots and *Podophyllum hexandrum* Cell Suspensions. **Biotechnology Progress**, v.19, p. 141-146, 2003.

LINDEN, J.C.; PHISALAPHONG, M. Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. **Plant Science**, v. 158, p. 41-51, 2000.

LINS, R.T. **Determinação de tocoferóis e carotenóides em frutas amazônicas: Implantação de uma nova metodologia**. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Pará, 2006.

LU, M.B.; WONG, H.L.; TENG, W.L. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 674-677, 2001.

LU, Q.; YANG, Q.; ZOU, H.W. Effects of cerium on accumulation of anthocyanins and expression of anthocyanin biosynthetic genes in potato cell tissue cultures. **Journal of Rare Earths**, v. 24, p. 479-484, 2006.

LUCZKIEWCZ, M.; CISOWSKI, W. Optimisation of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 57-68, 2001.

LYM, R.G.; MOXNESS, K.D. Absorption, translocation, and metabolism of picloram and 2,4-D in leafy spurge. **Weed Science**, v. 37, n.4, p. 498-502, 1989.

MAHATO, S.B.; PAL, B.C.; KAWASAKI, T. Structure of cleomeolide, a novel diterpene lactone from *Cleome icosandra* linn. **Journal of American Chemical Society**, v. 101, n. 16, p. 4720-4723, 1979.

MAIA, A.J.; LEITE, C.D.; BOTELHOS, R.V.; FARIA, C.M.D.R.;UBER, S.C. Effects of the chitosan on the development of grapevines cv. Merlot and on the mycelial growth of the fungus *Elsinoe ampelina*. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1425-1430, 2010.

MALVÃO, F. *Germinação de Cleome dendroides Schult. sob condições in vivo e in vitro*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Veiga de Almeida, 2009.

MANGAS, SUSANA et al. The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol of metabolisms *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2041-2049, 2006.

MARSHALL, G.B.; SMITH, M.A.L.; LEE, C.K.C.; DEROLES S.C.; DAVIES, K.M. Differential gene expression between pigmented and non-pigmented cell culture lines of *Daucus carota*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.70, p.91-97, 2002.

MARTIN, D.; THOLL, D.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1003-1018, 2002.

MARTIN, K.P.; ZHANG, C-L.; HEMBROM, M.E.; SLATER, A.; MADASSERY, J. Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an anticancer drug) and rapid propagation. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, p. 163-169, 2008.

MARTINS, S. E.; ROSSI, L.; SAMPAIO, P. S. P.; MAGENTA, M. A. G. Caracterização florística de comunidades vegetais de restinga em Bertioga, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 249-274, 2008.

MATTOS, J.C.P. *Genotoxicidade do íon estano e a sua associação ao DNA*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia, UERJ, Rio de Janeiro, 2000.

McCOY, E.; O'CONNOR, S.E. Natural products from plant cell cultures. In: PETERSEN, F., AMSTUTZ, R. (Eds) **Progress in Drug Research**, v. 65, Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland), 2008, p. 330-370.

McNEIL, M.J.; PORTER, R.B.R.; WILLIAMS, L.A.D.; RAINFORD, L. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Cleome spinosa*. **Natural Product Communications**, v.5, n. 8, p. 1301-1306, 2010.

MEMELINK, J.; VERPOORTE, R.; KIJNE, W. Organization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 212-219, 2001.

MESQUITA, A.C. *Estabelecimento in vitro de lechieira (Litchi chinensis Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, UFL, Lavras, 1999.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTMAN, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIHAI, R.; MITOI, M.; BREZEANU, A.; COGALNICEANU, G. Two-stage system, a possible strategy for the enhancement of anthocyanin biosynthesis in a *long-term* grape callus cultures. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 1, p. 5025-5033, 2010.

MITHEN, R.; BENNETT, R.; MARQUEZ, J. Glucosinolate biochemical diversity and innovation in the Brassicales. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2074-2086, 2010.

MONTHANA, R.A.A.; MENDEL, R.; REISS, C.; LINDEQUIST, U. Phytochemical screening and antiviral activity of some medicinal plants from the Island Soqotra. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 4, p. 298-302, 2006.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SEKI, M.; FURUSAKI, S. Effects of conditioning factor on anthocyanin production in strawberry suspension cultures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 66, n. 3, p. 381-388, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAGAYA, H.; TOBITA, Y.; NAGAE, T.; ITOKAWA, H.; TAKEYA, K.; HALIM, A.F.; ABDEL-HALIM, O. Cytotoxic triterpenes from *Cleome africana*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1115-1119, 1997.

NAIR, A.G.R. Cleosandrin, a novel 7-phenoxy coumarin from the seeds of *Cleome icosandra*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 438-440, 1979.

NAKAMURA, M.; TAKEUCHI, Y.; MIYANAGA, K.; SEKI, M.; FURUSAKI, S. High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 695-699, 1999.

NAMDEO, A.G. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, 2007.

NAMDEO, A.G.; JADHAV, T.S.; RAI, P.K.; GAVALI, S.; MAHADIK, K.R. Precursor feeding for enhanced production of Secondary metabolites: A review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 2, p. 227-231, 2007.

- NARENDHIRAKANNAN, R.T.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. Anti-inflammatory activity of *Cleome gynandra* L. on hematological and cellular constituents in adjuvant arthritic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 1, p. 93-99, 2005a.
- NARENDHIRAKANNAN, R.T.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cleome gynandra* L. leaf extract on acute and chronic inflammatory arthritis studied in rats. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 44-53, 2007.
- NARENDHIRAKANNAN, R.T.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. Free radical scavenging activity of *Cleome gynandra* L. leaves on adjuvant induced arthritis in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 276, n. 1/2, p. 71-80, 2005b.
- NASCIMENTO, S.C.; CHIAPPETA, A.A.; LIMA, R.M.O.C. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, v. 61, n. 4, p. 353-355, 1990.
- NASEEM, M.; JHA, K.K. Differentiation and regeneration in *Cleome* leaves culture *in vitro*. **Egyptian Journal Botany**, v. 1, p. 37-49, 1994.
- NASEEM, M.; JHA, K.K. Rapid clonal multiplication of *Cleome gynandra* DC, through tissue culture. **Phytomorphology**, v. 47, n. 4, p. 405-411, 1997.
- NASIM, S.A.; ASLAM, J.; KAPOOR, R.; KHAN, S.A. Secondary metabolites production through biotechnological intervention: A Review. **Emirate Journal of Food and Agricultural**, v. 22, p. 147-146, 2010.
- NAVES, M.M.V. Beta-caroteno e câncer. **Revista de Nutrição**, v. 11, n. 2, p. 99-115, 1998.
- NAWA, Y.; ASANO, S.; MOOTORI, S.; OHTANI, T. Production of Anthocyanins, Carotenoids, and Proanthocyanins by Cultured Cells of Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.5, n. 57, p. 770-774, 1993.
- NICOLA, W.G.; IBRAHIM, K.M.; MIKHAIL, TH.; GIRGIS, R.B.; KHADRE, M.E. Role of the hypoglycemic plant extract *Cleome droserifolia* in improving glucose and lipid metabolism and its relation to insulin resistance in fatty liver. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v. 135, n. 9, p. 507-517, 1996.
- NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v.163, p.85-87, 1969.
- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M.; SOARES, G.A.; SOARES, F.P.; CASTRO, A.H.F.; PAIVA, P.D.O. Calli induction from leaf explants of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência & Agrotecnologia** v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.
- OGUNNUSI, T.A.; DOSUMU, O.O. Bioactivity of crude extracts of *Euphorbia kamerunica* Pax using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 12, p. 370-373, 2008.
- PAES-LEME, A.A.; MOTTA, E.S.; DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Assessment of *Aloe vera* (L.) genotoxic potential on

Escherichia coli and plasmid DNA. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 197-201, 2005.

PAQUETTE, L.A.; WANG, T-Z.; WANG, S.; PHILIPPO, M.G.C. Enantioselective synthesis of (+)-cleomeolide, the structurally unique diterpene lactone constituent of *Cleome viscosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 22, p. 3523-3526, 1993.

PARIMALADEVI, B.; BOOMINATHAN, R.; MANDAL, S.C. Studies on analgesic activity of *Cleome viscosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, p. 262-266, 2003.

PARK, S.U.; UDDIN, M.R.; XU, H.; KIM, Y.K.; LEE, S.Y. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4959-4965, 2008.

PASQUA, G.; MONACELLI, B.; MULINACCI, N.; RINALDI, S.; GIACCHERINI, C.; INNOCENTI, M.; VINCERI, F.F. The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 293-298, 2005.

PEEBLES, C.A.M.; HONG, S.B.; GIBSON, S.I.; SHANKS, J.V.; SAN, K.Y. Effects of terpenoid precursor feeding on *Catharanthus roseus* hairy roots over-expressing the alpha or the alpha and beta subunits of anthranilate synthase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 3, p. 534-540, 2006.

PI, YAN et al. *Camptotheca acuminata* plant and cell culture, yields under several cell culture treatments. **BIOCELL**, v.34, n. 3, p. 139-143, 2010.

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

PIZARRO, L.; STANGE, C. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. **Ciencia e Investigación Agrária**, v. 36, n. 2, p. 143-162, 2009.

PRASAD, B.C.N.; GURURAJ, H.B.; KUMAR, V.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Valine pathway is more crucial than phenyl propanoid pathway in regulating capsaicin biosynthesis in *Capsicum frutescens* Mill. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 18, p. 6660-6666, 2006

QIN, G.W.; HAMED, A.I.; EL-EMARY, N.A.; CHAEN, Y.G.; WANG, L.Q.; CHEUNG, K.K.; CHENG, K.F. A new trinortriterpenoid from *Cleome chrysantha*. **Planta Medica**, v. 66, n. 2, p. 191-193, 2000.

RAHMANI, NIK NORULAINIK ABDUL et al. Influence of elicitor availability on limonene and linalool accumulation from *citrus grandis* cell cultures. **Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 39-49, 2003.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.

RAMOS, P.I.P. *Estudo in sílico da licopeno ciclase, enzima essencial à via metabólica dos carotenoides*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Bahia, 2008.

RAO, A.V.; AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, n.5, p.563-569, 2000.

RAY, A.B.; CHATTOPADHYAY, S.K. Structure of cleomiscosin A, a coumarino-lignoid of *Cleome viscosa* seeds. **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 4477-4480, 1980.

RAY, A.B.; CHATTOPADHYAY, S.K.; KONNO, C. Structure of cleomiscosin-B, a coumarino-lignoid of *Cleome viscosa* seeds. **Heterocycles**, v. 19, n. 1, p. 19-22, 1982.

RAY, A.B.; CHATTOPADHYAY, S.K.; KUMAR, S.; KONNO, C.; KISO, Y.; HIKINO, H. Structures of cleomiscosins, coumarino-lignoids of *Cleome viscosa* seeds. **Tetrahedron**, v. 41, n. 1, p. 209-214, 1985.

REINIGER, I.W.; DA SILVA, C.R.; FELZENSZWALB, I.; DE MATTOS, J.C.P.; DE OLIVEIRA, J.F.; DANTAS, F.J.S.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BERNARDO-FILHO, M. Boldine action against the stannous chloride effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 345-348, 1999.

RHODES, M.J.; SPENCER, A.; HAMILL, J.D. Plant cell culture in the production of flavour compounds. **Biochemistry Society Transaction**, v. 19, n. 3, p. 702–706, 1991.

RIBEIRO, I.G. *Estabelecimento da cultura de calos de Cleome spinosa Jacq. (Capparaceae)*. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas. Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2004.

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.

SAITO, K.; MIZUKAMI, H. Plant cell cultures as producers of secondary metabolites. In: OKSMAN-CALDENTY, K-M.; BARZ, W.H. (Eds). **Plant Biotechnology and Transgenic Plants**. Marcel Dekker Inc: New York, 2002, p. 96-129.

SAKURAI M.; MORI T.; SEKI M.; FURUSAKI S. Influence of conditioned medium on cyaniding and peonidin synthesis. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 30, n. 5, p. 951-953, 1997.

SAKURAI, M.; MORI, T.; SEKI, M.; FURUSAKI, S. Changes of anthocyanin composition by conditioned medium and cell inoculum size using strawberry suspension culture. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 10, p. 1149-1154, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

- SÁNCHEZ-ACEBO, L. A phylogenetic study of new world *Cleome* (Brassicaceae, Cleomoideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 92, n. 2, p. 179-201, 2005.
- SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, P.D.O. Induction of friable callus in leaf explants of *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v.35, n.3, p. 510-514, 2005.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 403-434, 2004.
- SELLOUM, L.; ARRAR, L.; MEDANI, B.; KHENCHOUCHE, A.; BISKER, H. Effect of *Cleome arabica* leaves extract on inflammatory cells response in rat. **Biochemical Society Transactions**, v. 23, p. 609, 1995.
- SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; SEBIHI, L.; BOUDOUKHA, C.; TIGRINE, C.; DJELLILI, H.; ZAIDI, F. Inhibition of neutrophil pholasin chemiluminescence by *Cleome arabica* leaf extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 7, p. 534-541, 2004.
- SELLOUM, L.; SEBIHI, L.; MEKHALFIA, A.; MAHDADI, R.; SENATOR, A. Antioxidant activity of *Cleome arabica* leaves extract. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, p. S608, 1997.
- SERP, D.; CANTANA, E.; HEINZEN, C.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 1, p. 41-53, 2000.
- SHA VALLIKHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *bixa orellana* l., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 38, p. 186-190, 2002.
- SHARAF, M.; RAGAA, M.A.M.; NABIEL, M.A.S. Exudate flavonoids from aerial parts of four *Cleome* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 5, p. 443-448, 1992.
- SHARMA S.; CHATTOPADHYAY, S.K.; TRIVEDI P.; BAWANKULE, D.U. Synthesis and anti-inflammatory activity of derivatives of coumarino-lignoid, cleomiscosin A and its methyl ether. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5150-5156, 2011.
- SIDWA-GORYCKA, M.; KRÓLICKA, A.; KOZYRA, M.; GŁOWNIAK, K.; BOURGAUD, F.; ŁOJKOWSKA, E. Establishment of a co-culture of *Ammi majus* L. and *Ruta graveolens* L. for the synthesis of furanocoumarins. **Plant Science**, v.165, p. 1315-1319, 2003.
- SIMKIN, A.J.; ZHU, C.; KUNTZ, M.; SANDMANN, G. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis en pepper (*Capsicum annuum*) leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 439-443, 2003.
- SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; CASTRO, T.C.; MANSUR, E. New approaches for shoot production and in vitro root cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 98, p. 79-86, 2009a.

- SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; Callado, C.H.; Castro, T.C.; Mansur, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 679-686, 2010a.
- 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 Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 895-903, 2009b.
- SIMÕES, C.; CASTRO, T.C.; CORDEIRO, L.S.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. & ROMANOS, M.T.V. Antiviral activity of *Cleome rosea* extracts from field-grown plants and tissue culture-derived materials against acyclovir-resistant Herpes simplex viruses type 1 (ACVr-HSV-1) and type 2 (ACVr-HSV-2). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 93-99, 2010b.
- SIMÕES, C.; 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* Vahl ex DC. (Capparaceae). **Fitoterapia**, v. 77, p. 94-99, 2006.
- SIMÕES, C.; ROCHA A.S; CORDEIRO, L.S.; GAYER, C.R.M.; CASTRO, T.C.; COELHO, M.G.P.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E.; ROSA, A.C.P. Antibacterial activity of field-grown plants, in vitro propagated plants, callus and cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae). **Natural Product Research** (submetido).
- SIMÕES, C.; SANTOS, A.S.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from stem explants of *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae). **Journal of Plant Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 199-204, 2004.
- 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 Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 537-545, 2011.
- SINGH, G.; GAVRIELI, J.; OAKEY, J. S.; CURTIS, W. R. Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. **Plant Cell Reports**, v.17, p. 391-395, 1998.
- SINGH, P.D.A.; WEST, M.E. Pharmacological investigations of sticky viscome extract (*Cleome viscosa* L.) in rats, mice and guinea-pigs. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 2, p. 82-84, 1991.
- SINGH, V.K.; ALI, Z.A. Folk medicine in primary health care: common plants used for the treatment of fevers in India. **Fitoterapia**, v. 65, n. 1, p. 68-74, 1994.
- SINGH, Y.N. Tradicional medicine in Fiji: some herbal folk cures used by Fiji indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, p. 57-60, 1986.
- SONGSAK, T.; LOCKWOOD, G.B. Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand. **Fitoterapia**, v. 73, p. 209-216, 2002.

SONGSAK, T.; LOCKWOOD, G.B. Production of two volatile glucosinolate hydrolysis compounds in *Nasturtium montanum* and *Cleome chelidonii* plant cell cultures. **Fitoterapia**, v. 75, p. 296-301, 2004.

SOUZA, K.A. *Atenuação do processo de lignificação em culturas de células de Eucalyptus urophylla S. T. Black, em suspensão, por 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)*. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

SOUZA, S.L.; MOREIRA, A.P.B.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; ALENCAR, E.R. Conteúdo de carotenoides totais e provitamina A em frutas comercializadas em Viçosa, Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.26, n.4, p.453-459, 2004.

SQUINA, F.M.; MARCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenoides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, n.3, p.309-318, 2003.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Hairy root culture for mass production of high-value secondary metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, p. 29-43, 2007.

SUBRAMAN, S.S.; NAIR, A.G.R.; NAGARAJA, S. Isolation of rutin from flowers of *Cleome chelidonii* linn. **Current Science**, v. 34, n. 8, p. 246- 248, 1965.

SUBROTO, M.A.; KWOK, K.H.; HAMILL, J.D.; DORAN, P.M. Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation and biotransformation of secondary metabolites. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 5, p. 481-494, 1996.

SUDHAKAR, M.; RAO, C.V.; RAO, P.M.; RAJU, D.B. Evaluation of antimicrobial activity of *Cleome viscosa* and *Gmelina asiatica*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 47-49, 2006.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, n.54, p.733, 742-745, 2008.

TAVIANO, M.F.; MARINO, A.; TROVATO, A.; BELLINGHERI, V.; LA BARBERA, T.M.; GUVENC, A.; HURKUL, M.M.; DE PASQUALE, R.; MICELI, N. Antioxidant and antimicrobial activities of branches extracts of five *Juniperus* species from Turkey. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 10, p. 1014-1022, 2011.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais: Morfogênese e crescimento *in vitro***. 1ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2005.

TIWARI, V.J.; PADHYE, M.D. Ethnobotanical study of fond tribe of Chandrapur and Gadchiroli districts of Maharashtra State, India. **Fitoterapia**, v. 64, n. 1, p. 60, 1993.

TRÊS, M.V.; FRANCHESCHI, E.; BORGES, G.R.; DARIVA, C.; CORAZZA, F.C.; OLIVEIRA, J.V.; CORAZZA, M.L. Influência da temperatura na solubilidade de β -caroteno em solventes orgânicos à pressão ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.4, p.737-743, 2007.

TSICHRITZIS, F., ABDEL-MOGOB, M., JAKUPOVIC, J. Dammarane triterpenes from *Cleome africana*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 423-425, 1993.

UENOJO, M.; JUNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.D. Produção de carotenoides: Microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, Rio Grande do Sul, v.32, n.9, p.2429-2436, 2009.

VAN DER PLAS, L.H.W.; EIJKELBOOM, C.; HAGENDOORN, M.J.M. Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspension. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.43, p.111-116, 1995.

VANISREE, M.; LEE, C-Y., LO, S-F.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H-S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 1-22, 2004.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, p. 861-875, 2007.

VAZQUEZ-FLOTA, F.; HERNANDEZ-DOMINGUEZ, E.; MIRANDA-HAM, M.L.; MONFORTE-GONZALEZ, M. A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus* in vitro cultures. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 591-595, 2009.

VEERPORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. (Orgs) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 382-432.

VOORRIPS, L.E.; GOLDBOEHM, R.A.; VERHOEVEN, D.T.; GEERT, A.F.C.; STURMANS, F.; HERMUS, R.J.J.; VAN DEN BRANDT, P.A. Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. **Cancer Causes Control**, v. 11, n. 2, p. 101-115, 2000.

WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; VIVANCO, J.M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, v. 60, p. 289-293, 2002.

WANG, Y-D.; WU, J-C.; YUAN, Y-J. Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. **Cell Biology International**, v. 31, p. 1179-1183, 2007.

WEATHERS, P. J.; TOWLER, M. J.; XU, J. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.85, p. 1339-1351, 2010.

WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, v.9, p.585-600, 1934.

WILLIAMS, L.A.D.; VASQUES, E.; REID, W.; PORTER, R.; KRAUS, W. Biological activities of an extract from *Cleome viscosa* L. (Capparaceae). **Naturwissenschaften**, v. 90, p. 468-472, 2003.

WU C-H., MURTHY, H. N.; HAHN, E-J.; PAEK, K-Y. Establishment of adventitious root co-culture of Ginseng and Echinacea for the production of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 891-896, 2008.

YANIV, Z.; DAFNI, A.; FRIEDMAN, J.; PALEVITCH, D. Plants used for the treatment of diabetes in Israel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, p. 145-151, 1987.

YAO, H.; ZHONG, J.J. Improved production of ginseng polysaccharide by adding conditioned medium to *Panax notoginseng* cell cultures. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.347-349, 1999.

YEOMAN, M. M.; YEOMAN, C. L. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. **New Phytologist**, v. 134, p. 553-569, 1996.

YUKIMUNE, Y.; TABATA, H.; HIGASHI, Y.; HARA, Y. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1129-1132, 1996.

ZAMITH, L.R.; SCARANO, F.R. Restoration of a restinga sandy coastal plain in Brazil: Survival and growth of planted woody species. **Restoration Ecology**, v. 14, n. 1, p. 87-94, 2006.

ZHANG, C.H.; FEVEREIRO, P.S.; HE, G.; CHEN, Z. Enhanced paclitaxel productivity and release capacity of *Taxus chinensis* cell suspension cultures adapted to chitosan. **Plant Science**, v.72, p. 158-163, 2007.

ZHANG, W.; CURTIN, C.; KIKUCHI, M.; FRANCO, C. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. **Plant Science**, v.162, p. 459-468, 2002.

ZHANG, S.; LIU, Y.; SHEN S.; LIANG, Z.; YANG, D. Effects of elicitors on accumulation of phenolic acids and tashinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 36, n.10, p. 1269-1274, 2011.

ZHAO, J.; HU, Q.; GUO, Y-Q.; ZHU, W-H. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. **Applied in Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 693-698, 2001.

ZHONG, J.J.; YOSHIDA, T. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspension for anthocyanin production: effects of sucrose concentration and inoculum size. **Enzymology and Microbiology Technology**, v. 17, p. 1079-1087, 1995.

ZHOU, L.G.; WU, J.Y. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 789-810, 2006.