



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

Brenda Amaral de Moraes

Estabelecimento de culturas de raízes *in vitro* e avaliação da produção de metabólitos secundários de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)

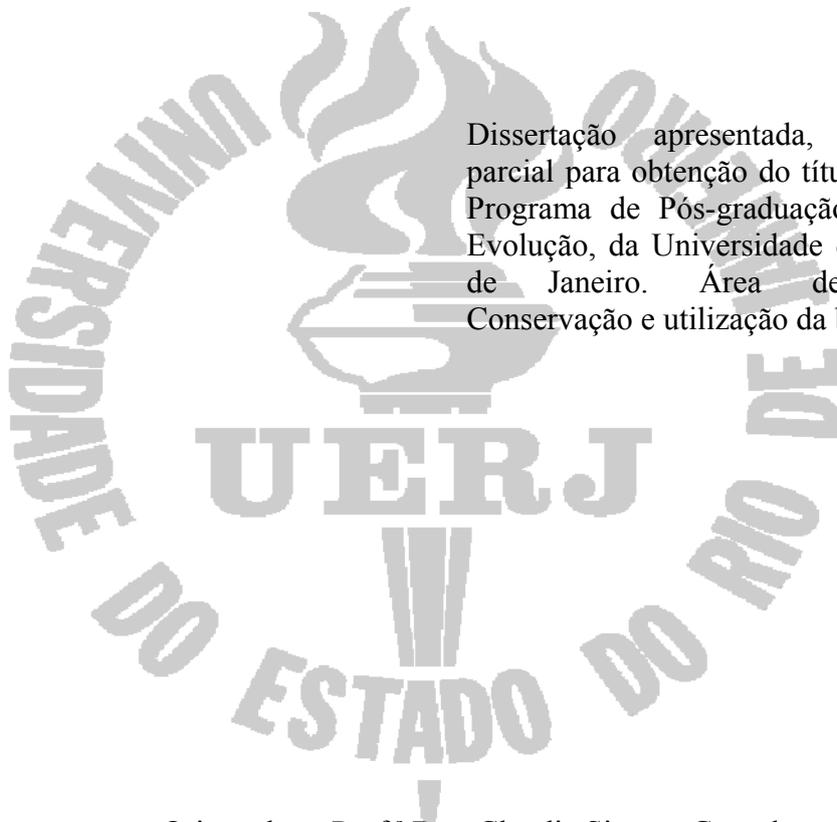
Rio de Janeiro

2015

Brenda Amaral de Moraes

Estabelecimento de culturas de raízes *in vitro* e avaliação da produção de metabólitos secundários de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e utilização da biodiversidade



Orientadora: Prof.^a Dra. Claudia Simões-Gurgel

Coorientadora: Prof.^a Dra. Norma Albarello

Rio de Janeiro

2015

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

M827 Moraes, Brenda Amaral de.
Estabelecimento de culturas de raízes in vitro e avaliação da produção de metabólitos secundários de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae). – 2015.
121 f. : il.

Orientadora: Claudia Simões- Gurgel
Coorientadora: Norma Albarello
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Fisiologia vegetal - Teses. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. 3. Fitoquímicos. 4. Plantas medicinais - Teses. I. Simões-Gurgel, Claudia. II. Albarello, Norma. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 581.1

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

Assinatura

Data

Brenda Amaral de Moraes

**Estabelecimento de culturas de raízes *in vitro* e avaliação da produção
demetabólitos secundários de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, do Instituto Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e utilização da

Aprovada em 26 de fevereiro de 2015.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Claudia Simões-Gurgel
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ.

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Norma Albarello
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Aline Castellar Duarte
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ.

Prof.^a Dra. Rachel Fátima Gagliardi Araújo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ.

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus mestres e educadores de vida.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Claudia Simões-Gurgel e Norma Albarello, pelo estímulo à minha formação acadêmico-científica, pela dedicação, apoio e ajuda na realização e conclusão deste trabalho.

À agência financiadora CAPES, pela bolsa de estudos.

Aos colegas do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, especialmente ao grupo do Labplan, técnicos, alunos e estagiários, pelo auxílio e contribuição.

Ao farmacêutico Eduardo Fonseca, pelo auxílio nas análises fitoquímicas e interpretação dos resultados.

Aos professores que tive durante o curso, com os quais aprendi e que muito contribuíram para meu conhecimento científico.

Aos familiares e amigos, pelo apoio e estímulo.

Aos meus avós, Odaléia e José; à minha tia Barbara, pelo incentivo na profissão e carinho.

Aos meus pais, Mario e Vânia, por toda dedicação e amor incondicionais dispensados a mim.

Ao meu querido namorado Vinícius, por me amar em todos os sentidos e jeitos; por me apoiar em tudo quanto precisei. Simplesmente te amo.

Ao meu Deus, pois sem Ele afirmo que não seria possível chegar até aqui.

A impossibilidade de provar e compreender que o grandioso e imenso universo, assim como o homem, tiveram origem por acaso parece-me ser o argumento principal para a existência de Deus.

Felipe Aquino

RESUMO

MORAES, B. A. *Estabelecimento de culturas de raízes in vitro e avaliação da produção de metabólitos secundários de Cleome spinosa Jacq. (Cleomaceae)*. 2015. 118f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Cleome spinosa é uma espécie herbácea de uso na medicina popular, especialmente no Nordeste do Brasil. A cultura *in vitro* de raízes adventícias da espécie foi iniciada com segmentos radiculares (0,5 e 1,0 cm) obtidos a partir de duas fontes de explantes: plantas propagadas *in vitro* e plantas oriundas do processo de germinação *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio MS líquido suplementado ou não com as auxinas ANA, AIA e AIB em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 3,0; 5,0 mg.L⁻¹). As culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob agitação (100 rpm) e sob fotoperíodo de 16h ou no escuro, com subculturas a cada 45 dias. Explantes oriundos de plantas propagadas *in vitro* também foram cultivados em meio contendo a citocinina BAP em associação com auxinas, na presença de sorbitol (isoladamente ou em associação com sacarose), em meio MS contendo redução na concentração total de sais minerais (MS^{1/2} e MS^{1/4}) e em meio sólido. Os resultados mostraram que a adição de auxinas ao meio de cultura foi essencial à multiplicação das raízes, uma vez que em meio MS0 ocorreu significativo desenvolvimento de brotos. A suplementação com ANA não foi eficiente para a produção de raízes e acarretou no caejamento dos explantes, enquanto que a presença de AIA e AIB resultaram na multiplicação das raízes. Ainda assim, independentemente das manipulações realizadas no meio de cultivo, a capacidade de multiplicação mostrou-se reduzida. Uma expressiva multiplicação de raízes foi observada em culturas iniciadas a partir de explantes oriundos de plantas obtidas por germinação *in vitro*. A maior produção de biomassa foi alcançada em culturas iniciadas com segmentos radiculares de plantas obtidas por germinação *in vitro* cultivadas em meio contendo com 3,0 mg.L⁻¹ de AIB e mantidas no escuro. Culturas estabelecidas nas melhores condições para acúmulo de biomassa foram acompanhadas por três subculturas, sendo avaliados períodos de cultura de 45 dias e de 60 dias. Culturas mantidas a intervalos de 45 dias apresentaram maior produção de raízes durante a segunda subcultura, enquanto que para o intervalo de 60 dias, embora tenha sido observada a capacidade de multiplicação das raízes, a maior produção de biomassa ocorreu nos primeiros 60 dias de cultivo. A partir de materiais *in vivo* e *in vitro* foram realizadas extrações com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) e os extratos foram submetidos a avaliações cromatográficas. As análises por cromatografia em camada delgada mostraram a presença de terpenos nos extratos obtidos com hexano e diclorometano, tanto em material obtido a campo como naqueles produzidos *in vitro* e de compostos fenólicos nos extratos em acetato de etila obtidos a partir de material de campo. Pelas análises por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas foi possível observar a presença de flavonoides nas culturas *in vitro*, não detectados no material de campo. As análises por cromatografia de fase gasosa associada à espectrometria de massas apontaram a presença de esteroides nos extratos em hexano de raízes coletadas a campo e nas culturas *in vitro* de raízes. Os resultados obtidos mostraram a viabilidade da produção de culturas de raízes *in vitro* para a espécie *C. spinosa* e o potencial deste material para a produção de substâncias bioativas, algumas não encontradas em material coletado a campo.

Palavras-chave: Auxinas. Compostos fenólicos. Cromatografia. Extrato bruto. Terpenos.

ABSTRACT

MORAES, B. A. *Establishment of in vitro root cultures and evaluation of secondary metabolites production of Cleome spinosa Jacq. (Cleomaceae)*. 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Cleome spinosa is a herbaceous species used in folk medicine, mainly in the Northeast of Brazil. Cultures of adventitious roots were established with root segments (0.5 to 1.0 cm) obtained from two sources of explants: *in vitro* propagated plants and plants obtained from *in vitro* germination process. The explants were inoculated in MS liquid medium supplemented with or without the auxin NAA, IAA and IBA in different concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 5.0 mg.L⁻¹). Cultures were maintained in a growth room under agitation (100 rpm) and photoperiod of 16h light or in the dark, with subcultures every 45 days. Explants from *in vitro* propagated plants were also cultured in medium containing BAP in combination with auxins, in the presence of sorbitol (alone or in combination with sucrose), in MS medium with a reduction in the total concentration of mineral salts (MS^{1/2} and MS^{1/4}) and on solidified medium. The results showed that hormonal supplementation was essential for roots multiplication, once cultures maintained in MS0 medium only developed shoots. The medium supplementation with NAA was not efficient for root production and resulted in callus induction. The presence of IAA and IBA was efficient to root multiplication. A significant root proliferation capacity was observed in cultures initiated from explants originating from plants obtained by *in vitro* germination process. On the other hand, cultures initiated with explants originating from *in vitro* propagated plants, regardless the different manipulations performed in the culture medium, showed low root multiplication capacity. The highest biomass production was achieved by cultures initiated with explants from *in vitro* germination plants cultured in medium supplemented with 3.0 mg.L⁻¹ IBA and kept in the dark. Cultures with the highest biomass accumulation were subcultured at each 45 days or 60 days interval to fresh medium with the same composition during three - four subcultures. Cultures maintained at 45 days interval reached the highest biomass accumulation during the second subculture, while cultures maintained at 60 days interval, despite the maintenance of root multiplication along the subcultures, reached the highest production during the first 60 days in culture. Samples from *in vivo* and *in vitro* material were extracted with increasingly polar solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol) and the extracts were submitted to chromatographic analysis. The analysis by thin layer indicated the presence of terpenes in hexane and dichloromethane extracts obtained with field plants and *in vitro* materials, and the presence of phenolic compounds in ethyl acetate extracts obtained with field plants. Analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry showed the *in vitro* production of metabolites not found in field plants, especially flavonoids. The gas chromatography coupled to mass spectrometry indicated the presence of steroids in the extracts obtained with hexane from field plants and root cultures. The results demonstrated the feasibility in the production of *in vitro* root cultures of *C. spinosa* and the potential of these biotechnological materials to phytochemical studies, mainly considering the presence under *in vitro* cultures of metabolites not produced by field plants.

Keywords: Auxin. Phenolic compounds. Chromatography. Crude extract. Terpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Aspecto da inflorescência de <i>Cleome spinosa</i> | 32 |
| Figura 2 - Exsicata de <i>C. spinosa</i> | 36 |
| Figura 3 - Metodologia de extração aplicada às raízes de <i>Cleome spinosa</i> | 43 |
| Figura 4 - Plântulas de <i>C. spinosa</i> oriundas do processo de germinação <i>in vitro</i> de sementes mantidas em BOD..... | 48 |
| Figura 5 - Culturas de raízes iniciadas a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> inoculados em meio MS0..... | 50 |
| Figura 6 - Cultura de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> inoculados em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de ANA... | 50 |
| Figura 7- Culturas de raízes de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB..... | 52 |
| Figura 8 - Culturas de raízes de explantes radiculares (0,5 cm) obtidos de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> inoculados em meio MS suplementado com AIA..... | 53 |
| Figura 9 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS líquido acrescido de 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitol e suplementado com auxinas..... | 55 |
| Figura 10 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS líquido acrescido de 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitol e suplementado com 0,5 mg.L ⁻¹ de AIB..... | 57 |
| Figura 11 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas propagadas <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS0, após 45 dias..... | 58 |
| Figura 12 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> a partir de explantes radiculares de plantas propagadas <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com AIB, após 45 dias de cultivo..... | 59 |
| Figura 13 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> a partir de explantes radiculares de plantas propagadas <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com AIA, após 45 dias de cultivo..... | 59 |
| Figura 14 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> a partir de explantes radiculares de plantas propagadas <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS com a associação auxina:citocinina, após 45 dias de cultivo..... | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas propagadas <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS com redução na concentração total de sais minerais, após 45 dias de cultivo..... | 62 |
| Figura 16 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares de plantas propagadas <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS sólido suplementado com AIA, após 45 dias de cultivo..... | 63 |
| Figura 17 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS0, após 45 dias de cultivo..... | 59 |
| Figura 18 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB, após 45 dias de cultivo..... | 59 |
| Figura 19 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB ou AIA, após 45 dias de cultivo..... | 66 |
| Figura 20 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB, após 45 dias de cultivo..... | 68 |
| Figura 21 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA, após 45 dias de cultivo..... | 69 |
| Figura 22 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB..... | 71 |
| Figura 23 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA..... | 72 |
| Figura 24 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com 3 mg.L ⁻¹ de AIB..... | 74 |
| Figura 25 - Culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> , a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação <i>in vitro</i> , inoculados em meio MS suplementado com 3 mg.L ⁻¹ de AIB..... | 75 |
| Figura 26 - CCD dos extratos em hexano de raiz coletada a campo (RC), raiz <i>in vitro</i> (RIV), cultura de raízes de 45 dias (C45) e de 60 dias (C60) de <i>C. spinosa</i> | 78 |
| Figura 27 - CCD dos extratos em diclorometano de raiz coletada a campo (RC), raiz <i>in vitro</i> (RIV), culturas de raízes de 45 dias (C45) e de 60 dias (C60) de <i>C. spinosa</i> | 79 |

| | |
|--|----|
| Figura 28 - CCD dos extratos em acetato de etila de raízes coletada a campo (RC), raiz <i>in vitro</i> (RIV), cultura de raízes de 45 dias (C45) e de 60 dias (C60) de <i>C. spinosa</i> | 80 |
| Figura 29 - Cromatogramas por CLAE-UV _{254nm} dos extratos em acetato de etila de raízes de <i>C. spinosa</i> | 81 |
| Figura 30 - Cromatogramas por CLAE-UV _{254nm} dos extratos em acetato de etila de raízes de <i>C. spinosa</i> | 82 |
| Figura 31 - Cromatogramas por CLAE-UV-EM-IES dos extratos em acetato de etila de <i>C. spinosa</i> | 84 |
| Figura 32 - Cromatogramas por CLAE-EM-IES dos extratos em acetato de etila de <i>C. spinosa</i> | 85 |
| Figura 33 - Espectro de massas da substância vogonina (tR 75,4 e m/z 283,1) encontrado em raízes de plantas propagadas <i>in vitro</i> e em culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> | 86 |
| Figura 34 - Espectro de massas da substância cirsiol (tR 58,4 e m/z 329,2), encontrado em raízes de plantas coletadas a campo, raízes de plantas propagadas <i>in vitro</i> e em culturas de raízes de <i>C. spinosa</i> | 87 |
| Figura 35 - Espectro de massas da substância reinutrina (tR 101,7 e m/z 433,2), encontrado em raízes de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> | 87 |
| Figura 36 - Cromatograma por CG-EM do extrato em hexano obtido a partir de raízes coletadas a campo de <i>C. spinosa</i> | 94 |
| Figura 37 - Cromatogramas por CG-EM dos extratos em hexano de <i>C. spinosa</i> | 95 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Biomassa fresca e seca das amostras e rendimento dos extratos de <i>C. spinosa</i> | 43 |
| Tabela 2 - Porcentagens de germinação e de contaminação de sementes de <i>C. spinosa</i> após pré-tratamento germinativo (escarificação + embebição em água destilada por 12 horas), seguido por diferentes tratamentos de desinfestação..... | 48 |
| Tabela 3 - Triagem fitoquímica por CCD realizada com os diferentes extratos de <i>C. spinosa</i> obtidos a partir de material <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 77 |
| Tabela 4 - Listagem dos constituintes fitoquímicos detectados por CLAE-UV-EM-IES em extratos obtidos em acetato de etila a partir de raízes de <i>C. spinosa</i> coletadas a campo (RC), raízes de plantas propagadas <i>in vitro</i> (RIV) e culturas de raízes mantidas por tempo de cultivo de 45 dias (C45)..... | 88 |
| Tabela 5 - Esteroides detectados pela análise em CG-EM de extratos em hexano obtidos a partir de raízes coletadas a campo e de culturas de raízes de 45 dias de <i>C. spinosa</i> | 95 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 -Espécies do gênero <i>Cleome</i> utilizadas na medicina popular..... | 30 |
| Quadro 2 -Substâncias bioativas isoladas e identificadas em espécies do gênero <i>Cleome</i> | 31 |
| Quadro 3 -Pré-tratamentos germinativos realizados com sementes de <i>C. spinosa</i> | 37 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro* inoculados em meio MS líquido com diferentes concentrações de AIB, após 45 dias de cultivo..... 52
- Gráfico 2- Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com diferentes concentrações de AIA, após 45 dias de cultivo..... 53
- Gráfico 3- Acúmulo de biomassa de culturas de raízes de *C. spinosaa* partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido acrescido com 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitol e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIA ou AIB, após 45 dias..... 56
- Gráfico 4 - Acúmulo de biomassa de culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido acrescido com 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitole suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIA ou AIB..... 57
- Gráfico 5 - Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares (0,5 cm e 1,0 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com diferentes concentrações de AIB ou AIA, após 45 dias de cultivo..... 60
- Gráfico 6- Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS com diferentes concentrações de AIB ou AIA, após 45 dias em cultivo..... 67
- Gráfico 7- Acúmulo de biomassa de culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (0,5 cm e 1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro* inoculados em meio MS líquido com 3,0 ou 5,0 mg.L⁻¹ de AIB ou AIA, após 45 dias de cultivo..... 69
- Gráfico 8- Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com AIB ou AIA, após 45 dias de cultivo..... 73

- Gráfico 9 - Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com 3 mg.L⁻¹ de AIB..... 75
- Gráfico 10 - Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com 3 mg.L⁻¹ de AIB..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--|
| AIA | Ácido indolacético |
| AIB | Ácido indolbutírico |
| ANA | Ácido naftaleno acético |
| BAP | Benzilaminopurina |
| BOD | <i>Biochemical Oxygen Demand</i> |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CG | Cromatografia em fase gasosa |
| CG-EM | Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CLAE-UV-EM-IES | Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| MS | Meio de cultura Murashige e Skoog (1962) |
| MS0 | Meio de cultura Murashige e Skoog (1962) sem reguladores de crescimento |
| NaClO | Hipoclorito de sódio |
| PF | Peso de matéria fresca |
| PS | Peso de matéria seca |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | Cultura de tecidos vegetais | 17 |
| 1.2 | Aplicações da cultura de tecidos vegetais | 18 |
| 1.3 | Culturas de raízes <i>in vitro</i> | 19 |
| 1.4 | Metabólitos secundários | 22 |
| 1.5 | Técnicas de cromatografia aplicadas aos estudos com plantas medicinais | 24 |
| 1.6 | Gênero <i>Cleome</i> | 28 |
| 1.6.1 | <i>Cleome spinosa</i> Jacq | 32 |
| 2 | OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 34 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 34 |
| 3 | METODOLOGIA | 35 |
| 3.1 | Material botânico | 35 |
| 3.1.1 | <u>Propagação <i>in vitro</i></u> | 35 |
| 3.1.2 | <u>Germinação <i>in vitro</i></u> | 36 |
| 3.2.2 | <u>Estabelecimento das culturas de raízes</u> | 38 |
| 3.3 | Delineamento experimental | 41 |
| 3.4 | Estudos fitoquímicos | 41 |
| 3.4.1 | <u>Preparo dos extratos</u> | 42 |
| 3.4.2 | <u>Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)</u> | 44 |
| 3.4.3 | <u>Análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplada à espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (CLAE-UV-EM-IES)</u> | 45 |
| 3.4.4 | <u>Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de</u> | |

| | | |
|-------|--|-----|
| | <u>massas (CG-EM)</u> | 46 |
| 4 | RESULTADOS | 47 |
| 4.1 | Germinação <i>in vitro</i> | 47 |
| 4.2 | Estabelecimento das culturas de raízes a partir de segmentos radiculares de plantas propagadas <i>in vitro</i> | 49 |
| 4.2.1 | <u>Influência da suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento</u> | 49 |
| 4.2.2 | <u>Influência da fonte de carbono do meio de cultura</u> | 55 |
| 4.2.3 | <u>Influência do tamanho do explante</u> | 58 |
| 4.2.4 | <u>Influência da associação auxina e citocinina</u> | 60 |
| 4.2.5 | <u>Influência da redução da concentração de sais do meio de cultura</u> | 61 |
| 4.2.6 | <u>Cultura de raízes em meio solidificado</u> | 62 |
| 4.3 | Estabelecimento das culturas de raízes a partir de segmentos radiculares de plantas oriundas de germinação <i>in vitro</i> | 63 |
| 4.4 | Estudos fitoquímicos | 76 |
| 4.4.1 | <u>Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)</u> | 76 |
| 4.4.2 | <u>Análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplada à espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (CLAE-UV-EM-IES)</u> | 80 |
| 4.4.3 | <u>Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)</u> | 94 |
| 5 | DISCUSSÃO | 96 |
| | CONCLUSÕES | 106 |
| | REFERÊNCIAS | 107 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cultura de tecidos vegetais

Por cultura de tecidos vegetais, também referida como cultivo vegetal *in vitro*, entende-se o conjunto de metodologias que permitem a reprodução assexuada de plantas ou o cultivo de células, tecidos ou órgãos *in vitro*, sob condições físicas controladas, em ambiente asséptico e com a suplementação de nutrientes.

As técnicas de cultivo vegetal *in vitro* têm início com a inoculação de explantes. O explante é qualquer fragmento de tecido vegetal oriundo de uma planta matriz, com capacidade de regeneração em meio de cultura específico (CARVALHO; VIDAL, 2003; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A regeneração do explante se baseia na totipotência celular, demonstrada pela primeira vez na manipulação *in vitro* de plantas pelo botânico e fisiologista Gottlieb Haberlandt, em 1902 (MARTINS; CARVALHO, 2012). A teoria da totipotencialidade explica a capacidade pela qual qualquer célula vegetal tem potencial genético para regenerar uma planta completa (GUERRA; NODARI, 2006).

O material vegetal pode ser cultivado em meio líquido ou em meio solidificado com um agente de gelificação, como o ágar. O meio de cultura consiste de uma solução de sais minerais que fornece macro e micro nutrientes e vitaminas, necessários para a indução da morfogênese, além da adição de uma fonte de carbono. A constituição do meio é feita de acordo com as exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender a necessidades específicas (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUERRA; NODARI, 2006). Normalmente, também há a suplementação com hormônios vegetais ou mais frequentemente com os seus análogos sintéticos, denominados reguladores de crescimento ou fitorreguladores. Substâncias pertencentes às classes das auxinas e das citocininas são consideradas as mais importantes para a regulação do crescimento e da morfogênese em cultura de tecidos vegetais.

Após o balanço hormonal endógeno ser interrompido, considerando uma excisão, os tecidos ficam sujeitos aos reguladores de crescimento adicionados ao meio. Deste modo, a morfogênese *in vitro* é modulada pelas condições físicas e pelo balanço

de fitorreguladores adicionados ao meio de cultura (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GUERRA; NODARI, 2006). Uma das principais respostas, a obtenção de plantas *in vitro*, pode ocorrer por diferentes vias morfogênicas: proliferação de gemas axilares, indução de órgãos adventícios por organogênese e a embriogênese somática. No processo de organogênese, ocorre a obtenção de órgãos vegetais (brotos, folhas ou raízes) a partir de gemas adventícias, ou seja, estruturas meristemáticas e com conexão vascular com o tecido original. Na embriogênese somática, originam-se estruturas bipolares a partir de células somáticas, sem conexões vasculares com os tecidos maternos. O desenvolvimento dos embriões ocorre por meio de uma sequência de estádios característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos (BARROS, 1999; TERMIGNONI, 2005). Tanto a embriogênese somática quanto a organogênese podem ocorrer de forma direta ou indireta. Na via direta há a formação de órgãos ou embriões a partir de tecidos responsivos, enquanto que na via 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 pode ocorrer o desenvolvimento de órgãos ou embriões somáticos (ANDRADE, 2002; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUERRA; NODARI, 2006).

1.2 Aplicações da cultura de tecidos vegetais

As técnicas de cultivo de tecidos vegetais possuem várias aplicações, dentre elas a produção de indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz. Com grande vantagem pela produção rápida, em larga escala e em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, permitem o fornecimento contínuo de material vegetal (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* proporciona a obtenção de um grande número de plantas geneticamente uniformes. Uma importante aplicação desta técnica é a limpeza clonal, que objetiva a produção de plantas livres de vírus e a conservação de germoplasmas de interesse (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CARVALHO; VIDAL, 2003).

A cultura de tecidos vegetais também é uma ferramenta promissora na produção de metabólitos secundários *in vitro*, por permitir a obtenção contínua e homogênea de substâncias de interesse sem a constante coleta de material botânico em seu ambiente natural (CHARLET et al., 2000; VILLAREAL et al. 1997).

O cultivo *in vitro* pode ser obtido tanto a partir de tecidos desorganizados quanto organizados. A cultura com crescimento desorganizado, como é a cultura de calos e as suspensões celulares, tem sido uma alternativa para o estudo e produção de metabólitos secundários. Os agregados de células formados não apresentam uma estrutura definida e contêm um número limitado de células especializadas e indiferenciadas, ao contrário do que observado em uma planta intacta. As culturas com crescimento desorganizado, como a cultura de calos e as suspensões celulares, apresentam como vantagem a possibilidade de um grande acúmulo de biomassa. Deste modo, elas são uma alternativa para o estudo e produção de metabólitos secundários (BEHBAHANI; SHANEHSAZZADEH; HESSAMI, 2011; GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GUEVEN; KNORR, 2011). Contudo, devido à ausência de organização tecidual e à diversidade de tipos celulares, características importantes para a síntese de substâncias bioativas, essas culturas nem sempre são eficientes na produção de metabólitos (WILSON; ROBERTS, 2012). O cultivo com crescimento organizado ocorre a partir de tecidos diferenciados, ou seja, que tenham desenvolvido morfologia ou fisiologia especializada. A cultura de órgãos possibilita a manutenção contínua de uma forma com crescimento organizado podendo ser relevante para um alto acúmulo de biomassa associado à produção de metabólitos. Nesse sentido, as culturas de raízes são modelos eficientes por serem constituídas de células diferenciadas e, ao mesmo tempo, apresentarem potencial de rápido crescimento. Além disso, pela sua própria localização no vegetal, as raízes são consideradas ricas fontes de substâncias de defesa contra a ação de microrganismos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; YANIV; BACHRACH, 2002).

1.3 Culturas de raízes *in vitro*

As raízes são estruturas de fixação, absorção, reserva e condução. Nos grupos das gimnospermas e das dicotiledôneas, a raiz primária e suas ramificações formam o

sistema radicular chamado pivotante. Neste sistema, raízes laterais emergem de uma raiz principal. No grupo das monocotiledôneas, é comum o desenvolvimento da raiz primária em um curto período de tempo, levando à formação de um sistema radicular constituído por raízes adventícias. Estas têm origem a partir de partes áreas das plantas, formando, assim, o sistema radicular fasciculado (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

O desenvolvimento de raízes adventícias pode ocorrer em plantas intactas que crescem em condições naturais ou naquelas que sofreram algum tipo de estímulo, como uma injúria ou ataque de patógenos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). No entanto, segundo Feldman (1994 apud WAISEL et al., 2002), a formação de raízes adventícias só ocorre de fato após uma influência externa, como uma lesão ou tratamento hormonal, não sendo uma indução programada pelo desenvolvimento normal da planta.

As raízes das plantas são fontes potenciais de substâncias bioativas, tornando o cultivo de raízes adventícias *in vitro* de grande relevância para a produção de metabólitos de interesse. As raízes são órgãos constituídos de tecidos diferenciados, com compartimentalização celular, o que as torna eficientes em acumular substâncias bioativas. Comparadas às culturas de calos e de células em suspensão, as culturas de raízes acumulam grandes quantidades de metabólitos secundários em espaços intercelulares, o que pode facilitar a extração e o isolamento dessas substâncias (BAQUE et al., 2013; SIVAKUMAR, 2006). Essas culturas também têm sido bastante exploradas em estudos visando avaliar a influência das condições físicas e químicas do ambiente de cultura sobre o acúmulo de biomassa e produção de metabólitos secundários (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006; MURTHY; HAHN; PAEK, 2008).

O cultivo *in vitro* de raízes tem como vantagens o rápido crescimento e facilidade de multiplicação, propiciando que essas culturas sejam realizadas em larga escala (NAGARAJANAN; ARIVALAGANB; RAJAGURUA, 2011). Apesar das vantagens, a produção de raízes *in vitro* pode ser influenciada por diferentes fatores, tornando o seu estabelecimento um processo complexo. O nível de hormônios endógenos, a presença de compostos fenólicos, o estado nutricional da planta, a presença ou ausência de gemas dormentes e características genéticas podem influenciar o crescimento das raízes (HAND, 1994; SMART et al., 2003). Além disso, por ser um

processo que requer energia, a formação de raízes adventícias é dependente do suprimento adequado de carboidratos para a região de regeneração (CORRÊA et al., 2005). O tipo de fonte de carbono e suas concentrações afetam a indução de raízes em muitas espécies cultivadas *in vitro*, sendo sacarose, glicose e sorbitol as fontes de carbono mais frequentemente utilizadas (BAHMANI; KARAMI; GHOLAMI, 2009).

Ainda que a produção de raízes *in vitro* seja de grande relevância para a produção de metabólitos especiais (LOYOLA-VARGAS; MIRANDA-HAM, 1995; FLORES; VIVANCO; LOYOLA-VARGAS, 1999; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; ZOBAYED; SAXENA, 2003), a proliferação de raízes adventícias em algumas espécies pode ser mais lenta e com menor produtividade quando se compara ao material coletado a campo. Nesse sentido, estratégias biotecnológicas podem ser aplicadas a fim de aumentar a produção de substâncias bioativas, como por exemplo, a transformação genética usando o sistema de vetor natural constituído pela *Agrobacterium rhizogenes*, quando são produzidas as chamadas *hairy roots* (KIM; WYSLOUZIL; WEATHERS, 2002; GEORGIEV; PAVLOV; BLEY, 2007; LOURENÇO, 2003; VEENA; TAYLOR, 2007).

Para a produção de metabólitos em larga escala aplicam-se as culturas de raízes adventícias em biorreatores. Por oferecer vantagens como maior acúmulo de biomassa em tempo reduzido, maior acúmulo de substâncias bioativas e produção estável por longos períodos de tempo, o uso desses sistemas pode reduzir os custos e o tempo de produção, além de propiciar a obtenção de um produto asséptico sob condições de cultura controladas (BAQUE et al., 2013).

Os metabólitos secundários tendem a se acumular nas células em resposta a diferentes fatores. Em condições *in vitro* a aplicação de estresses bióticos (por exemplo, extrato de levedura, quitosana, metil jasmonato) ou abióticos (por exemplo, temperatura, pH, luminosidade) visando à indução de metabólitos secundários é chamada de elicitação. Um elicitor pode ser definido como uma molécula que, em pequenas concentrações, otimiza a produção de substâncias específicas ou que reduz o tempo necessário para se atingir altas concentrações de um determinado metabólito (FUMAGALI, 2008; MURTHY; LEE; PAEK, 2014; NAMDEO, 2007; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

O processo de elicitação tem sido muito utilizado visando à indução e/ou otimização da produção de metabólitos em culturas de raízes. O aumento na

concentração de biofenóis totais em raízes adventícias de *Panax ginseng* foi observado em culturas tratadas com $200 \mu\text{M.L}^{-1}$ de metil jasmonato, após 35-40 dias de inoculação (SIVAKUMAR; PAEK, 2005). A produção de aloe-alodina e crisofanol foi notadamente aumentada pela adição de ácido salicílico em meio MS suplementado com $1,48 \mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB em cultura de raízes de *Aloe vera* (LEE et al., 2013).

Devido ao grande potencial demonstrado pelas culturas de raízes tanto na produção de biomassa, como para a síntese e acúmulo de metabólitos *in vitro*, esses sistemas têm despertado um grande interesse em sua exploração nos estudos fitoquímicos.

1.4 Metabólitos secundários

A produção de metabólitos secundários ou especiais nas plantas é resultado de processos bioquímicos regulados e inter-relacionados, consequência da integração de processos de biossíntese, transporte, acumulação e degradação. Por muito tempo, estes metabólitos foram considerados produtos de dejetos não funcionais do metabolismo primário vegetal (SANTOS, 2004). Estas substâncias não possuem ação direta nas reações metabólicas primárias, como respiração, fotossíntese e síntese proteica (FUMAGALI et al., 2008; RAVEN et al. 2007; TAIZ; ZEIGER, 2004). Contudo, os metabólitos secundários estão diretamente relacionados à adaptação das plantas ao seu ambiente natural.

Defesas estruturais como os tricomas glandulares, que produzem óleos essenciais, conferem a algumas plantas proteção física e química contra o ataque de patógenos e herbívoros. Algumas plantas são capazes de produzir substâncias que inibem a digestão de herbívoros, como, por exemplo, a celulose, ligninas e taninos. Além da defesa contra predadores, as plantas desenvolveram ao longo da evolução, metabólitos com papel na atração de polinizadores e dispersores de sementes, importantes para reprodução e perpetuação das espécies. Outras funções de várias substâncias classificadas como metabólitos secundários são a proteção contra raios UV e a alelopatia (DELBONE; LANDO, 2010).

O metabolismo secundário origina classes de substâncias restritas a uma espécie ou a um grupo de espécies relacionadas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010). Quando comparados com os produtos do metabolismo primário, são definidos por sua baixa abundância, representando cerca de 1% do carbono total, sendo restritos à estocagem em células ou órgãos específicos (BOURGAUD et al., 2001).

Os tecidos que acumulam uma dada substância precisam conter os precursores dos metabólitos desta, além de enzimas capazes de convertê-la em um produto e de estruturas onde o mesmo será armazenado. Em diversas espécies, o órgão onde a biossíntese do metabólito secundário ocorre não é o mesmo onde este será armazenado. Devido a um sistema de transporte intracelular, a substância produzida pode ser estocada em toda a planta ou em diferentes órgãos (PLETSCHI, 1998; REZENDE; TERRONES; REZENDE, 2011).

Muitos metabólitos secundários hidrofílicos tendem a se acumular nos vacúolos das plantas, ainda que a maioria seja sintetizada no citoplasma, como são as antocianinas, pigmentos solúveis em água, sintetizadas no citosol e armazenadas nos vacúolos. Por outro lado, os metabólitos secundários com características lipofílicas são estocados em ductos de células mortas ou ainda podem se ligar aos componentes lipofílicos das membranas celulares, como ceras cuticulares ou lignina (WINK, 1990; XU et al. 2001). Grande parte destas biomoléculas, tais como antocianinas, flavonoides, quinonas, ligninas, terpenos, alcaloides e compostos nitrogenados, possuem aplicações comerciais como corantes, repelentes, fármacos, entre outros (BRIDGERS; CHINN; TRUONG, 2010; MAIA; MOORE, 2011; ZWENGER; BASU, 2008).

Os terpenos são substâncias formadas pela fusão de unidades isoprênicas (C_5H_8) de cinco carbonos, podendo se apresentar na forma de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e seus derivados oxigenados (terpenoides), representando uma classe de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural (ZHOU; DU; CHEN, 2014). A essa classe de metabólitos secundários são atribuídas diversas atividades medicinais como antinociceptiva, anticonvulsivante, antineoplásica e antimicrobiana (BUSTAMANTE et al., 2010; HUANG et al., 2012; LIMA, 2014; PASSOS et al., 2009).

Os compostos fenólicos são uma classe de metabólitos secundários bem diversificada, caracterizando-se por ter uma ou mais hidroxilas (polifenóis) ligadas a um anel benzênico (ARCHELA; ANTONIA, 2013). No grupo dos polifenóis destacam-se

os flavonoides, que incluem flavonois, flavonas, flavanonas, flavanas, antocianinas e isoflavonas (PETERSON; DWYER, 1998). Aos compostos fenólicos são atribuídas atividades medicinais como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e inibidora da agregação plaqueta (FORMICA; REGELSON, 1995), além de efeito vasodilatador e ações antialérgica, antimicrobiana, antiviral e antineoplásica (LOPES et al., 2000).

A extração de substâncias bioativas diretamente das plantas mantidas no ambiente natural torna-se viável quando é possível realizar o seu cultivo em larga escala. Entretanto, a baixa produção dos metabólitos associada ao crescimento lento de muitas espécies ainda é um fator limitante para a exploração comercial. Além disso, fatores como sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento da planta influenciam o conteúdo de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A síntese química torna-se uma alternativa a essa limitação, contudo só é economicamente viável quando a substância de interesse possui uma estrutura simples, com nenhum ou poucos centros quirais¹, o que não é o caso de muitos produtos naturais (PLETSCHI, 1998). Neste contexto, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos vegetais viabiliza a produção e modulação de muitas substâncias bioativas de maneira sustentável e financeiramente executável, com destaque para as culturas de raízes *in vitro* (FLORES; VIVANCO; LOYOLA-VARGAS, 1999; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

1.5 Técnicas de cromatografia aplicadas aos estudos com plantas medicinais

Diversas espécies vegetais têm sido utilizadas como fonte de substâncias bioativas, no entanto apenas uma pequena porcentagem já foi estudada quanto à sua composição química. Estudos fitoquímicos têm sido realizados com o intuito de conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais, isolar e avaliar atividades biológicas de substâncias de interesse comercial ou medicinal, contribuindo desta forma

¹ Átomo que se encontra ligado a quatro átomos ou grupos atômicos diferentes. Na maioria das vezes este átomo é o átomo de carbono e, neste caso, o centro quiral é carbono assimétrico ou carbono quiral.

com a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (PEREIRA; FERREIRA, 2011; SIMÃO et al., 2012).

Para a realização dos estudos de detecção e identificação de substâncias bioativas presentes nas plantas, inicialmente é necessário o preparo dos extratos. Geralmente o material é submetido à secagem a temperaturas inferiores a 60°C e moagem, procedimento bastante empregado para reduzir o material vegetal a pequenos fragmentos, a fim de aumentar a superfície de contato com o solvente extrator (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A seguir, o material é submetido a sucessivas extrações com solventes de polaridade crescente (extração fracionada), obtendo-se, desta forma, as diferentes frações (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Em função da grande diversidade química que as plantas apresentam torna-se de grande relevância o desenvolvimento de métodos que permitam a separação e identificação das substâncias bioativas presentes nos extratos vegetais e/ou em suas frações. Neste sentido, destacam-se as técnicas cromatográficas. A cromatografia é um método físico-químico de separação (cromatografia analítica) e isolamento (cromatografia preparativa), mas também empregado na identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas. A técnica é fundamentada na separação de misturas pela migração diferencial dos seus componentes devido a interações entre duas fases imiscíveis, a fase estacionária (líquida ou sólida), a qual pode encontrar-se em coluna ou em uma superfície plana, e a fase móvel (líquida ou gasosa) (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Dentre as técnicas de cromatografia, destacam-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia em Fase Gasosa e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A Cromatografia em Camada Delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial de uma fase móvel líquida (constituída por uma mistura de solventes retida em um recipiente ou cuba transparente e inerte, usualmente de vidro), sobre uma camada delgada de adsorvente retido em uma superfície plana (constituída de vidro, alumina ou poliéster). Na cuba é depositada a cromatoplaça, que pode ser de vidro, plástico ou alumina. Os adsorventes mais utilizados para compor a fase estacionária são sílica e alumina, mas também podem ser empregados celulose, poliamida e silicato de magnésio. Durante o desenvolvimento da

cromatografia os componentes da mistura são separados e ao fim do processo, após a evaporação dos solventes, as manchas são reveladas. Os métodos de revelação podem ser físicos (luz UV - 254 a 366 nm), utilizados quando as substâncias excitadas por luz se tornam fluorescentes ou químicos, que compreendem os reagentes cromógenos. Por fim, a observação das classes químicas é baseada na posição final de cada mancha, designada pelo R_f (fator de retenção), que se refere à distância atingida pela mancha a partir da origem/distância percorrida pelo solvente desde a origem (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

De acordo com Marston (2007), a CCD é uma técnica cromatográfica que permite a análise visual dos resultados. Além disso, permite que todos os componentes de uma amostra sejam incluídos em um mesmo cromatograma. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a CCD uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação, sendo uma das mais empregadas no controle da qualidade de plantas medicinais devido à simplicidade, rapidez, praticidade e baixo custo (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A Cromatografia em Fase Gasosa (CG) possui alta resolução e torna-se bastante interessante devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas (10^{-9} - 10^{-12} g). A CG é baseada na separação dos componentes de uma mistura entre duas fases não miscíveis, na qual a fase móvel é um gás de arraste que se move através da fase estacionária líquida retida em uma coluna. A separação em CG pode ocorrer por adsorção, distribuição de massa ou exclusão por tamanho. A limitação da técnica consiste na restrição de amostras que se volatilizam sob as temperaturas utilizadas. É empregada para identificação, testes de pureza e determinação quantitativa. Após sair da coluna, a amostra passa por um detector, que sinaliza a quantidade de cada substância presente. Dentre os detectores, destaca-se o detector por ionização de chama (DIC ou FID), sensível à maioria das substâncias. O detector FID é usualmente empregado em análises de hidrocarbonetos, devido à sua seletividade às ligações C-H. Contudo apresenta poucas respostas na análise de compostos caracterizados por grupamentos carbonila, carboxila, hidroxila. O espectrômetro de massa também é bastante empregado como detector em cromatografia gasosa (Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas/CG-EM), possibilitando a identificação instantânea de diferentes substâncias em uma amostra (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Análises em CG-EM permitiram a identificação e quantificação de vinte e dois produtos de hidrólise de glicosinolatos, metabólitos com atividade antineoplásica, a partir de sementes e folhas de *Farsetia aegyptia* (AL-GENDY; LOCKWOOD, 2003). Esta técnica cromatográfica também tem sido utilizada na identificação e quantificação de metabólitos em culturas *in vitro* de raízes transformadas de diversas espécies, como na identificação da presença de artemisinina em culturas de *Artemisia annua* (JAZIR et al., 1995), de resveratrol em *Arachis hypogaea* (MEDINA-BOLIVAR et al., 2007) e de diversos alcaloides em culturas de *Datura stramonium* (BERKOV et al., 2003).

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se baseia na separação dos componentes de uma amostra entre duas fases imiscíveis, a fase móvel líquida e a fase estacionária sólida retida em uma coluna de forma cilíndrica. A fase estacionária é formada por partículas (3 a 10 μm) que conferem resistência ao fluxo gerado pela fase móvel, a qual flui através da coluna cromatográfica. O suporte cromatográfico mais utilizado é a sílica, por ter alta estabilidade mecânica e térmica, rigidez e proporcionar grande eficiência nas separações. O grande número de possíveis fases estacionárias torna a CLAE uma técnica bastante versátil, por possibilitar análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Os detectores mais comuns em CLAE são os espectrofotométricos (UV/Vis), aplicados para detectar substâncias cromóforas. Para medir a massa molar de uma molécula são empregados os detectores de espectrometria de massas, que devido à sua alta seletividade permitem isolar os picos e monitorar seus valores de massa. São também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, eletroquímicos e outros. O sistema cromatográfico é controlado por *softwares*, que além de proporcionar maior operacionalidade e logística nas análises, recebe e envia informações para o detector. As separações podem ocorrer por adsorção, partição ou ambos (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A CLAE é a técnica capaz de separar moléculas solúveis em água, termolábeis e não voláteis com rapidez, precisão e alta resolução, sendo uma ferramenta muito utilizada em química analítica (MARSTON, 2007).

As técnicas cromatográficas aplicadas na investigação fitoquímica de espécies vegetais também têm contribuído em estudos que visam avaliar a fidelidade de formulações. Estudos constataram a presença de princípios ativos de baixa qualidade no antimalárico primaquina, em toda a Papua Nova Guiné. Através de ensaios por CLAE

foi possível constatar que a má qualidade deste medicamento refletiam a falta de controle de qualidade e de mecanismos de regulação da droga, fazendo necessária uma pré-qualificação pela Organização Mundial de Saúde (HETZEL et al., 2014). O controle de qualidade de formulações dos derivados de artemisinina (ATRs), medicamento antimalárico muito visado por falsificadores, tem sido realizada com o auxílio de diferentes técnicas de cromatografia, com destaque para a CCD (MARTINO et al., 2010). Com objetivo de pesquisar as substâncias bioativas presentes em medicamentos tradicionais chineses, um estudo revelou, através de análise por CG-MS, que é possível rastrear rapidamente os princípios ativos nessas formulações que interagem com as células-alvo (ZHANG et al., 2007).

1.6 Gênero *Cleome*

O gênero *Cleome* compreende mais de 200 espécies, entre as quais estão herbáceas anuais, arbustos e, raramente, lianas, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, com poucas espécies de zonas temperadas (HEYWOOD et al. 2007 apud ILTIS; COCHRANE, 2007; RAGHAVAN, 1993 apud APARADH; KARADGE, 2012; PEREIRA et al., 2011).

Devido à mudança na interpretação da filogenia do grupo com base em estudos moleculares, o gênero, anteriormente inserido na família Capparaceae, foi reagrupado na família Cleomaceae (ILTIS et al., 2011; MINGLI; TUCKER, 1999). 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 *Cleome* são usadas na medicina tradicional (Quadro 1), o que tem despertado o seu interesse em estudos farmacológicos, já tendo sido identificadas diversas atividades como anti-inflamatória (NARENDHIRAKANNAN et al., 2005a; SIMÕES et al., 2006), antioxidante (NARENDHIRAKANNAN et al., 2005b; SIMÕES et al., 2006), antimicrobiana (SUDHAKAR et al., 2006, MCNEIL et

al., 2010), antineoplásica (NAGAYA et al., 1997, BALA et al., 2011) e analgésica (PARIMALADEVI; BOOMINATHAN; MANDAL, 2003).

Além das avaliações farmacológicas, diversos estudos fitoquímicos com espécies do gênero resultaram no isolamento e identificação de muitas substâncias de interesse econômico, com destaque para aquelas com aplicação medicinal (Quadro 2).

No entanto, apesar de o grande número de pesquisas farmacológicas e fitoquímicas, há poucos relatos sobre estudos biotecnológicos com espécies do gênero *Cleome*. Os primeiros estudos foram realizados com as espécies *C. viscosa* (NASEEM; JHA, 1994) e *C. gynandra* (NASEEM; JHA, 1997), com o estabelecimento de protocolos para a produção de calos organogênicos. Culturas de calos e de células em suspensão obtidas a partir de *C. chelidonii* foram avaliadas quanto à presença de produtos derivados da hidrólise de glicosinolatos (SONGSAK; LOCKWOOD, 2004). Estudos realizados no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV/UERJ) com a espécie *C. rosea* resultaram no estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro* pela via organogênica, utilizando explantes caulinares inoculados em meios de cultura solidificados (SIMÕES et al., 2004) e em meios líquidos (SIMÕES et al., 2009a), assim como por explantes radiculares inoculados em meios solidificados (SIMÕES et al., 2009a). A propagação também foi alcançada por embriogênese somática (SIMÕES et al., 2010a). A partir de *C. rosea* também foram estabelecidos protocolos para a produção de calos e culturas em suspensão, sendo obtidas linhagens celulares produtoras de pigmentos antociânicos (SIMÕES et al., 2010b; SIMÕES-GURGEL et al., 2011). A experiência com esta espécie foi aplicada pelo grupo nos estudos de outras espécies do gênero, como *C. spinosa* e *C. dendroides*.

Quadro 1– Espécies do gênero *Cleome* utilizadas na medicina popular

| Espécie | Parte usada | Extrato/ Preparo | Uso medicinal | Referência |
|------------------------|--------------------|-------------------------|---|--|
| <i>C. aculeata</i> | Planta inteira | Chá | Diabetes, colesterol , hipertensão | Coelho-Ferreira, 2009 |
| <i>C. affinis</i> | – | – | Anti-inflamatório | Pinto, Amorozo e Furlan, 2006 |
| <i>C. africana</i> | – | – | Reumatismo e inflamação | Nagaya et al.,1997 |
| <i>C. brachycarpa</i> | – | – | Reumatismo e inflamação | Ahmad et al., 1990 |
| <i>C. gynandra</i> | Sementes | Pó | Hemorragias | Das et al.,1999 |
| | – | Óleo | Dermatites | Das et al.,1999 |
| | Folhas | Sumo | Dermatites e otites | Aparadh, Mahamuni e Karadge, 2012 |
| | Folhas | Sumo | Dor de dente | Hebbaret al., 2004 |
| <i>C. latifolia</i> | Raízes | Xarope | Gripe, tosse, congestão | Coelho-Ferreira, 2009 |
| <i>C. rutidosperma</i> | Planta inteira | – | Convulsões e dermatites | Edeogaet al., 2009 |
| <i>C. spinosa</i> | Raízes | Garrafada | Doenças do aparelho genital feminino | Coelho-Ferreira, 2009 |
| | Folhas | Maceração | Rubefaciante | Leal et al., 2007 |
| | Folhas | Chá | Estimulação do aparelho digestivo e gastroprotetor | |
| | Folhas | Sumo | Otites supuradas | |
| | Planta inteira | – | Ação digestiva e cicatrizante | Cabral e Agra, 1998; Agra, Freitas e Barbosa-Filho 2007 |
| <i>C. viscosa</i> | – | – | Anti-helmíntico, laxativo e anti-convulsivo | Ray e Chattopadhyay, 1980 |
| | – | – | Febre, inflamações, doenças do fígado, bronquite, diarreia, convulsões infantil | Devi, Boominathan e Mandal, 2003; Parimaladevi, Boominathan e Mandal, 2003 |

Quadro 3 – Substâncias bioativas isoladas e identificadas em espécies do gênero *Cleome*

| Grupos de metabólitos | Espécie | Parte onde é encontrada | Referência |
|---|------------------------|--------------------------------|---|
| Alcaloides | <i>C. chelidonii</i> | Parte aérea e raízes | Rao et al., 2011 |
| | <i>C. gynandra</i> | Folhas | Annadurai e Ahmed, 2014 |
| | <i>C. rutidosperma</i> | Folhas | Edeoga, Okwu e Mbaebie, 2005 |
| | <i>C. viscosa</i> | Folhas | Jane e Patil, 2012 |
| Compostos fenólicos | <i>C. hassleriana</i> | Flor | Jordheimet al.,2009 |
| | <i>C. gynandra</i> | Parte aérea | Bala et al.,2011 |
| | <i>C. viscosa</i> | Caule e folhas | Gupta, Sharma e Rao, 2011 |
| | | Semente | Ray et al.,1980 |
| Terpenos | <i>C. burmanni</i> | Parte aérea | Pillai e Nair, 2013 |
| | <i>C. droserifolia</i> | Planta inteira | El-Askary, 2005 |
| | <i>C. gynandra</i> | Caule | Annadurai e Ahmed, 2014 |
| | <i>C. rutidosperma</i> | Parte aérea | Rahman, Munira e Hossain, 2008 |
| | <i>C. spinosa</i> | Folhas | Suga et al.,1975 |
| | <i>C. viscosa</i> | Parte aérea | Niraimathi, Karunanithi e Brindha, 2012 |
| Glicosídeos sulfurados (isotiocianatos e glicosinolatos) | <i>C. chelidonii</i> | Sementes | Songsak e Lockwood, 2002 |
| | <i>C. chrysantha</i> | Sementes e folhas | Hashem e Wahba, 2000 |
| | <i>C. spinosa</i> | Sementes | Kjaer e Gmelin, 1956; Kjaer e Thomsen, 1962 |
| | | Folhas | Griffithset al.,2001 |

1.6.1 *Cleome spinosa* Jacq.

Cleome spinosa Jacq., conhecida popularmente como mussambê de espinho ou mussambê branco (Figura 1), é uma espécie herbácea encontrada desde o México até a América do Sul e África (ILTIS, 1967). No Brasil, principalmente no Nordeste, a espécie é utilizada na medicina popular (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; BRASILEIRO; CASTRO; AMARAL, 2008; TEIXEIRA; MELO, 2006).

Figura 1 – Aspecto da inflorescência de *Cleome spinosa*



Fonte: BARBOSA, 2013.

Análises fitoquímicas feitas com extratos lipofílicos e hidrofílicos da parte aérea *C. spinosa* resultaram na identificação de alcaloides, catequinas, flavonas, flavonóis, dos flavonoides leucocianidina e chalcona e de saponinas (LEAL, 2007). A avaliação

fitoquímica de suas sementes permitiu o isolamento e a identificação dos glicosinolatos glicocaparina e glicocleomina (KJAER; GMELIN, 1956; KJAER; THOMSEN, 1962).

Estudos biotecnológicos com *C. spinosa* têm sido realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), integrante do NBV/UERJ. Esses estudos resultaram no estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro* da espécie a partir de segmentos caulinares cultivados em meio de cultura MS suplementado com a combinação de AIA e BAP (ALBARELLO et al., 2006). Calos produtores de β -caroteno foram obtidos a partir do cultivo de segmentos caulinares de plantas propagadas *in vitro* em meio MS suplementado com as auxinas picloram ou 2,4-diclorofenoxiacético (ALBARELLO et al., 2007). Além do estabelecimento de protocolos de cultura de tecidos, foi realizada a avaliação do potencial medicinal de plantas *in vivo* e de materiais obtidos *in vitro* com resultados positivos para as atividades anti-inflamatória e analgésica (ALBARELLO et al., 2013).

Em função dos resultados favoráveis alcançados nos estudos biotecnológicos e nas atividades farmacológicas identificadas nos materiais obtidos *in vitro*, torna-se relevante o estabelecimento de estratégias *in vitro*, visando aumentar o potencial de exploração da espécie, utilizando a cultura comercial, como as culturas de raízes, associadas à avaliação da produção de metabólitos secundários.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Definir um protocolo de produção de raízes *in vitro* para a espécie *Cleome spinosa* e avaliar a produção de metabólitos secundários nesse sistema, em comparação com plantas a campo e plantas produzidas *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de produção *in vitro* de raízes a partir de diferentes fontes de explantes (plantas propagadas *in vitro* e plantas oriundas do processo de germinação *in vitro*);
- Avaliar a influência de diferentes fitorreguladores sobre a indução e a multiplicação *in vitro* de raízes;
- Determinar a influência de fatores físicos e químicos (luminosidade, tamanho dos explantes, fonte de carbono e concentração de sais minerais do meio de cultura) sobre a indução e a multiplicação *in vitro* de raízes;
- Caracterizar o perfil fitoquímico de raízes oriundas de plantas coletadas em campo e de plantas propagadas *in vitro*, assim como culturas de raízes, utilizando diferentes técnicas cromatográficas.

3 METODOLOGIA

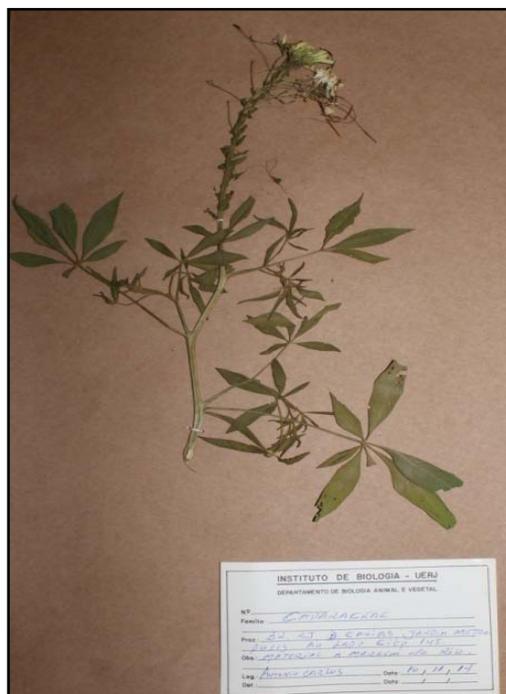
3.1 Material botânico

3.1.1 Propagação *in vitro*

Como fonte de explantes radiculares foram utilizadas plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* (ALBARELLO et al., 2006) mantidas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 8 g.L⁻¹ de ágar e sem adição de reguladores de crescimento (MS0). A manutenção deste estoque de plantas, que vêm sendo mantidas por cerca de dez anos, foi realizada pelo subcultivo de segmentos de caule com cerca de 2 - 3 cm para meio fresco de igual composição a cada 30 dias. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a temperatura de 26 ± 2 °C e sob fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 45 μmol m⁻²s⁻¹.

As plantas de campo, a partir das quais foram retiradas as sementes utilizadas para o início dos estudos *in vitro*, foram coletadas em área pública no bairro de Jacarepaguá, na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro (22°57'18.20"S e 43°21'37.97" O). Um exemplar representativo de plantas de campo, fontes iniciais de explantes para a propagação *in vitro*, encontra-se depositado no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob o número de registro HRJ 7639 (Figura 2).

Figura 2 – Exsicata de *C. spinosa*



Nota: Depósito no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ).

3.1.2 Germinação *in vitro*

Sementes de *C. spinosa* coletadas na região de Jacarepaguá foram desinfestadas utilizando protocolo previamente estabelecido para a espécie (ALBARELLO et al. 2006). As sementes foram imersas em solução de detergente comercial neutro diluído em água (1:10) por cinco minutos, seguido por lavagem em água corrente. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% com Tween 80 (0,05% v/v) por 20 minutos, sob agitação. Em seguida foram submetidas a três lavagens com água destilada estéril por cinco minutos, sob agitação. Após a remoção do excesso de água com papel de filtro estéril, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro (11 x 5 cm) contendo 30 mL de meio MS0. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121° C por 15 min) e o meio foi solidificado com 8 g.L⁻¹ de ágar (Merck). Foram inoculadas quatro

sementes por frasco, que foram mantidos em germinadores de câmara vertical tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*, EletroLab®) sob regime de 16 horas luz à temperatura de 30°C e 8 horas de escuro à temperatura de 20 °C.

Após o início do desenvolvimento das plântulas (cerca de 3 - 4 meses), caracterizado pelo alongamento do hipocótilo, os frascos foram transferidos para câmara de crescimento, sendo mantidos sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Plântulas com cerca de 60 dias após a transferência para a câmara de crescimento foram usadas como fonte de explantes radiculares.

Em função da baixa porcentagem de germinação e do longo período de tempo para a obtenção das plântulas, protocolos de pré-tratamentos germinativos foram avaliados visando otimizar o processo. Os protocolos descritos no Quadro 3 foram baseados em estudos realizados com a espécie *C. gynandra* (EKPONG, 2009). Após serem submetidas aos pré-tratamentos, as sementes foram desinfestadas conforme descrito anteriormente.

Quadro 4 – Pré-tratamentos germinativos realizados com sementes de *C. spinosa*

| Tipo de Tratamento |
|--|
| Embebição em água destilada por duas horas |
| Embebição em água destilada por 12 horas |
| Escarificação mecânica com lixa. |
| Escarificação mecânica com lixa seguida de embebição em água destilada por duas horas. |
| Escarificação mecânica com lixa seguida de embebição em água destilada por 12 horas |
| Manutenção das sementes a 40°C por 24 horas |

Também foi avaliada a desinfestação com menores concentrações de NaClO, além do uso de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como agente desinfestante, segundo metodologia descrita por Drechsel e Baldani (2006), com modificações. Para esses novos protocolos, envolvendo a alteração na concentração do NaClO ou o uso de H_2O_2 , foram associados os pré-tratamentos germinativos que se mostraram mais eficientes (escarificação seguida de embebição em água destilada por duas horas). As sementes,

após escarificação e embebição, foram imersas em solução de detergente comercial neutro diluído em água (1:10) por cinco minutos, seguido por lavagem em água corrente. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas em solução de hipoclorito (0,5 e 1%) por 10 minutos ou em solução de peróxido de hidrogênio (3%) por 2 minutos, sob agitação. Em seguida foram submetidas a três lavagens com água destilada estéril por cinco minutos, sob agitação e inoculadas em meio MS0. Os frascos foram mantidos em BOD (EletroLab®) sob regime de 16 horas luz à temperatura de 30 °C e 8 horas de escuro à temperatura de 20°C ou mantidos em câmara de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e sob fotoperíodo de 16 h.

3.2 Estabelecimento das culturas de raízes

3.2.1 Culturas a partir de segmentos radiculares de plantas propagadas *in vitro*

As culturas de raízes foram iniciadas a partir de segmentos radiculares de 0,5 cm de comprimento desprovidos de raízes laterais. Os explantes foram inoculados em frascos erlenmeyer (50 mL), contendo 20 mL de meio de cultura MS líquido enriquecido com 30 g.L^{-1} de sacarose e suplementado com diferentes concentrações das auxinas ácido naftaleno acético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido indolacético (AIA), nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 mg.L^{-1} . Culturas mantidas em meio MS0 foram utilizadas como controle. Os frascos foram vedados com folha dupla de papel alumínio e mantidos em câmara de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sob agitação em mesas giratórias orbitais (New Brunswick) a 100 rpm. A influência da luz sobre a multiplicação das raízes foi determinada a partir da manutenção das culturas sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, gerada por lâmpadas fluorescentes brancas, ou pela manutenção das culturas no escuro.

Para avaliar a influência do tamanho dos explantes na resposta morfogênica, segmentos radiculares de 0,5 e de 1,0 cm foram inoculados em meio MS líquido suplementado com AIB ou AIA nas concentrações de 3,0 e 5,0 mg.L^{-1} . As culturas foram mantidas na luz ou no escuro.

A fim de avaliar a influência da fonte de carbono fornecida ao meio de cultura sobre a multiplicação das raízes *in vitro*, segmentos radiculares de 0,5 cm foram inoculados em meio MS líquido enriquecido com 3% de sorbitol em substituição à sacarose ou com a associação de 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitol. Os meios foram suplementados com diferentes auxinas (ANA, AIB ou AIA) na menor concentração utilizada nos ensaios anteriores (0,5 mg.L⁻¹). As culturas foram mantidas na presença de luz ou no escuro.

A associação de auxinas e citocininas na suplementação hormonal do meio de cultura foi avaliada pelo cultivo de segmentos de raízes com 0,5 e 1,0 cm em meio MS líquido suplementado com as auxinas AIB ou AIA na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ em associação com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP. Nestes ensaios foram avaliados três diferentes tratamentos. Os explantes foram mantidos em meio com a associação auxina:citocinina por cinco dias (T1) ou dez dias (T2), sendo a seguir transferidos para meio contendo apenas a auxina. Após o período de exposição ao BAP, os explantes foram lavados em água destilada estéril antes de serem transferidos para meio sem a citocinina. No terceiro tratamento, os explantes permaneceram em meio de cultura contendo a associação auxina:citocinina por todos os 45 dias do experimento (T3). Nestes experimentos as culturas foram mantidas na presença de luz (fotoperíodo de 16 h).

O efeito da concentração total de sais minerais do meio MS sobre a multiplicação das raízes foi avaliado pelo cultivo de explantes radiculares com 1,0 cm em meio MS líquido contendo $\frac{1}{2}$ (MS^{1/2}) ou $\frac{1}{4}$ (MS^{1/4}) da concentração total de sais. Os meios foram suplementados com AIB ou AIA na concentração de 1,0 mg.L⁻¹. As culturas foram mantidas na presença de luz.

Após 45 dias em cultura, o acúmulo de biomassa fresca e biomassa seca das raízes foi avaliado em balança de precisão (Shimatizu AUY220). Para a determinação do peso de matéria seca, as raízes foram mantidas em estufa a 45°C, até peso constante (cerca de 30 h). O acúmulo de biomassa foi calculado pela diferença entre o peso final e o peso inicial. A determinação dos valores iniciais de biomassa foi realizada pela aferição do peso fresco (PF) e peso seco (PS) de 15 amostras de cinco explantes nos tamanhos usados para o início das culturas. A capacidade de multiplicação *in vitro* dos explantes radiculares também foi avaliada em culturas estabelecidas em meio MS solidificado (8 g.L⁻¹ de ágar). Explantes radiculares de 0,5 cm ou 1,0 cm foram inoculados em placas de Petri (100x20 mm) contendo 20 mL de meio enriquecido com

30 g.L⁻¹ de sacarose e suplementado com AIA nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 mg.L⁻¹. As placas foram mantidas na presença ou ausência de luz em câmara de crescimento nas mesmas condições físicas descritas anteriormente.

3.2.2 Culturas a partir de segmentos radiculares de plantas oriundas de germinação *in vitro*

Com base nos resultados obtidos nos ensaios com explantes de plantas propagadas *in vitro*, plântulas obtidas a partir da germinação de sementes, sob condições *in vitro*, também foram avaliadas como fonte de explantes. As culturas foram iniciadas a partir de segmentos radiculares de 0,5 e 1,0 cm de comprimento, desprovidos de raízes laterais. Os explantes foram inoculados em frascos erlenmeyer (50 mL), contendo 20 mL de meio de cultura MS líquido enriquecido com 30 g.L⁻¹ de sacarose e suplementado com AIB e AIA em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 3,0; 5,0 mg.L⁻¹). Culturas mantidas em meio MS0 foram utilizadas como controle. Os frascos foram vedados com folha dupla de papel alumínio e mantidos em câmara de crescimento a 26 ± 2 °C, sob agitação (100 rpm), na presença de luz ou no escuro conforme já descrito anteriormente.

Para avaliar a manutenção da capacidade de multiplicação *in vitro* das raízes ao longo do tempo, culturas estabelecidas nas condições que resultaram em maiores valores de acúmulo de biomassa foram acompanhadas por três a quatro subculturas. As subculturas foram realizadas a cada 45 dias, para meio fresco de igual composição. Também foi avaliado o efeito do aumento do tempo em cultivo para 60 dias (cultura e subculturas) na capacidade de multiplicação das raízes. A cada subcultura, cinco segmentos radiculares desprovidos de raízes laterais, foram utilizados para dar início às novas culturas. O acúmulo de biomassa foi avaliado a cada subcultura pela aferição de PF e PS.

3.3 Delineamento experimental

Nos estudos de germinação *in vitro* foi utilizado um número amostral de 20 sementes por tratamento. Foram inoculadas quatro sementes por frasco em um total de cinco frascos por tratamento para cada condição de cultura avaliada. Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo a porcentagem de germinação contabilizada durante 30 dias após a inoculação.

Nos ensaios de multiplicação de raízes em meio líquido foi utilizado um número amostral de 25 explantes por tratamento. Foram inoculados cinco explantes por frasco erlenmeyer, em um total de cinco repetições por tratamento. Nos ensaios utilizando meio sólido, foi utilizado um número amostral de 30 explantes por tratamento, sendo inoculados 10 explantes por placa de Petri, em um total de três repetições por tratamento. Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo avaliado após 45 dias em cultura o acúmulo de biomassa pela aferição de PF e PS.

Os dados referentes ao acúmulo de biomassa nas culturas de raízes 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 6

3.4 Estudos fitoquímicos

Para os estudos fitoquímicos foram utilizadas raízes de plantas coletadas em campo e de plantas propagadas *in vitro*, assim como culturas de raízes estabelecidas a partir do protocolo selecionado como o mais eficiente para o acúmulo de biomassa, mantidas por 45 e 60 dias em cultivo.

3.4.1 Preparo dos extratos

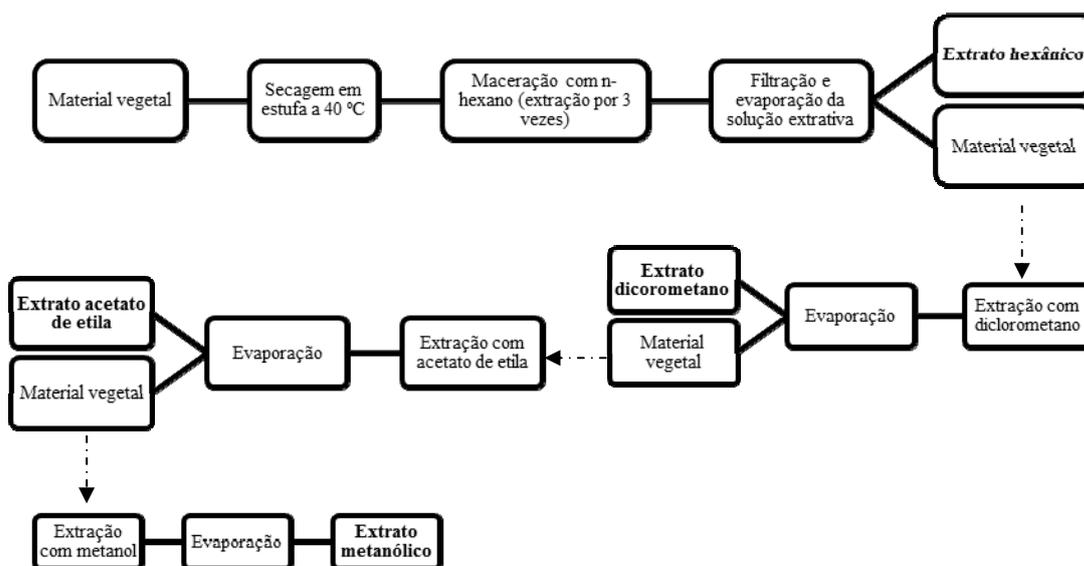
As amostras foram pesadas para aferição do peso fresco e em seguida dessecadas em estufa a 40 °C por cerca de 30 horas, até atingir peso constante (Tabela 1). O material foi triturado em moinho (Splabor®), armazenado em frascos erlenmeyer vedados e mantidos em temperatura ambiente (20-30 °C). Posteriormente foi submetido à extração por maceração com sistema de solventes de polaridade crescente (OLIVEIRA et al., 2010): n-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (Vetec®) (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010). Em função da pequena quantidade de material optou-se por realizar a extração com diferentes solventes para garantir a extração completa do material vegetal. Para cada solvente foram realizadas três extrações (Figura 3), utilizando um volume de 10 a 50 vezes, dependendo da massa da amostra (m/v). O volume de solvente utilizado foi o mesmo em cada extração.

Na extração com n-hexano o material foi filtrado após 96 horas e mais duas extrações foram realizadas, com intervalo de 48 horas entre cada filtração. Para os demais solventes foram feitas três extrações com intervalo de 48 horas. Após as três extrações com cada solvente, o material vegetal foi transferido para frascos erlenmeyer mantidos em capela de exaustão por cerca de 70 horas para que o resíduo de solvente fosse evaporado. Este procedimento foi repetido para cada solvente utilizado.

A cada extração o material foi filtrado e submetido à evaporação em evaporador rotativo (Marconi® e Fisatom®) em temperatura de 30 °C e 45 °C, de acordo com o solvente. Posteriormente, o resíduo de cada balão foi ressolubilizado em seu respectivo solvente extrator e transferido para frasco de vidro âmbar, colocado em dessecador contendo sílica gel (Vetec®) e mantido no escuro. Após a evaporação do solvente, obtiveram-se os respectivos extratos em hexano, em diclorometano, em acetato de etila e em metanol.

Tabela1 – Biomassa fresca e seca das amostras e rendimento dos extratos de *C. spinosa*

| Material vegetal (g) | | | | |
|-----------------------------|--------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Raiz a campo | Raiz <i>in vitro</i> | Cultura de 45 dias | Cultura de 60 dias |
| Peso fresco | 170,65 | 7,0685 | 43,175 | 30,7571 |
| Peso seco | 81,74 | 1,0471 | 4,0729 | 4,4389 |
| Rendimento dos extratos (g) | | | | |
| Solvente | Raiz a campo | Raiz <i>in vitro</i> | Cultura de raízes (45 dias) | Cultura de raízes (60 dias) |
| n-hexano | 0,8473 | 0,5888 | 0,467 | 0,333 |
| diclorometano | 0,5667 | 0,682 | 0,311 | 0,304 |
| acetato de etila | 0,397 | 0,021 | 0,022 | 0,018 |
| metanol | 1,9534 | 0,661 | 0,648 | 0,522 |

Figura 3 – Metodologia de extração aplicada às raízes de *Cleome spinosa*

3.4.2 Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a determinação do perfil fitoquímico por CCD, as análises seguiram a metodologia proposta por Wagner e Bladt (2001). Os extratos obtidos foram submetidos à prospecção fitoquímica com sistema de polaridade crescente em placas para CCD ALUGRAM® Xtra SIL G/ UV_{254nm}10x10cm, espessura de 0,20mm (Macharey-Nagel®). As amostras dos extratos foram aplicadas nas placas em bandas com o auxílio de um tubo capilar, utilizando como fase móvel hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Iniciou-se com hexano 100%, seguido de hexano: diclorometano (90: 10), hexano: diclorometano (80: 20), até a concentração de diclorometano a 100%. O mesmo procedimento foi realizado para o acetato de etila e metanol, nesta ordem. Todas as proporções de solventes foram preparadas volume/volume (mL).

Para o desenvolvimento dos cromatogramas por CCD as placas foram eluídas em cuba cromatográfica de vidro, de acordo com as proporções anteriormente descritas. O sistema foi mantido fechado, para que ocorresse uma eficiente separação dos componentes da mistura. Quando o solvente atingiu o limite pré-determinado, as placas foram retiradas da cuba com auxílio de pinça e transferidas para capela de exaustão a fim de evaporar o solvente residual. A cada troca de fase móvel, a cuba foi lavada com etanol absoluto e seco em temperatura ambiente.

Os reveladores utilizados foram a vanilina sulfúrica (solução de vanilina a 1 % em etanol seguida de solução de ácido sulfúrico a 10% em etanol) e o NP/ PEG (solução de difenilboriloxietilamina a 1 % em metanol seguida de solução de polietilenoglicol 4000 a 1% em metanol), aplicados com uso de frasco borrifador. As placas reveladas com vanilina sulfúrica foram submetidas a aquecimento em placa aquecedora a 100 °C por cerca de 5 minutos até o surgimento de bandas coloridas e observadas no visível e as reveladas com NP/ PEG foram observadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 365nm na câmara de ultravioleta (UVtrans UV-15LC).

3.4.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplada à espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (CLAE-UV-EM-IES)

Os extratos polares obtidos com acetato de etila e metanol foram submetidos a uma análise prévia em cromatografia líquida de alta eficiência com detector *photodiode array* (Ultimate 3000 Dionex) em coluna thermo-scientific RP18 (250mm x 4,6mm com partícula de 5 Å) a fim de estabelecer uma condição de separação cromatográfica com solventes água ultrapura (MilliQ®), acidificada com ácido acético glacial, pH 3,0 (Sigma-Aldrich) e 0% de acetonitrila (Tedia®). As condições ideais de separação só foram obtidas para os extratos em acetato de etila (raiz de campo, raiz de planta propagada *in vitro* e culturas de raízes) que foram então submetidos à análise por CLAE-UV-EM-IES.

Para as análises por CLAE-UV-EM-IES o equipamento utilizado foi um UPLC Shimadzu composto por um desgaseificador (DEU20AS), duas bombas (LC20AD), injetor automático (SIL20AC), detector de UV de comprimento de onda fixo (SPD20A), forno (CTO20A) e interface (CSM20A). As amostras foram separadas utilizando uma coluna thermo-scientific RP18 (250 mm x 4,6mm com partícula de 5 Å). A eluição da fase móvel foi por gradiente do tipo rampa e teve início com 100% de água ultrapura (MilliQ®) acidificada com ácido acético glacial, pH 3,0 (Sigma-Aldrich) e 0% de acetonitrila (Tedia®) (0 – 120 min), 0% de água ultrapura acidificada e 100% de acetonitrila (120 – 126 min) e, ao fim dos 126 minutos, foi restabelecida a condição inicial. Após passagem pelo detector de UV com lâmpada fixa em 254 nm, a fase móvel seguiu para o detector do tipo espectrômetro de massas (MicrOTOF) e foi gaseificada por ionização *electrospray* a uma temperatura de 200 °C, fluxo de 9 µL/min e pressão de 4 psi. Os espectros de massas foram obtidos em modo negativo no intervalo massa/carga (m/z) de 50 a 3000. O gás empregado durante a dessolvatação foi o nitrogênio a um fluxo de 400L/h, submetido à temperatura de 250 °C. A energia de ionização foi de 10 eV, com análise de varredura de massas (EM). Para a análise, os espectros de massas das amostras de *C. spinosa* foram comparados aos dados disponíveis na base *MassBank* (HORAI et al., 2010).

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

3.4.4 Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Os extratos apolares obtidos com hexano e diclorometano foram avaliados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) utilizando um sistema cromatográfico automatizado SCION™ TQ GC-MS 456 com injetor automático e com coluna capilar Bruker BR-5ms (30 x 0,25mm, 95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil). A programação da temperatura empregada foi: temperatura inicial de 50 °C com aumento até 290 °C, numa razão de 3 °C/ min; o tempo final de análise foi de 80 minutos e mais 11 minutos para condicionamento do equipamento. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240 °C, sendo utilizado como gás de arraste o gás Hélio (1 cm³/ min). A identificação das substâncias foi sugerida pela comparação do perfil de fragmentação dos espectros de massas obtidos com aqueles da biblioteca eletrônica do equipamento (NIST 11 Mass Spectral Library).

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

4 RESULTADOS

4.1 Germinação *in vitro*

Devido às baixas porcentagens de germinação (20%) e ao longo tempo necessário para o início do processo (3 - 4 meses), observados com a aplicação do protocolo previamente estabelecido para sementes de *C. spinosa*, novos estudos foram realizados visando à otimização da germinação *in vitro*, permitindo, desta forma, a disponibilização de material botânico para o estabelecimento das culturas de raízes.

A aplicação de pré-tratamentos germinativos não resultou em aumento da porcentagem de germinação quando esses tratamentos foram utilizados nos ensaios com hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 2,5%. Este resultado foi observado mesmo quando o tempo de exposição foi reduzido para 10 minutos (Tabela 1). No entanto, quando as sementes sofreram escarificação mecânica com lixa seguida de embebição em água destilada por 12 horas, sem serem expostas ao NaClO, foram alcançadas porcentagens de germinação acima de 90% (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que o NaClO foi o fator limitante para a germinação da espécie sob *vitro*.

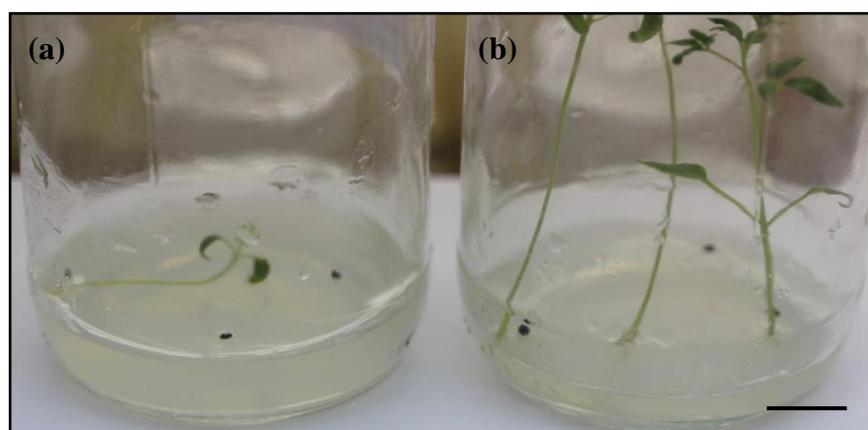
Em função do aumento da porcentagem de germinação verificada com o uso do pré-tratamento em associação com escarificação/embebição por 12 horas, optou-se por realizar os novos ensaios de germinação *in vitro* aplicando este pré-tratamento antes da desinfestação.

Sementes pré-tratadas e em seguida desinfestadas em solução de NaClO a 1% não alcançaram porcentagens de germinação superiores a 10%. Entretanto, quando a concentração do agente desinfestante foi reduzida a 0,5%, verificou-se um aumento da porcentagem de germinação para 35% nos frascos mantidos em temperatura constante e de 55% para aqueles mantidos em temperatura alternada em BOD (Tabela 2).

Sementes pré-tratadas e, em seguida, desinfestadas com H₂O₂ na concentração de 3% alcançaram porcentagens de germinação entre 55 e 90% (Tabela 2). Além da alta germinabilidade, também foi observado que sementes mantidas em BOD apresentaram um aumento na velocidade de germinação, com o processo ocorrendo em até dez dias a partir da inoculação (Figura 4).

O uso de H_2O_2 não afetou a germinação das sementes, e se mostrou muito útil ao processo de descontaminação, possibilitando valores de 90%. Estes resultados tornam-se mais relevantes pelo fato do tempo de exposição ao agente desinfestante no protocolo com o uso de H_2O_2 ter sido 10x menor do que o tempo utilizado no protocolo convencional com uso do NaClO.

Figura 4 – Plântulas de *C. spinosa* oriundas do processo de germinação *in vitro* de sementes mantidas em BOD



Legenda: (a) – três meses da semente após desinfestação com 0,5% NaClO por 15 minutos; (b) – vinte dias da semente, após desinfestação com 3% de H_2O_2 por 2 minutos. Barra = 1 cm.

Tabela 2 – Porcentagens de germinação e de contaminação de sementes de *C. spinosa* após pré-tratamento germinativo (escarificação + embebição em água destilada por 12 horas), seguido por diferentes tratamentos de desinfestação

| Germinação <i>in vitro</i> | | | | |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|------------------|
| Agente desinfestante (v/v) | Tempo de exposição (min) | Condição de cultivo | Germinação (%) | Contaminação (%) |
| NaClO (2,5%) | 20 | BOD | 20 | 0 |
| NaClO (0,5%) | 10 | Câmara de crescimento | 35 | 5 |
| NaClO (0,5%) | 10 | BOD | 55 | 5 |
| NaClO (1%) | 10 | Câmara de crescimento | 0 | 0 |
| NaClO (1%) | 10 | BOD | 10 | 0 |
| H_2O_2 (3%) | 2 | Câmara de crescimento | 55 | 15 |
| H_2O_2 (3%) | 2 | BOD | 90 | 5 |

Legenda: BOD - 16 h luz à temperatura de 30 °C e 8 h de escuro à temperatura de 20 °C. Câmara de crescimento - 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h luz. Total de 20 sementes por tratamento.

4.2 Estabelecimento das culturas de raízes a partir de segmentos radiculares de plantas propagadas *in vitro*

Para avaliar a capacidade de crescimento das culturas de raízes, inicialmente foram aferidos os pesos de matéria fresca e seca de explantes obtidos a partir de plantas propagadas *in vitro* nos tamanhos utilizados para o início das culturas. Esses valores iniciais de biomassa para explantes de 0,5 cm foram: PF = $0,0018 \pm 0,0008$ g e PS = $0,0003 \pm 0,00005$ g e para explantes de 1,0 cm os valores obtidos foram: PF = $0,0036 \pm 0,001$ g e PS = $0,0007 \pm 0,0004$ g.

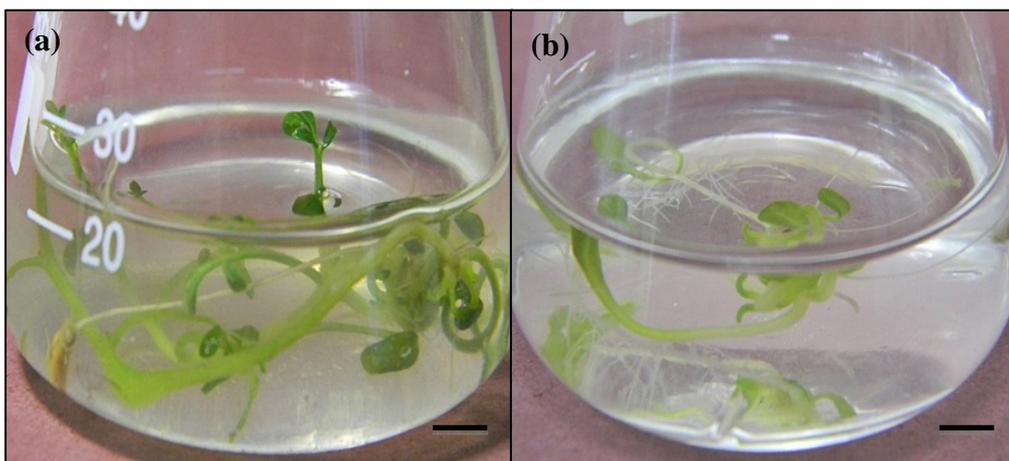
4.2.1 Influência da suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento

A multiplicação *in vitro* de raízes da espécie *Cleome spinosa* foi influenciada pela presença de reguladores de crescimento no meio de cultura. As culturas iniciadas em meio MS líquido sem suplementação hormonal (MS0) apresentavam uma intensa proliferação de brotos em associação a uma baixa produção de raízes (Figura 5). Na maior parte das culturas, após o desenvolvimento dos brotos ocorria formação de raízes, mas estas se originavam dos brotos e não de multiplicação a partir dos segmentos radiculares. Esta resposta foi observada tanto nas culturas mantidas na presença de luz, como naquelas cultivadas no escuro. Nos poucos explantes onde não ocorreu a proliferação de brotos foi possível observar o alongamento das raízes sem proliferação. A manutenção das culturas na presença de luz resultou em um maior desenvolvimento dos brotos, mas não influenciou a multiplicação das raízes.

A suplementação com diferentes auxinas induziu respostas distintas em função do tipo de fitoregulador e de concentração utilizados. A suplementação com ANA não foi favorável à indução de raízes. Na primeira semana em cultivo, os explantes apresentavam um ligeiro intumescimento. Ao longo do tempo, e nas diferentes concentrações avaliadas, ocorreu um intenso calejamento dos explantes. Após 45 dias em cultivo, o meio de cultura se apresentava turvo, devido à liberação de células (Figura

6). A manutenção das culturas na presença de luz ou no escuro não acarretou em diferenças quanto à resposta morfogênica.

Figura 5– Culturas de raízes iniciadas a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* inoculados em meio MS0



Legenda: Culturas após 45 dias mantidas (a) sob a luz; (b) no escuro. Barra = 0,5 cm.

Figura 6 – Cultura de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* inoculados em meio MS com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA



Legenda: Cultura com 45 dias, mantida na presença de luz
Barra = 0,5 cm.

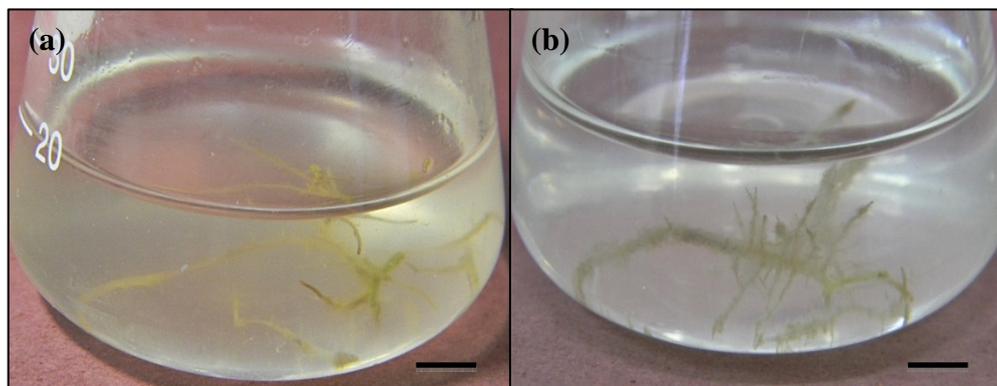
O uso de AIB nas diferentes concentrações avaliadas promoveu a proliferação de raízes. Na primeira semana em cultivo foi possível observar um pequeno intumescimento dos explantes, porém não tão expressivo como observado nos explantes mantidos em meio com ANA. O início do desenvolvimento de raízes laterais ocorreu na primeira semana em cultivo, com a formação de 1-3 raízes por explante. Estas raízes se caracterizavam por serem bem finas e, ao longo do tempo em cultura, foi verificado um pequeno alongamento destas raízes neoformadas, sem ocorrer o desenvolvimento de novas raízes (Figura 7). Após 45 dias em cultura, a avaliação da produção de biomassa demonstrou que a concentração utilizada resultou em diferenças estatísticas significativas. O uso de AIB mostrou uma correlação positiva entre acúmulo de biomassa e aumento da concentração hormonal. Maiores valores de biomassa foram alcançados nas culturas mantidas na maior concentração de AIB, sob luz (Gráfico 1), demonstrando que a presença de luz foi um fator relevante para a resposta morfogênica.

Ao longo do tempo em cultivo ocorreu a turbidez do meio de cultura em todas as condições testadas. Este processo provavelmente foi resultado da liberação de células a partir dos explantes que apresentaram intumescimento e um leve calejamento.

As culturas iniciadas em meio suplementado com AIA apresentaram a proliferação de raízes a partir da primeira semana em cultivo, independentemente da concentração utilizada. Ao contrário do observado nas culturas mantidas em meios contendo ANA e AIB, não foi verificado intumescimento dos explantes ou calejamento. As raízes adventícias produzidas (2-3 por explante) eram finas e, ao longo do tempo em cultura, alongavam-se, apresentando pequeno desenvolvimento de raízes laterais (Figura 8a). A proliferação de brotos foi verificada nas culturas mantidas na presença de luz em cerca de 50% dos explantes, principalmente na menor concentração testada (Figura 8b).

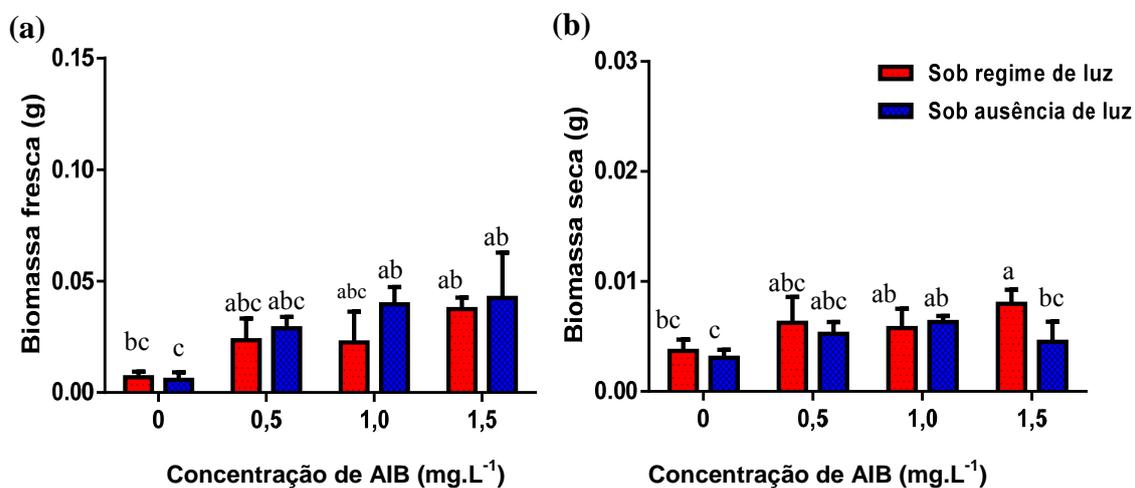
Os tratamentos com AIA sob luz induziram maior acúmulo de biomassa, quando comparados às culturas no escuro (Figuras 8c e 8d). Contudo, não houve diferenças significativas entre as culturas, demonstrando que a luminosidade não foi um fator de influência na proliferação *in vitro* das raízes (Gráfico 2).

Figura 7– Culturas de raízes de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB



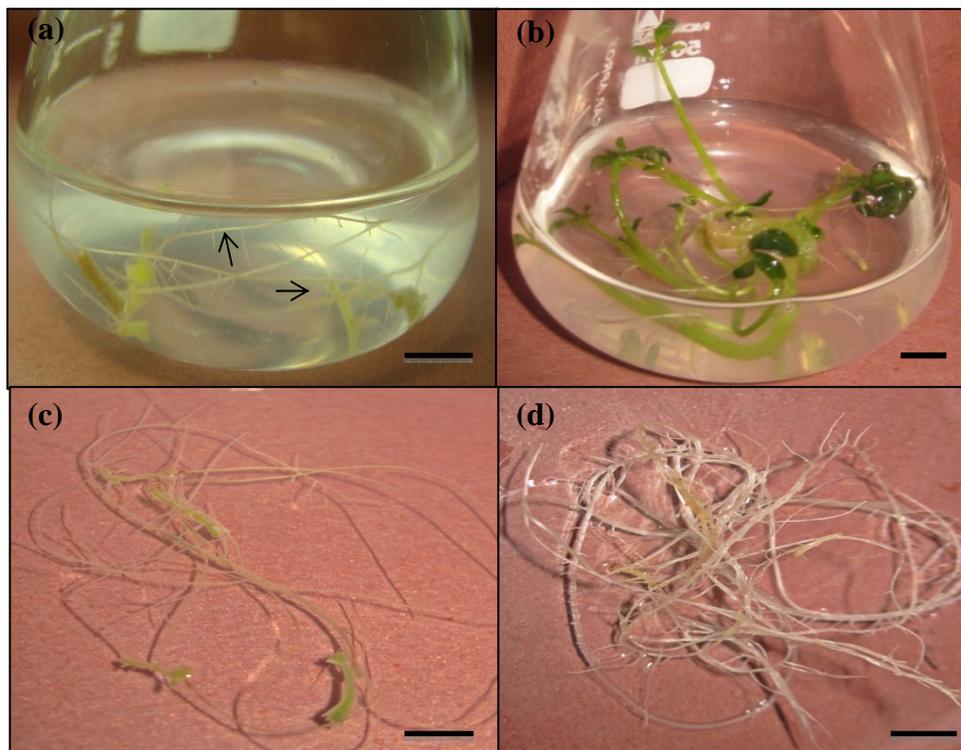
Legenda: Culturas com 45 dias mantidas (a) – em 1,5 mg.L⁻¹, sob a luz; (b) – em 0,5 mg.L⁻¹, no escuro. Barra = 0,5 cm.

Gráfico 1 – Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro* inoculados em meio MS líquido com diferentes concentrações de AIB, após 45 dias de cultivo



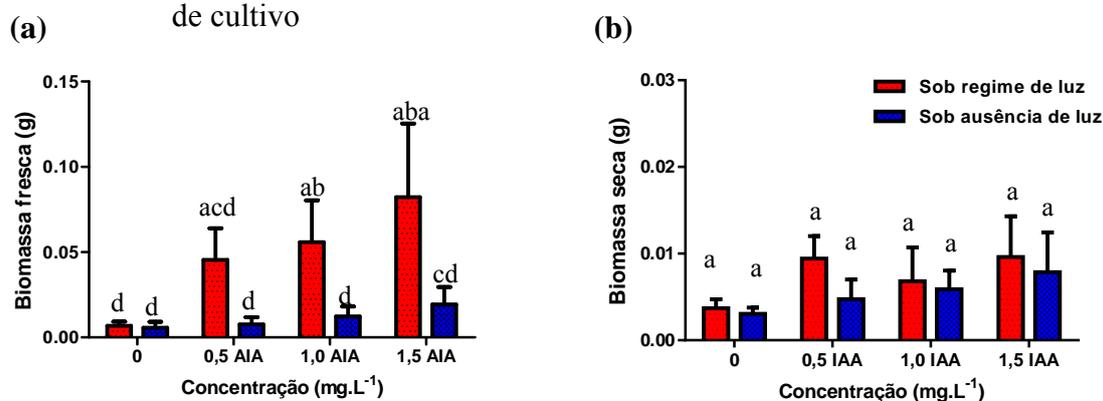
Legenda:(a)– biomassa fresca; (b)– biomassa seca. Os dados foram obtidos a partir das médias das replicatas. Médias ± desvio padrão com letras diferentes nas colunas significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

Figura 8– Culturas de raízes de explantes radiculares (0,5 cm) obtidos de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* inoculados em meio MS suplementado com AIA



Legenda: (a) – raízes adventícias (setas) produzidas em meio com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, sob luz, após 7 dias em cultivo; (b) – proliferação de brotos em meio com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, sob luz, após 20 dias; (c) – proliferação de raízes em meio com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, no escuro, após 45 dias; (d) – proliferação de raízes em meio com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, sob luz, após 45 dias. Barra = 0,5 cm.

Gráfico 2 – Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com diferentes concentrações de AIA, após 45 dias de cultivo



Legenda: (a) –biomassa fresca; (b) –biomassa seca. Os dados foram obtidos a partir das médias das replicatas. Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

A capacidade de multiplicação *in vitro* de raízes de *C. spinosa* também foi avaliada pela manipulação do meio básico de cultura, em função do tamanho dos explantes e pela alteração da suplementação hormonal fornecida ao meio.

4.2.2 Influência da fonte de carbono do meio de cultura

Nos ensaios avaliando a influência da fonte de carbono, a substituição total da sacarose por 3% de sorbitol não foi eficiente para induzir a multiplicação das raízes. Como observado anteriormente, as culturas mantidas em MS0 contendo 3% de sacarose apresentaram proliferação de brotos, enquanto o uso de ANA resultou no calejamento dos explantes. Culturas mantidas em presença de AIB ou AIA, independentemente da concentração avaliada e da presença ou ausência de luz, não apresentaram respostas morfológicas.

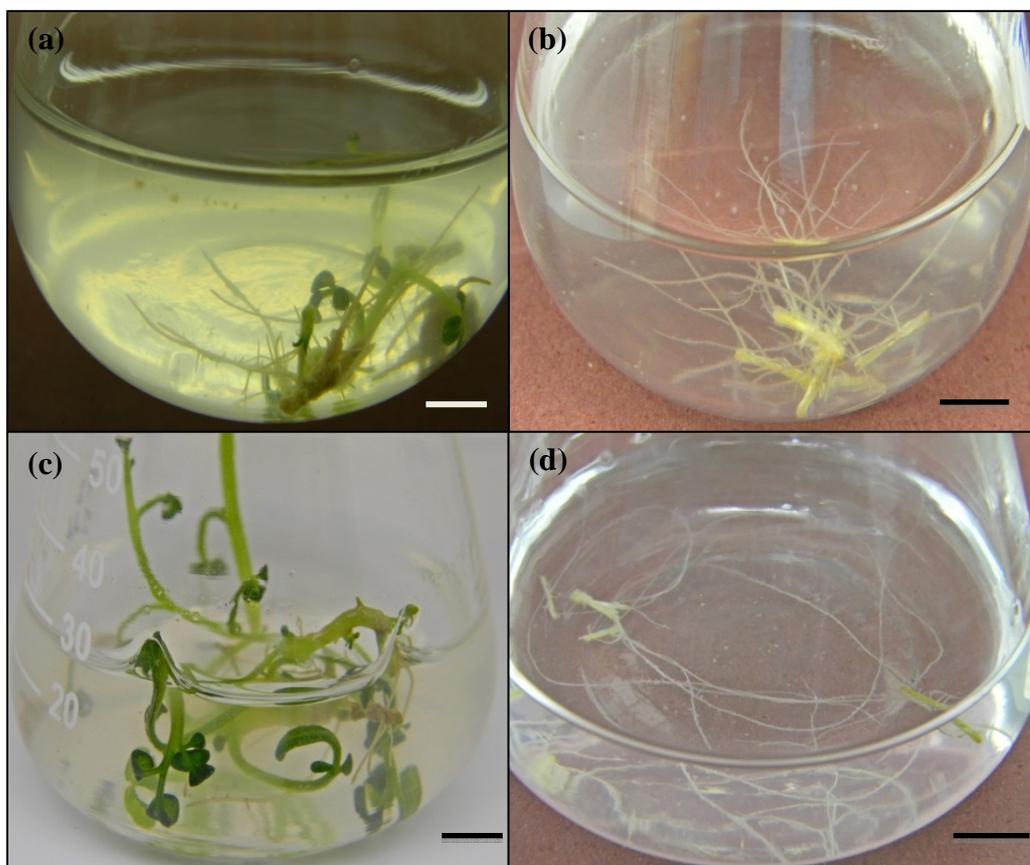
Culturas mantidas em meio contendo a associação de 1,5% de sacarose e 1,5% de sorbitol apresentaram respostas semelhantes àquelas obtidas em meio MS0 e em presença de ANA. Entretanto, a multiplicação de raízes foi observada nos meios suplementados com AIB e AIA a partir da segunda semana em cultivo. As culturas mantidas na presença de luz apresentaram proliferação de brotos, além da multiplicação de raízes (Figuras 9a e 9c).

Os explantes radiculares cultivados em meio com a associação sacarose-sorbitol, suplementados com AIB e mantidas no escuro apresentaram o desenvolvimento de cerca de cinco a oito raízes por explante (Figura 9b). Embora o número de raízes formadas por explante tenha sido maior do que nas culturas mantidas em meio contendo 3% de sacarose (1-3 raízes por explante), na associação sacarose-sorbitol não foi observado o alongamento das raízes neoformadas ao longo do tempo em cultura. Culturas estabelecidas na presença de AIA mostraram uma resposta similar à já verificada em meio contendo 3% de sacarose. Ocorreu a formação de duas a três raízes por explante, sendo verificado o alongamento destas raízes, sem a ocorrência de proliferação, ao longo do tempo em cultura (Figura 9d).

A avaliação do acúmulo de biomassa após 45 dias de cultivo mostrou que culturas mantidas na presença de luz alcançaram maior crescimento quando comparadas

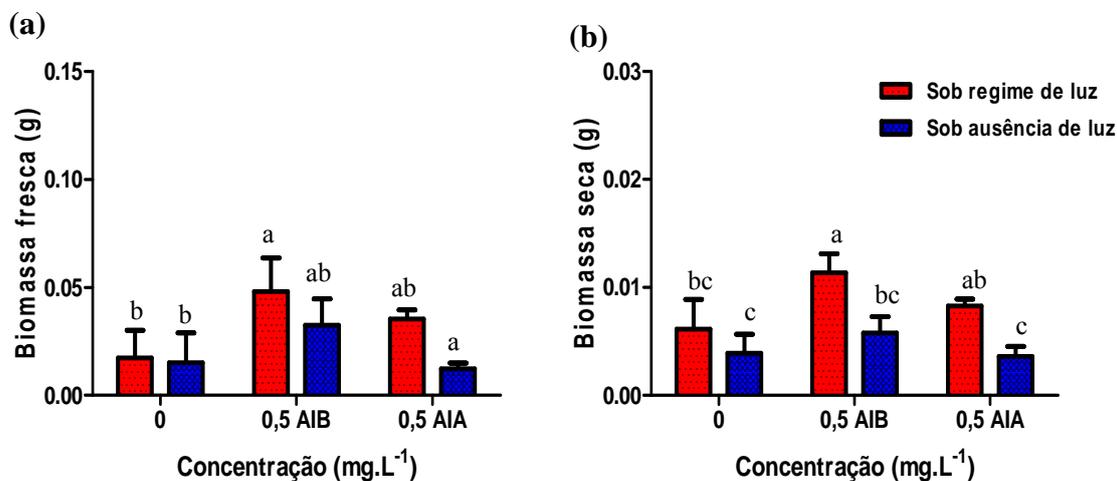
às culturas mantidas no escuro (Gráfico 3). Quando o tratamento com a associação sacarose-sorbitol foi comparado ao uso apenas de sacarose (Gráficos 1 e 2), foi possível observar a influência do fitorregulador e da luminosidade sobre a resposta proliferativa. Em presença de AIB, culturas mantidas na luz alcançaram maior produção de biomassa em meio enriquecido com sacarose-sorbitol, enquanto que na presença de AIA, maiores valores foram obtidos por culturas mantidas em meio apenas com sacarose. Por outro lado, quando as culturas foram mantidas no escuro, a fonte de carbono não influenciou a resposta, uma vez que os valores de biomassa alcançados foram muito semelhantes nos diferentes tratamentos.

Figura 9– Culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido acrescido de 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitol e suplementado com auxinas



Legenda: Culturas após 45 dias de cultivo em (a) $-0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, sob luz; (b) $-0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, no escuro; (c) $-0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, sob luz; (d) $-0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, no escuro. Barra = 0,5 cm.

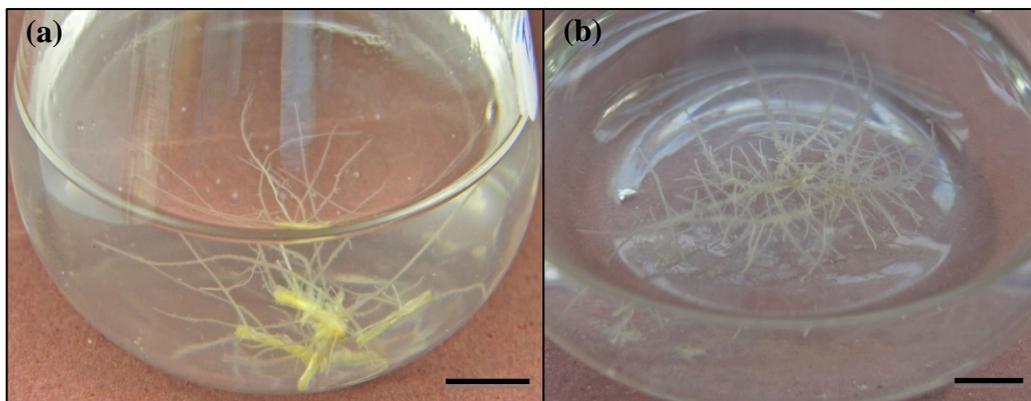
Gráfico 3 – Acúmulo de biomassa de culturas de raízes de *C. spinosaa* partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido acrescido com 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitol e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIA ou AIB, após 45 dias



Legenda: (a)– biomassa fresca; (b) – biomassa seca. Os dados foram obtidos a partir das médias das replicatas. Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

As culturas iniciadas em meios contendo a associação de sacarose-sorbitol foram subcultivadas após os 45 dias em cultivo, a fim de acompanhar se a capacidade de multiplicação das raízes se manteria ao longo do tempo. A partir da cultura original foram excisados explantes de 0,5 cm que foram recultivados (cinco explantes/frasco) em meio fresco de igual composição ao utilizado para a cultura matriz. Foi observado que a manutenção da capacidade de multiplicação das raízes se manteve apenas nas culturas em meio com AIB mantidas no escuro. A partir da segunda semana em cultivo os explantes apresentavam a formação de raízes laterais que se caracterizavam por serem mais grossas e curtas do que as raízes formadas durante os primeiros 45 dias em cultivo (1^a subcultura) (Figura 10a e 10b). Quanto ao acúmulo de biomassa, não foram verificadas diferenças significativas nos valores de PF e PS entre as subculturas (Gráfico 4).

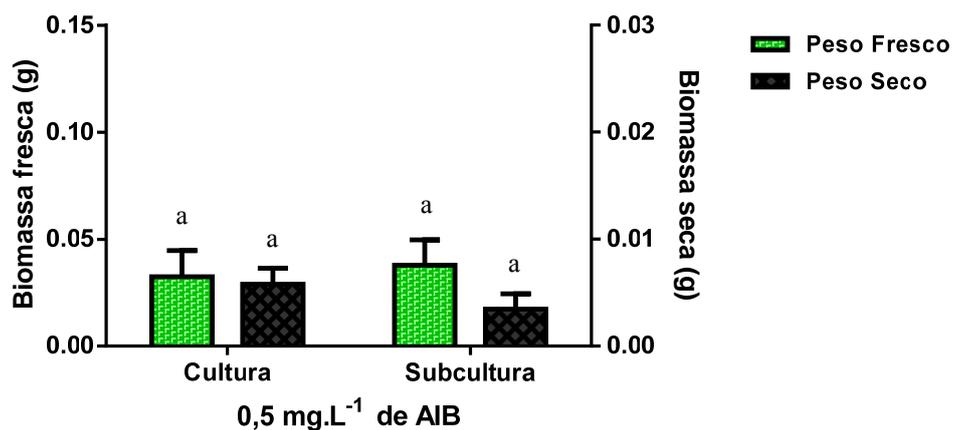
Figura 10– Culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido acrescido de 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitol e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB



Legenda:(a)– após os primeiros 45 dias; (b) –após 45 dias do subcultivo para meio fresco de igual composição. Culturas mantidas no escuro. Barra = 0,5 cm.

Gráfico 4 – Acúmulo de biomassa de culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas propagadas *in vitro* em meio MS líquido acrescido com 1,5% de sacarose + 1,5% de sorbitol e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIA ou AIB

Sob ausência de luz

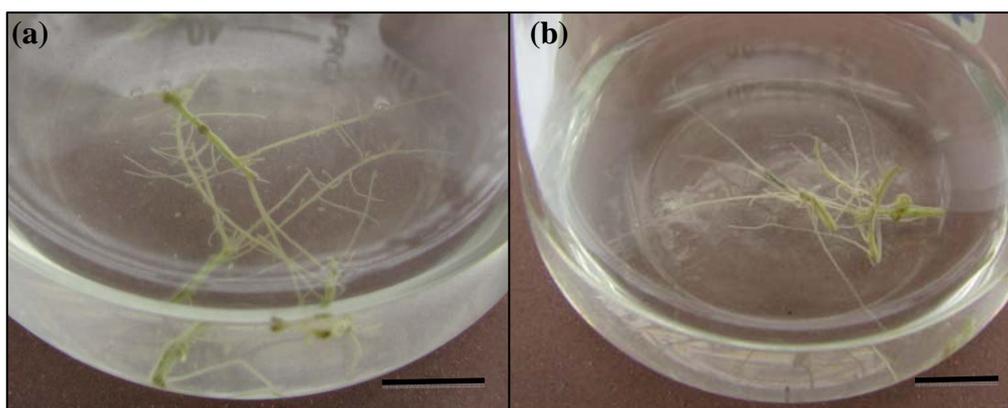


Legenda: Culturas mantidas no escuro, após 45 dias e após subcultura. Os dados foram obtidos a partir das médias das replicatas. Médias ± desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

4.2.3 Influência do tamanho do explante

O tamanho do explante foi um fator relevante na resposta morfológica das culturas de raízes de *C. spinosa* quando o cultivo foi realizado em meio MS0. Culturas iniciadas a partir de explantes de 1,0 cm de comprimento apresentaram uma resposta distinta do que havia sido observado anteriormente em culturas iniciadas a partir de explantes de 0,5 cm (Figura 5). Independentemente da presença ou ausência de luz, não foi observada a indução de brotos e foi observada maior produção de raízes (Figura 11).

Figura 11– Culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas propagadas *in*em meio MS0, após 45 dias

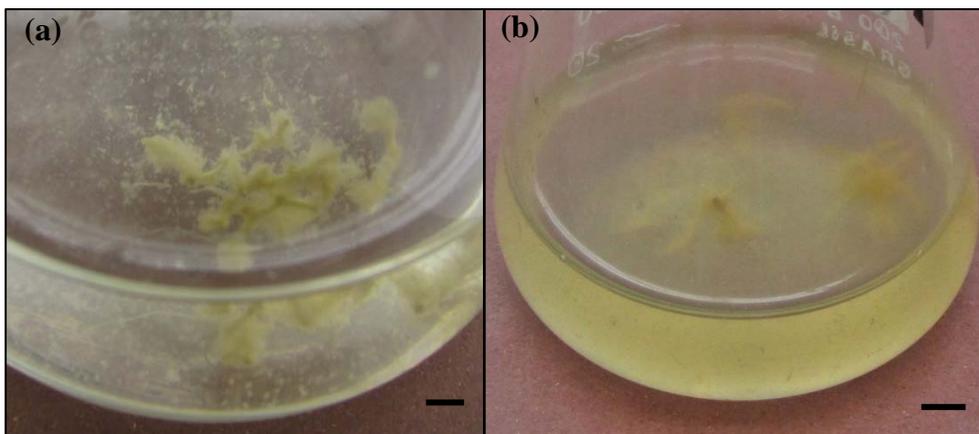


Legenda: (a)– na presença de luz; (b) – no escuro. Barra = 1,0 cm.

Embora o aumento do tamanho dos explantes tenha sido um fator positivo para as culturas mantidas em MS0, o mesmo não foi observado quando os explantes foram inoculados em meio contendo AIB. Explantes inoculados em meios suplementados com AIB (3,0 e 5,0 mg.L⁻¹), independentemente do tamanho (0,5 cm ou 1,0 cm) e da condição de luminosidade, apresentaram intumescimento seguido por calejamento (Figura 12a). Na maior concentração de AIB (5,0 mg.L⁻¹), além de calejamento também ocorreu a produção de uma substância de coloração alaranjada que causou a turbidez do meio de cultura (Figura 12b). Nas culturas mantidas em meios suplementados com AIA, o aumento do tamanho dos explantes foi um fator positivo para o incremento da

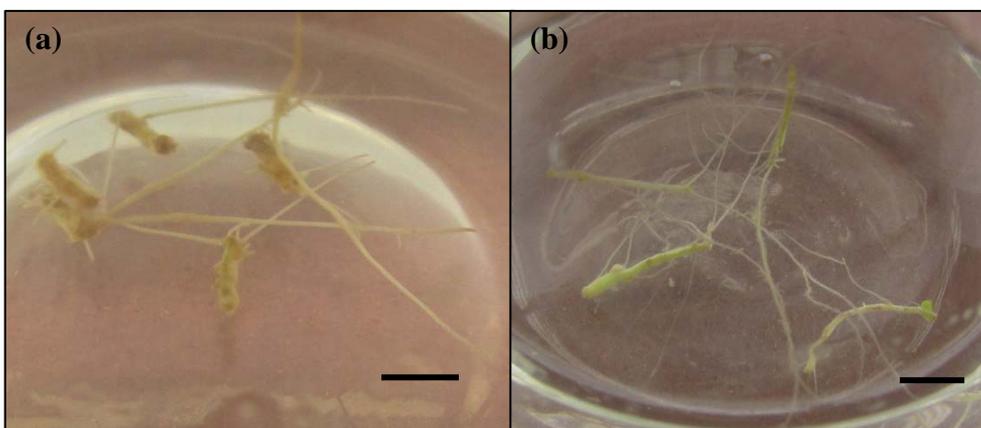
produção de biomassa, tanto para as culturas mantidas na presença de luz (Figura 13a), como para as culturas estabelecidas no escuro (Figura 13b), embora sem apresentar diferenças estatísticas significativas (Gráfico 5).

Figura 12– Culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com AIB, após 45 dias de cultivo



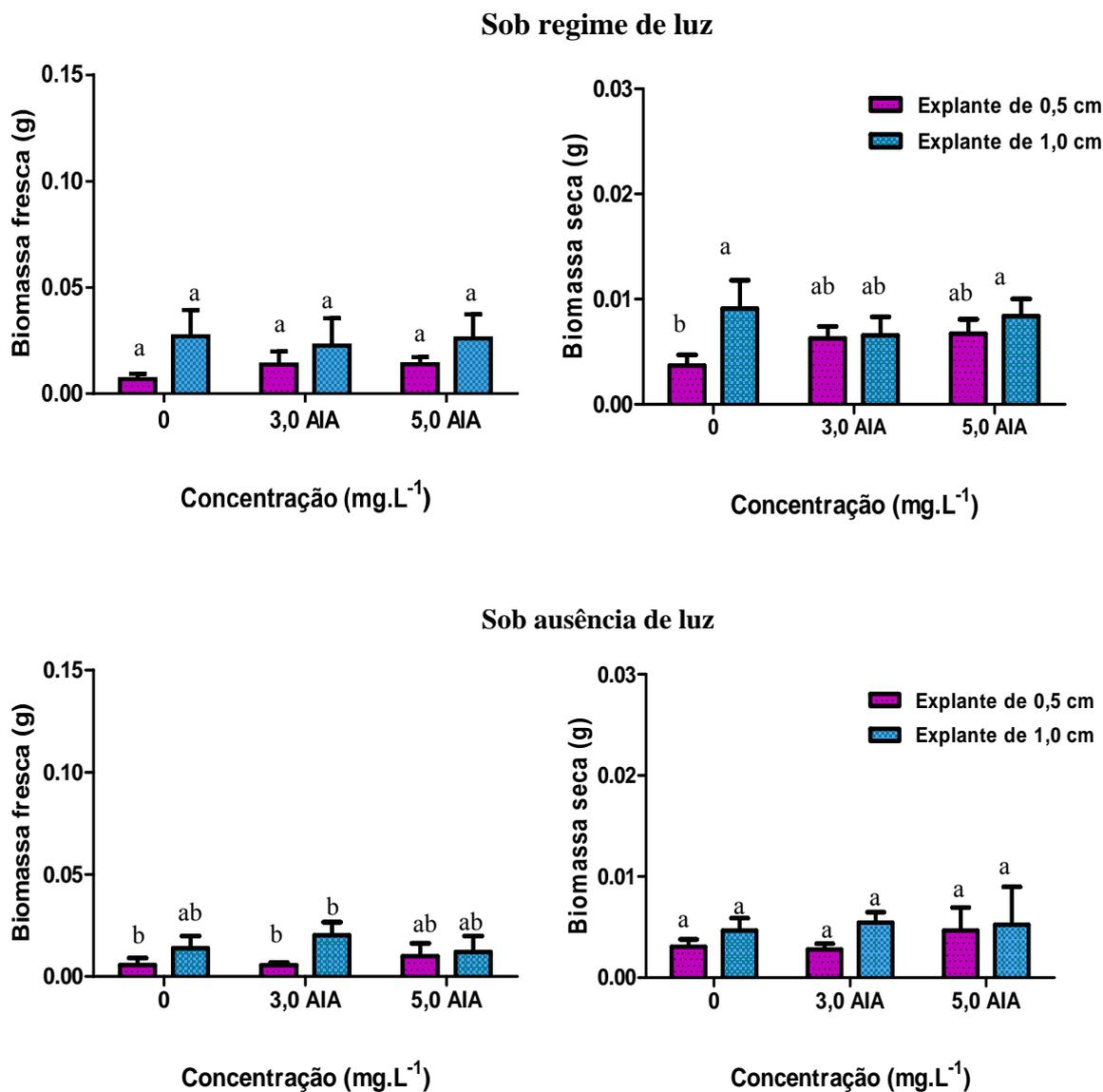
Legenda: (a)– explantes de 1,0 cm mantidos em meio MS com 3,0 mg.L⁻¹ de AIB, sob luz; (b) – explantes de 0,5 cm mantidos em meio MS com 5,0 mg.L⁻¹ de AIB, no escuro. Barra = 0,5 cm.

Figura 13– Culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com AIA, após 45 dias de cultivo



Legenda: (a)– explantes de 0,5 cm em meio MS com 5,0 mg. L⁻¹ de AIA, sob luz; (b)– explantes de 1,0 cm em meio MS com 3,0 mg.L⁻¹ de AIA, no escuro. Barra = 0,5 cm.

Gráfico 5– Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares (0,5 cm e 1,0 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com diferentes concentrações de AIB ou AIA, após 45 dias de cultivo



Legenda: Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

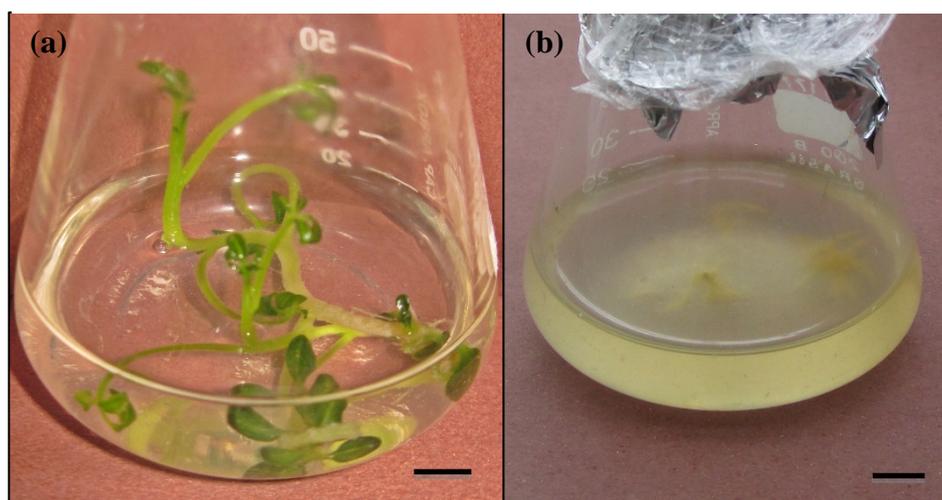
4.2.4 Influência da associação auxina e citocinina

A suplementação do meio de cultura com BAP em combinação com AIB e AIA não foi eficiente para a indução e multiplicação de raízes. A presença de BAP foi um

estímulo à proliferação de brotos (Figura 14a), o que foi observado em praticamente todos os tratamentos avaliados. Quando explantes de 0,5cm foram cultivados na presença de BAP em combinação com AIA por cinco dias (T1) ocorreu calejamento dos explantes (Figura 14b).

4.2.5 Influência da redução da concentração de sais do meio de cultura

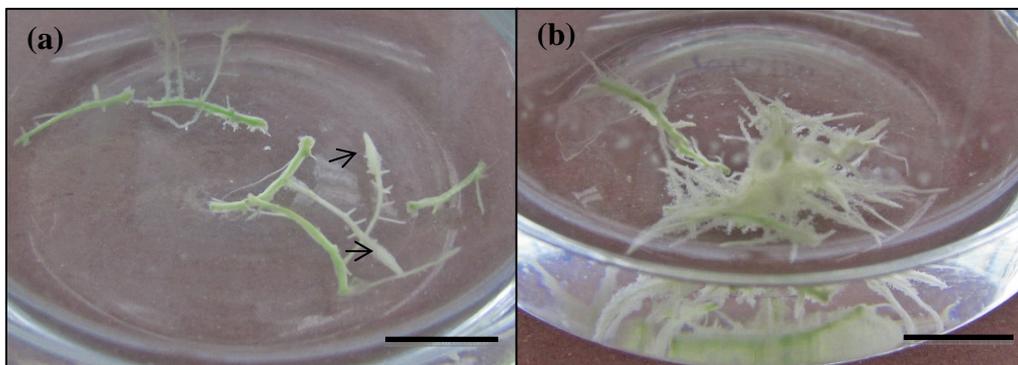
Figura 14– Culturas de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes radiculares de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS com a associação auxina:citocinina, após 45 dias de cultivo



Legenda: Culturas mantidas na presença de luz a partir de (a)– explantes de 1,0 cm, em meio com 0,1 mg.L⁻¹de BAP + 1,0 mg.L⁻¹de AIBpor 10 dias (b) –explantes de 0,5 cm, em meio com 0,1 mg.L⁻¹de BAP + 1,0 mg.L⁻¹de AIApor 5 dias. Barra = 0,5 cm.

Os experimentos realizados com explantes de 1,0 cm inoculados em meios MS^{1/2} e MS^{1/4} suplementados com AIB ou AIA (1,0 mg.L⁻¹) mostraram que a redução da concentração total de sais minerais do meio MS não foi um fator positivo à indução de raízes *in vitro* de *C. spinosa*. Nessas culturas, embora nas primeiras semanas tenha sido observado o início de formação de raízes laterais (Figura 15a), ao longo do tempo em cultivo, as novas raízes não apresentaram alongamento, ocorrendo seu intumescimento, seguido de calejamento (Figura 15b).

Figura 15– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS com redução na concentração total de sais minerais, após 45 dias de cultivo



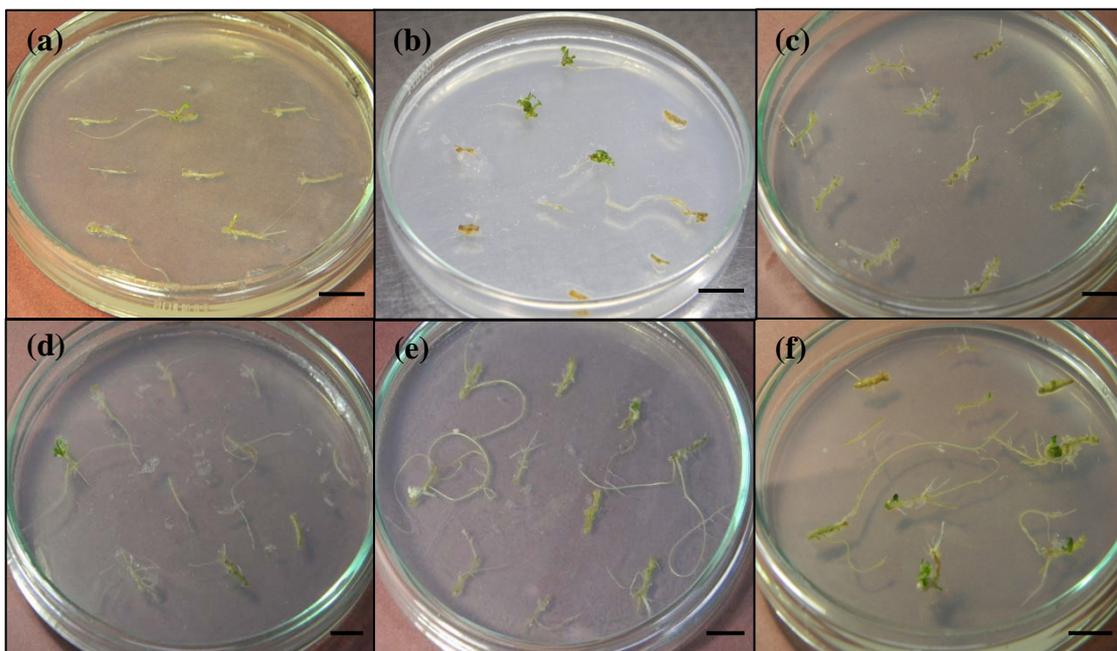
Legenda: Culturas mantidas na presença de luz (a)– em meio MS^{1/2} com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB mostrando início de caejamento (setas) nas raízes, após uma semana; (b)– em meio MS^{1/4} com 1,0 mg.L⁻¹ de AIA. Barra = 1,0 cm.

4.2.6 Cultura de raízes em meio solidificado

O cultivo dos explantes radiculares em meio MS solidificado embora tenha propiciado a formação de algumas raízes, foi pouco eficiente para a multiplicação. O tamanho dos explantes, a presença ou ausência de luz, assim como a concentração do fitorregulador foram fatores importantes na resposta. O cultivo em MS0 induziu raízes, mas apenas quando as placas foram incubadas no escuro. Apesar dos baixos valores de biomassa, não foi verificada a proliferação de brotos nas culturas mantidas em MS0, mesmo na presença de luz (Figura 16a), o que ocorreu com frequência nas culturas estabelecidas em meio líquido. Nos ensaios realizados em meios suplementados com AIA foi verificado que a maior capacidade de multiplicação ocorreu quando foram usados explantes de maior tamanho (1,0 cm) e as culturas foram mantidas na presença das concentrações hormonais mais elevadas. Explantes de 0,5 cm apresentaram baixa capacidade de formação de raízes (Figura 16b). A manutenção das culturas no escuro resultou em uma menor formação de raízes (Figura 16c), embora tenha evitado o desenvolvimento de brotos, resposta observada na maior parte das culturas mantidas sob luz. Culturas iniciadas em meios suplementados com concentrações crescentes de AIA e mantidas na presença de luz resultaram na maior multiplicação de raízes, embora

também tenha sido observada a indução de brotos, principalmente, na maior concentração avaliada ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figuras 16d, 16e e 16f).

Figura 16– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares de plantas propagadas *in vitro*, inoculados em meio MS sólido suplementado com AIA, após 45 dias de cultivo



Legenda: (a) –explantes de 1,0 cm em MS0, sob luz; (b) –explantes de 0,5 cm em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, sob luz; (c) –explantes de 1,0 cm em $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, no escuro; (d) –explantes de 1,0 cm em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, sob luz; (e) –explantes de 1,0 cm em $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, sob luz; (f) –explantes de 1,0 cm em $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, sob luz. Barra = 1cm.

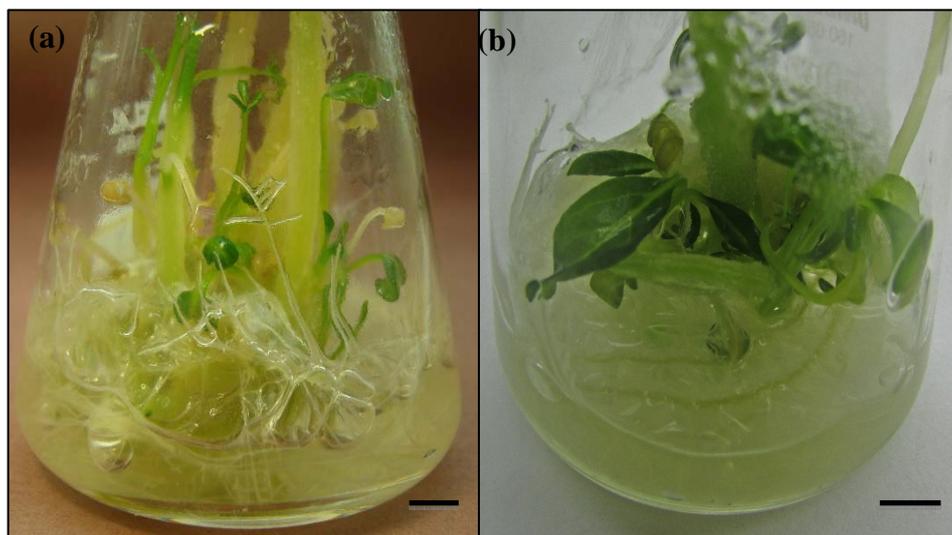
4.3 Estabelecimento das culturas de raízes a partir de segmentos radiculares de plantas oriundas de germinação *in vitro*

Para avaliar a capacidade de crescimento das culturas de raízes, inicialmente foram aferidos os pesos de matéria fresca e seca de explantes obtidos a partir de plantas obtidas por germinação *in vitro* nos tamanhos utilizados para o início das culturas. Esses valores iniciais de biomassa para explantes de 0,5 cm foram: PF = $0,0018 \pm 0,0008 \text{ g}$ e PS = $0,0004 \pm 0,0001 \text{ g}$ e para os explantes de 1,0 cm os valores obtidos foram: PF = $0,0035 \pm 0,001 \text{ g}$ e PS = $0,0007 \pm 0,0003 \text{ g}$.

A utilização de plantas obtidas por de germinação *in vitro* como fonte de explantes para as culturas de raízes mostrou-se muito mais adequada à indução e multiplicação das raízes, quando comparada ao uso de segmentos radiculares obtidos a partir de plantas propagadas *in vitro*.

Culturas mantidas em meio MS0 apresentaram intensa proliferação de brotos e desenvolvimento de raízes, a partir desses brotos. Esta resposta foi alcançada por culturas iniciadas tanto por explantes de 0,5 cm (Figura 17a), como quando usados explantes de 1,0 cm (Figura 17b).

Figura 17– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares de plantas obtidas por germinação *in vitro* em meio MS0, após 45 dias de cultivo



Legenda: Culturas na presença de luz, iniciadas a partir de (a)– explantes de 0,5 cm; (b)– explantes de 1,0 cm. Barra = 0,5 cm.

Inicialmente, explantes radiculares de 0,5 cm foram cultivados em meio MS líquido suplementado com AIB nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹. Nestes ensaios as culturas foram mantidas na presença de luz. Durante a primeira semana em cultivo ocorreu a indução de novas raízes. Estas raízes eram finas e de cor branca. Na segunda semana foi verificado o intumescimento dos explantes, seguido por caejamento. Com a intensidade do processo de caejamento foi possível observar a alteração na coloração das raízes, que adquiriram uma tonalidade bege. Ao final dos 45 dias em cultivo, o maior crescimento das culturas foi observado nos tratamentos com

0,5 e 1,5 mg.L⁻¹ de AIB (Figura 18). Porém, em função da ocorrência do intenso cauleamento, as culturas não tiveram seus valores de biomassa fresca e seca aferidos.

Figura 18 – Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (0,5 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB, após 45 dias de cultivo

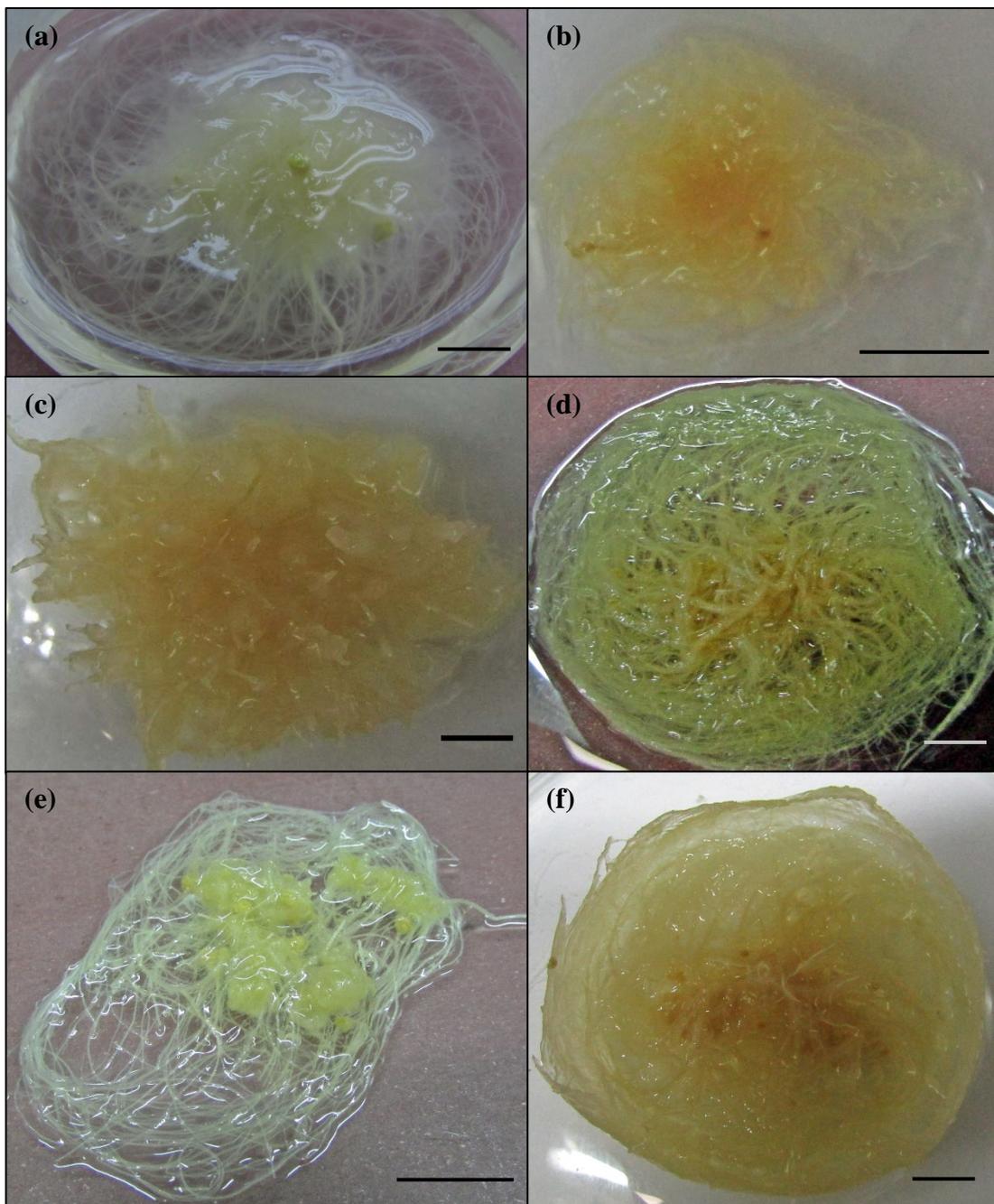


Legenda: Culturas mantidas na presença de luz. Barra = 0,5 cm.

As culturas iniciadas a partir de explantes com 1,0 cm em meio suplementado tanto com AIB como com AIA (0,5; 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹) alcançaram uma eficiente multiplicação das raízes. O início de desenvolvimento das raízes laterais ocorreu a partir da primeira semana em cultivo. Na presença de AIB, o aumento da concentração acarretou em maior acúmulo de biomassa (Figura 19a, 19b, 19c e Gráfico 6). Maiores

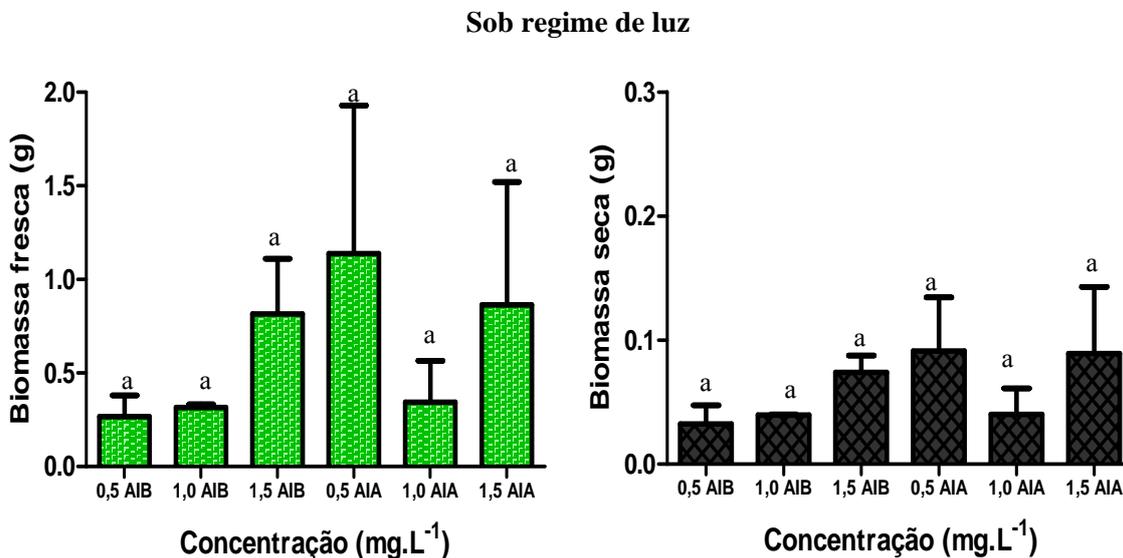
valores totais de acúmulo de biomassa foram obtidos nas culturas em 1,5 mg.L⁻¹. Assim como o observado em presença de AIB, o uso de AIA também foi eficiente para a produção de raízes. Nas culturas tratadas com AIA, os maiores valores de acúmulo de biomassa foram obtidos na presença de 0,5 mg.L⁻¹ e 1,5 mg.L⁻¹, (Figura 19d, 19f e Gráfico 6). No tratamento com 1,0 mg.L⁻¹, além de ocorrer uma menor multiplicação das raízes, também foi observada a formação de pequenos calos (Figura 19e). Não houve diferença estatística entre os tratamentos, considerando a auxina e as concentrações testadas (Gráfico 6).

Figura 19– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB ou AIA, após 45 dias de cultivo



Legenda: Culturas mantidas na presença de luz em meio MS com (a) – 0,5 mg.L⁻¹ de AIB; (b) – 1,0 mg.L⁻¹ de AIB; (c) – 1,5 mg.L⁻¹ de AIB; (d) – 0,5 mg.L⁻¹ de AIA; (e) – 1,0 mg.L⁻¹ de AIA; (f) – 1,5 mg.L⁻¹ de AIA. Barra = 1,0 cm.

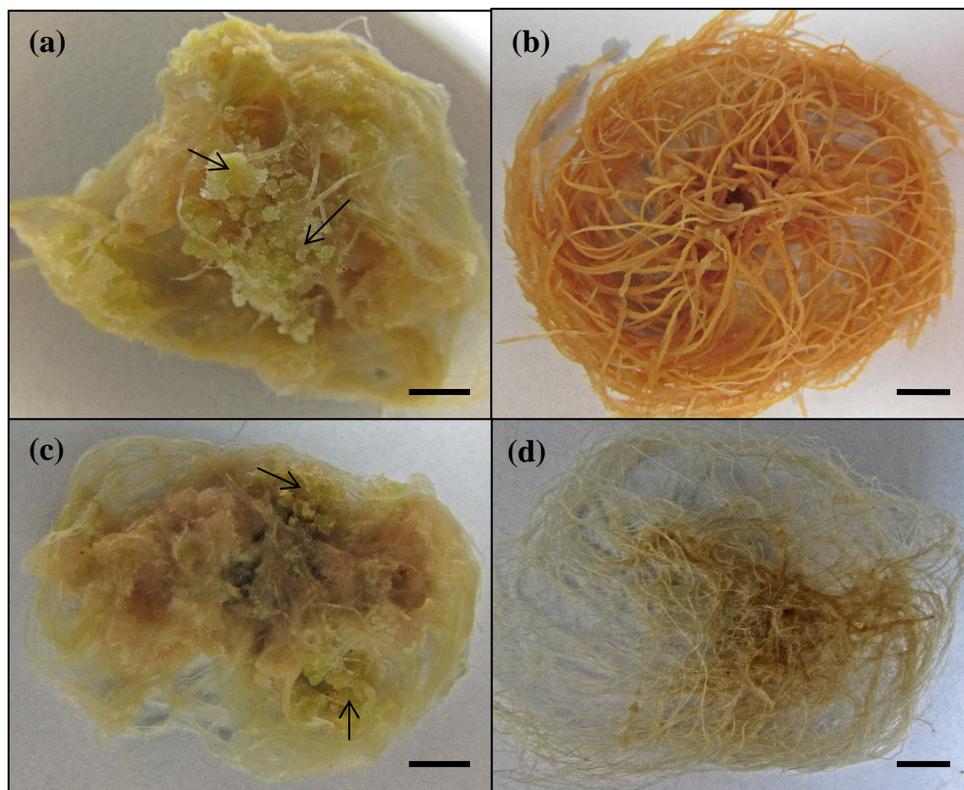
Gráfico 6– Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS com diferentes concentrações de AIB ou AIA, após 45 dias em cultivo



Legenda: Dados obtidos a partir das médias das replicatas. Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

O aumento da concentração de AIB e AIA ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$) foi eficiente para a multiplicação de raízes de *C. spinosa* a partir de explantes de 1 cm. Contudo, as culturas mantidas em meio de suplementado com AIB apresentaram intenso calejamento quando foram mantidas na presença de luz (Figura 20a e 20c). Já a manutenção das culturas no escuro resultou em alta proliferação, principalmente em meio com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Gráfico 7). As raízes produzidas apresentavam coloração alaranjada e com maior espessura do que as raízes obtidas nos demais tratamentos (Figura 20b). Quando a concentração do fitoregulador foi elevada ($5,0 \text{ mg.L}^{-1}$), ocorreu redução nos valores de acúmulo de biomassa (Gráfico 7). Nestas culturas, as raízes formadas eram finas e de cor bege (Figura 20d).

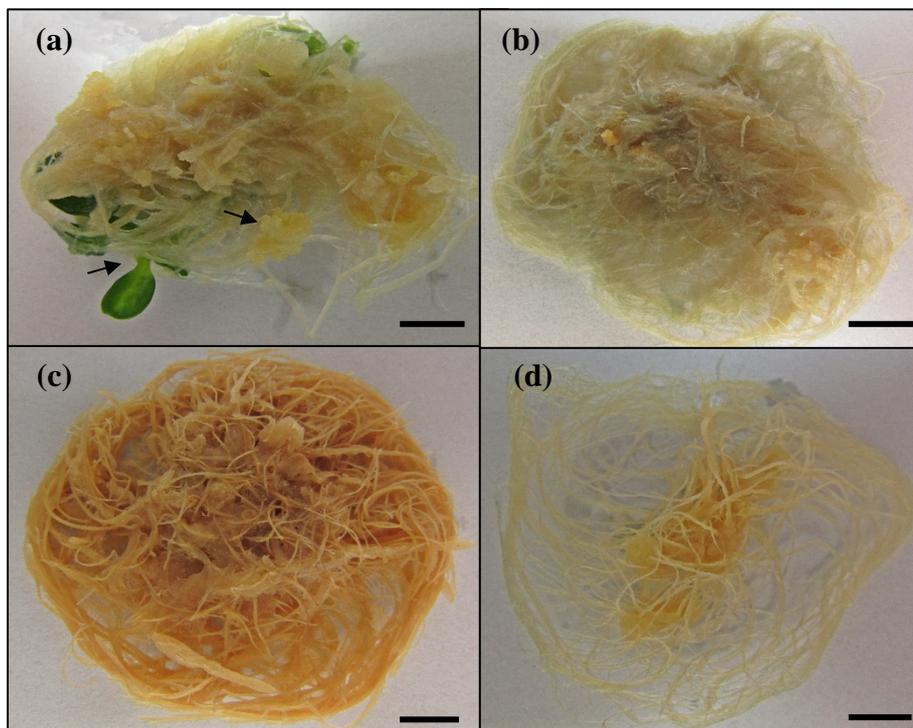
Figura 20– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB, após 45 dias de cultivo



Legenda: (a) – em $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$, sob luz, mostrando a indução de calos (setas); (b)– em $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$, no escuro; (c)– em $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$, sob luz, mostrando a indução de calos (setas); (d)– no escuro. Barra = 1,0 cm.

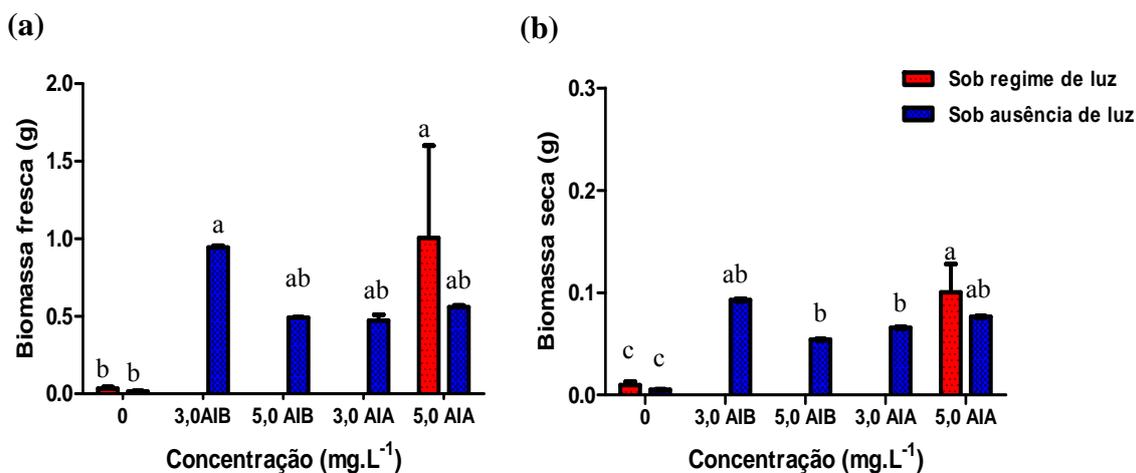
Culturas iniciadas em meio com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA e mantidas na luz apresentaram intenso calejamento e produção de brotos por organogênese indireta (Figura 21a). Enquanto que as culturas mantidas no escuro mostraram a formação de raízes finas de coloração bege claro, apresentando discreto calejamento em algumas regiões (Figura 21b). O aumento da concentração de AIA ($5,0 \text{ mg.L}^{-1}$) nas culturas mantidas na luz resultou na multiplicação de raízes embora com uma pequena produção de calos (Gráfico 7). As raízes formadas neste tratamento eram grossas e de coloração alaranjada (Figura 21c). Quando as culturas foram mantidas no escuro, as raízes formadas eram finas, apresentando coloração bege clara e o desenvolvimento de pequenos calos (Figura 21d).

Figura 21– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA, após 45 dias de cultivo



Legenda: (a) – em 3,0 mg.L⁻¹ de AIA, sob luz mostrando a indução de brotos e calos (setas); (b) – em 3,0 mg.L⁻¹ de AIA no escuro; (c) – em 5,0 mg.L⁻¹ de AIA, sob luz; (d) – em 5,0 mg.L⁻¹ de AIA, no escuro. Barra = 1,0 cm.

Gráfico 7 – Acúmulo de biomassa de culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (0,5 cm e 1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro* inoculados em meio MS líquido com 3,0 ou 5,0 mg.L⁻¹ de AIB ou AIA, após 45 dias de cultivo



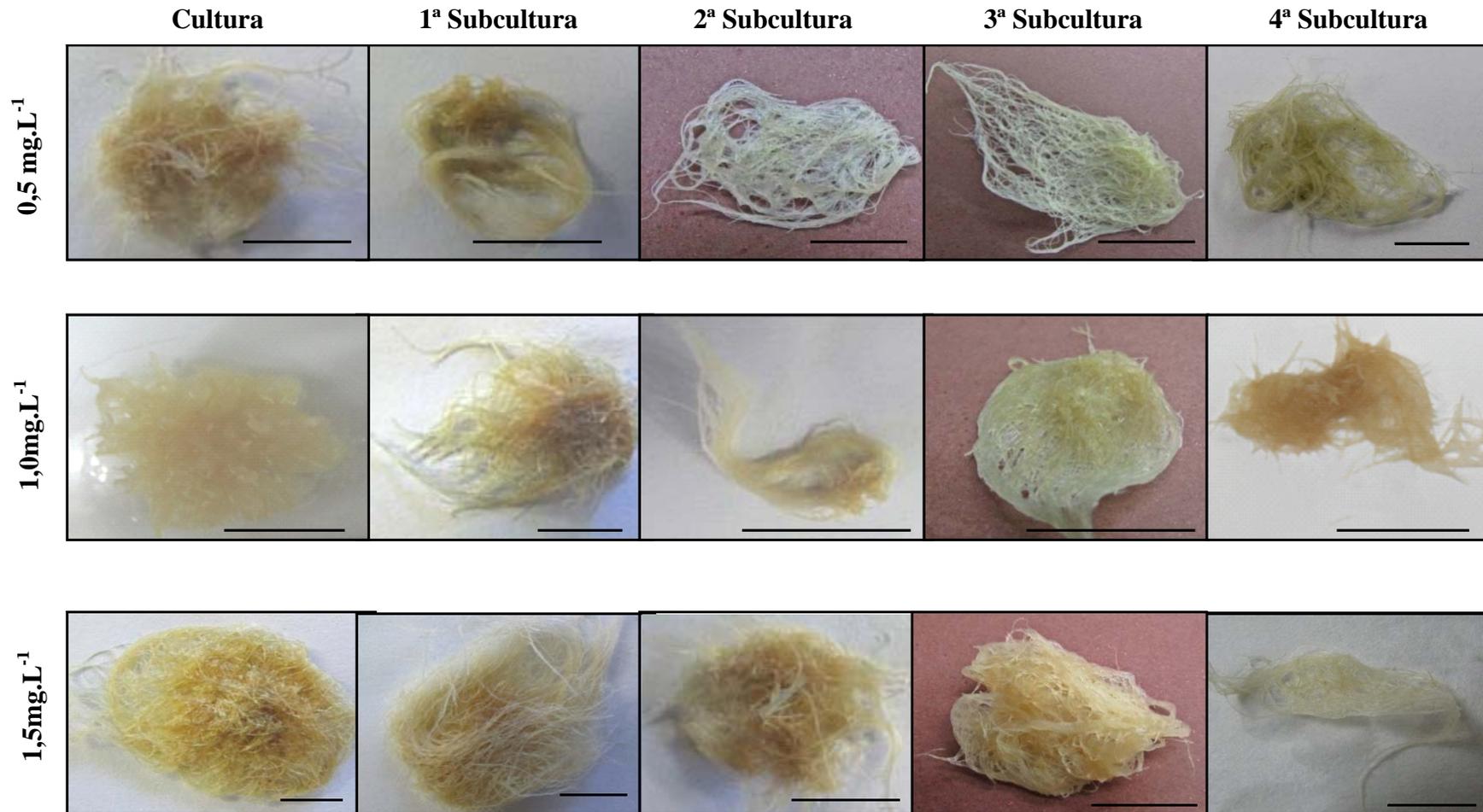
Legenda: (a)– biomassa fresca; (b)– biomassa seca. Os dados foram obtidos a partir das médias das replicatas. Médias ± desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

Quando comparados aos valores iniciais PF ($0,0036\pm 0,001g$) e PS ($0,0007\pm 0,0004g$), os valores de biomassa das culturas estabelecidas em meio suplementado com AIB na concentração de $3,0\text{ mg.L}^{-1}$ e mantidas no escuro, alcançaram os maiores valores de acúmulo de biomassa fresca ($0,9437\pm 0,012$) e seca ($0,0933\pm 0,001$) ao final de 45 dias em cultivo. As raízes produzidas eram mais grossas do que aquelas obtidas nos demais tratamentos e não foram observados sinais de caejamento. Em função destas características, o protocolo acima descrito foi selecionado como o mais eficiente para a multiplicação *in vitro* das raízes de *C. spinosa*.

Visando avaliar a capacidade proliferativa das raízes ao longo do tempo em cultivo, culturas estabelecidas em meio MS suplementado com 0,5; 1,0 e $1,5\text{ mg.L}^{-1}$ de AIB ou AIA, mantidas na presença de luz e também culturas obtidas pelo protocolo selecionado para a produção de biomassa (3 mg.L^{-1} de AIB no escuro), foram acompanhadas por até quatro subculturas realizadas a cada 45 dias.

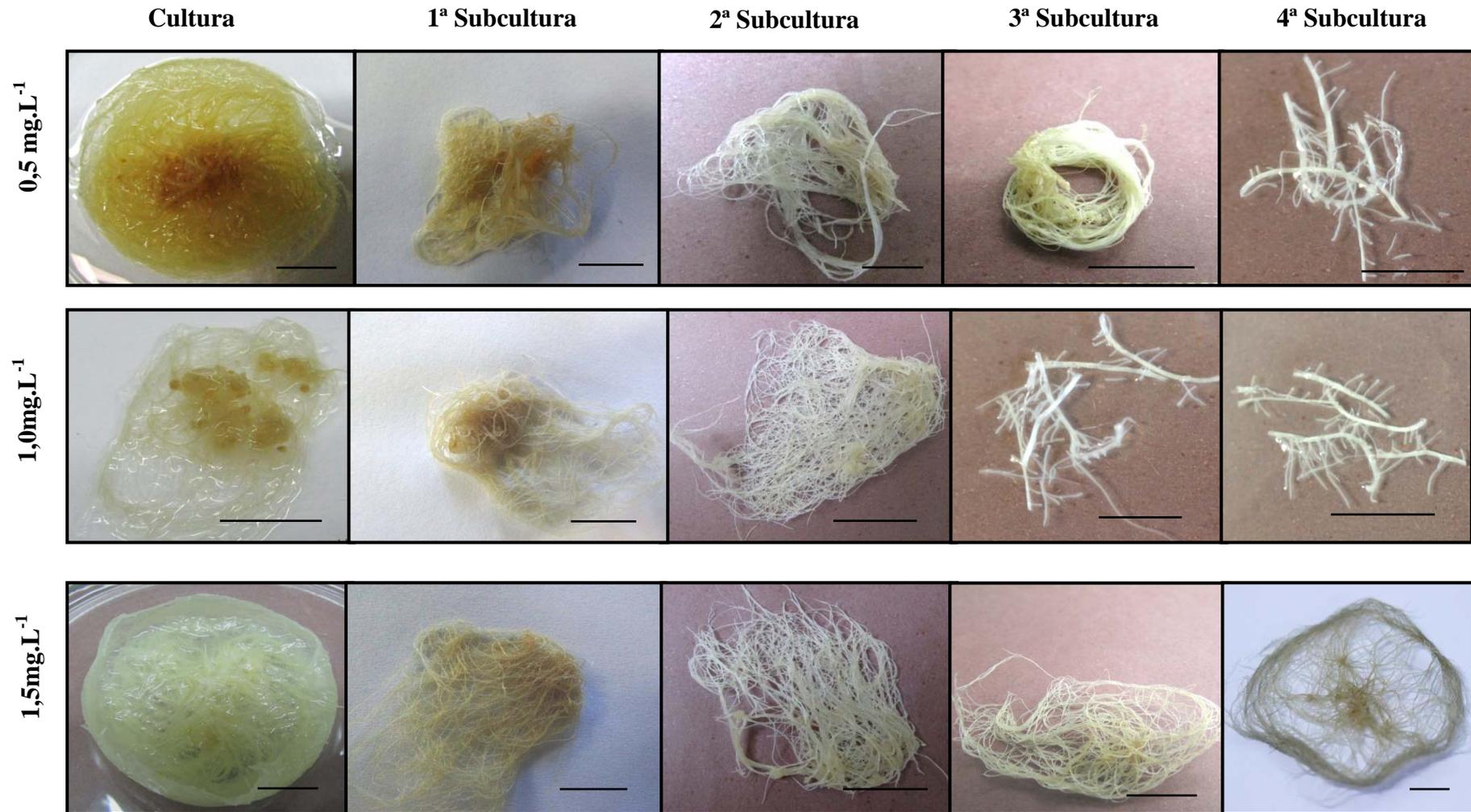
As culturas mantidas nas menores concentrações de AIB ($0,5; 1,0; 1,5\text{ mg.L}^{-1}$) apresentaram multiplicação ao longo das quatro subculturas (Figura 22), contudo os valores de biomassa alcançados foram inferiores àqueles obtidos pelas culturas após os primeiros 45 dias de cultivo (Gráfico 8). Com base nos valores de biomassa seca, apenas no tratamento com $1,0\text{ mg.L}^{-1}$ de AIB não há diferenças significativas entre a cultura e as subculturas. Nos tratamentos com AIA a manutenção do crescimento até a quarta subcultura ocorreu apenas na maior concentração ($1,5\text{ mg.L}^{-1}$). Para os demais tratamentos, a capacidade de multiplicação foi verificada até a terceira ($0,5\text{ mg.L}^{-1}$) e segunda ($1,0\text{ mg.L}^{-1}$) subculturas (Figura 23 e Gráfico 9).

Figura 22– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIB



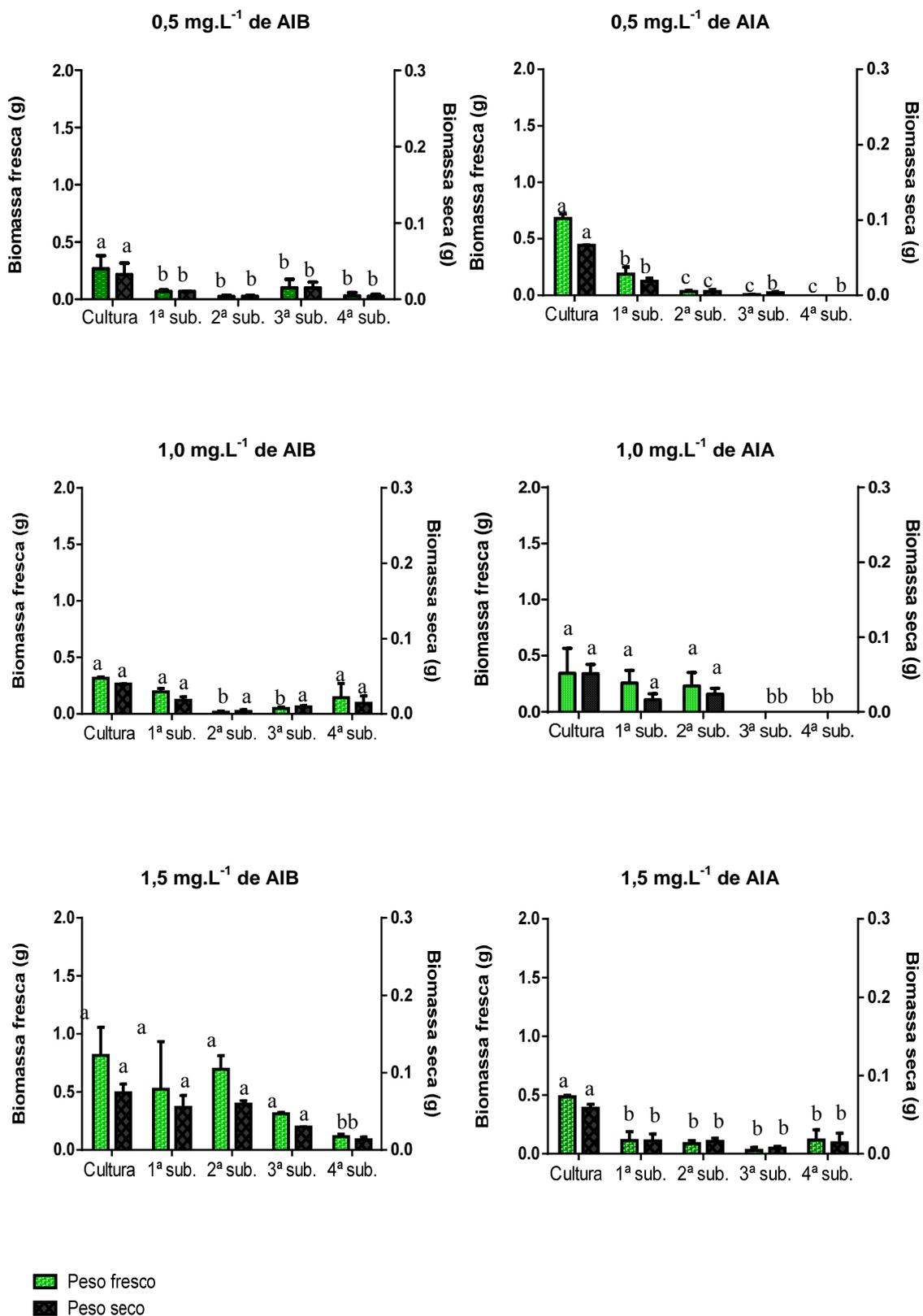
Legenda: Culturas mantidas na presença de luz, acompanhadas por subculturas realizadas a cada 45 dias. Barra = 1 cm.

Figura 23– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA



Legenda: Culturas mantidas na presença de luz, acompanhadas por subculturas realizadas a cada 45 dias. Barra = 1 cm.

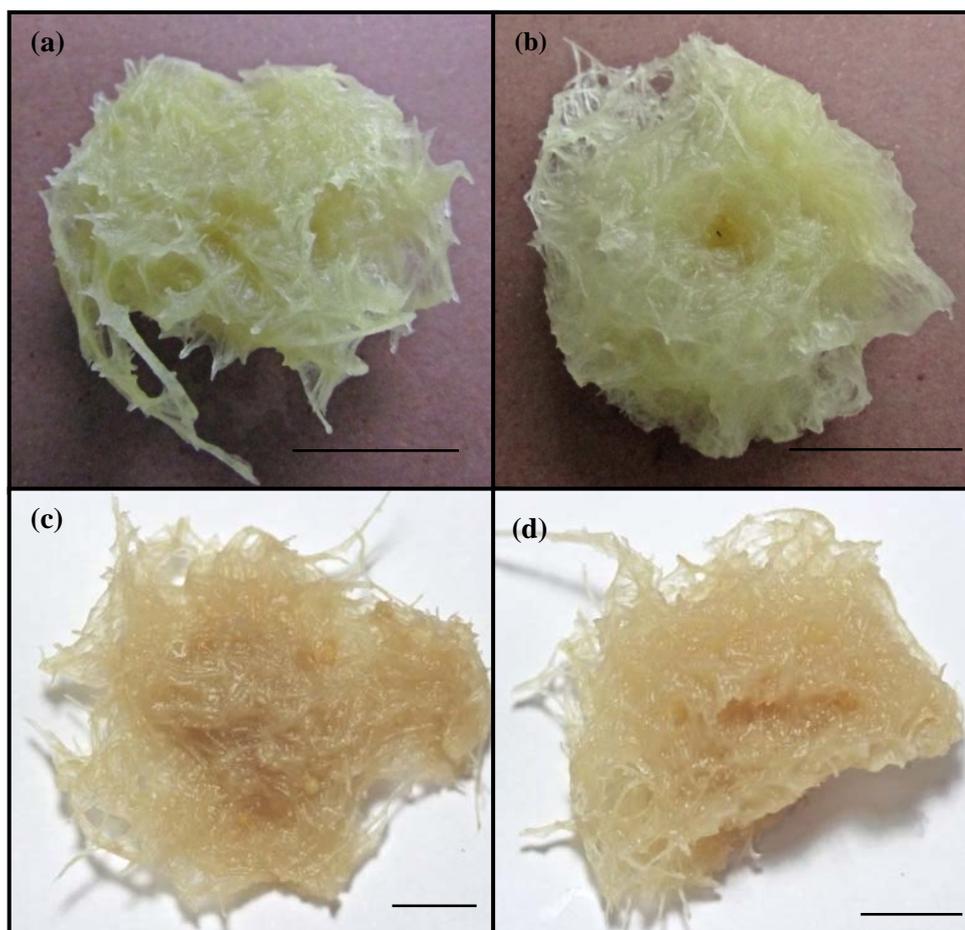
Gráfico 8 – Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com AIB ou AIA, após 45 dias de cultivo



Legenda: Dados obtidos a partir das médias das replicatas. Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

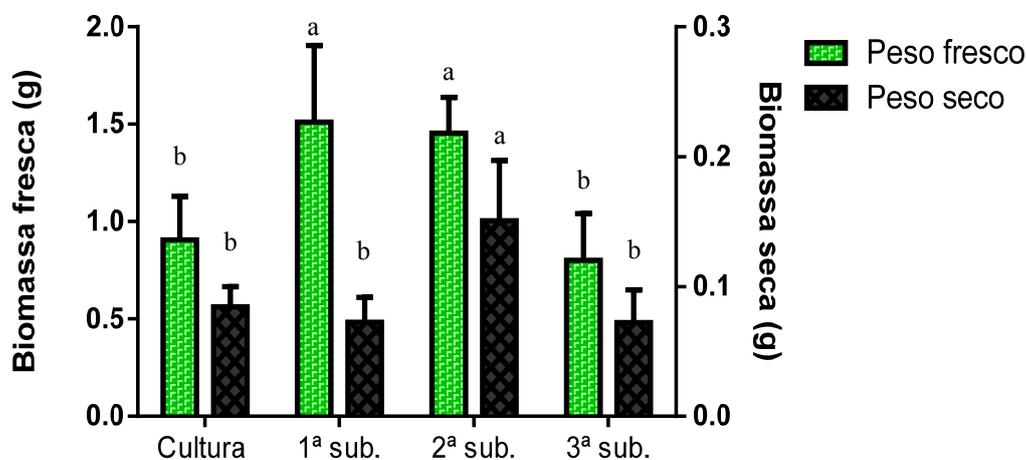
Culturas estabelecidas em meio suplementado com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, mantidas no escuro, ao serem subcultivadas a cada 45 dias mantiveram a capacidade de multiplicação. Nesse tratamento, a proliferação de raízes aumentou na segunda subcultura, mostrando maiores valores de PS (Figura 24 e Gráfico 9). Culturas de raízes mantidas nas mesmas condições acima, mas com subculturas para meio fresco de igual composição em intervalos de 60 dias também apresentaram aumento de biomassa. Entretanto, ao longo das subculturas, os valores de biomassa alcançados foram menores do que os resultados obtidos pelas culturas originais, além de serem gradativamente reduzidos ao longo das subculturas (Figura 25 e Gráfico 10).

Figura 24– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in* em meio MS suplementado com 3 mg.L^{-1} de AIB



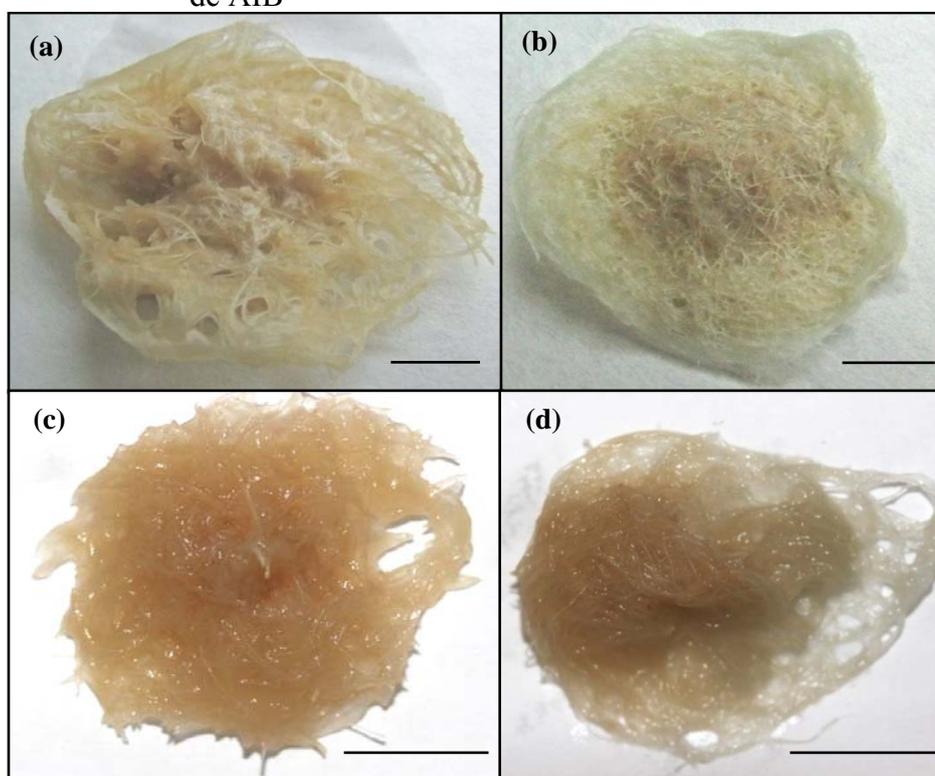
Legenda: Culturas mantidas no escuro avaliadas após (a) –45 dias; (b) –1ª subcultura; (c) –2ª subcultura; (d) –3ª subcultura. Barra = 1 cm.

Gráfico 9 – Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in*em meio MS líquido com 3 mg.L⁻¹ de AIB



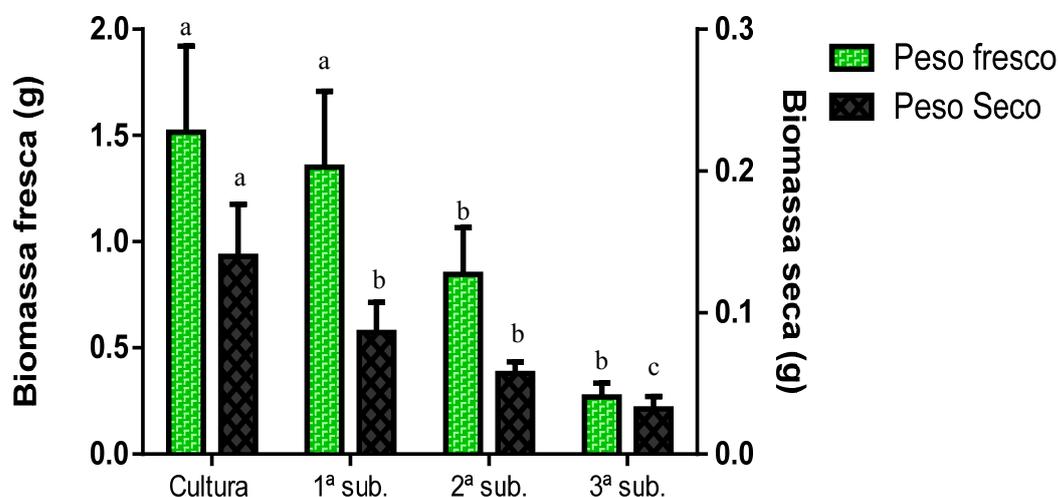
Legenda: Culturas mantidas no escuro, acompanhadas por subculturas realizadas a cada 45 dias. Dados obtidos a partir das médias das replicatas. Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

Figura 25– Culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB



Legenda: Culturas mantidas no escuro avaliadas após (a) – 60 dias; (b) – 1ª subcultura; (c) – 2ª subcultura; (d) – 3ª subcultura. Barra = 1 cm.

Gráfico 10 – Acúmulo de biomassa das culturas de raízes de *C. spinosa*, a partir de explantes radiculares (1,0 cm) de plantas obtidas por germinação *in vitro*, inoculados em meio MS líquido com 3 mg.L⁻¹ de AIB



Legenda: Culturas mantidas no escuro, acompanhadas por subculturas realizadas a cada 60 dias. Dados obtidos a partir das médias das replicatas. Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas da mesma cor significam diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

4.4 Estudos fitoquímicos

4.4.1 Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por CCD dos extratos em n-hexano, diclorometano e acetato de etila apontaram a presença de substâncias das classes dos terpenos e dos compostos fenólicos em raízes coletadas a campo (RC), raízes de plantas propagadas *in vitro* (RIV) e culturas de raízes (C45 e C60) (Tabela 3). Os resultados apresentados a seguir são referentes às melhores condições para separação das bandas.

Tabela 3– Triagem fitoquímica por CCD realizada com os diferentes extratos de *C. spinosa* obtidos a partir de material *in vivo* e *in vitro*

| Material | Extrato | | |
|----------|----------|---------------|------------------|
| | Hexano | Diclorometano | Acetato de etila |
| | Terpenos | | |
| RC | + | + | - |
| RIV | + | + | - |
| C45 | + | + | - |
| C60 | + | + | - |

| Material | Extrato | | |
|----------|---------------------|---------------|------------------|
| | Hexano | Diclorometano | Acetato de etila |
| | Compostos fenólicos | | |
| RC | - | - | + |
| RIV | - | - | - |
| C45 | - | - | - |
| C60 | - | - | - |

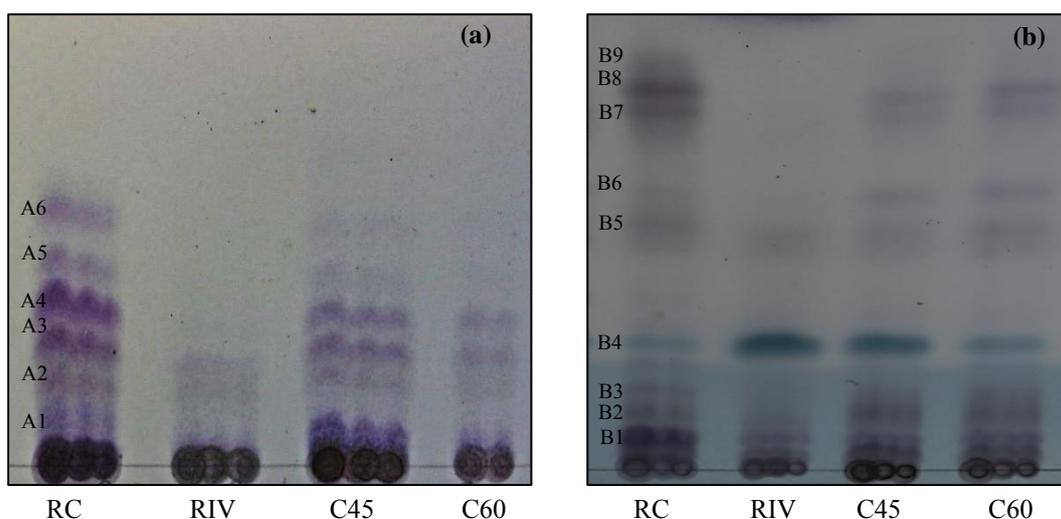
Legenda: (+) = presença e (-) = ausência. Raiz de campo (RC), raiz de planta *in vitro* (RIV), cultura de raízes de 45 dias (C45) e de 60 dias (C60)

As corridas cromatográficas obtidas por CCD dos extratos em hexano revelaram o aparecimento de bandas roxas na base da placa na condição hexano:diclorometano (90:10), sendo que o aumento da polaridade para a condição hexano:diclorometano (50:50) favoreceu uma melhor separação das bandas, visíveis após revelação com solução de vanilina sulfúrica (Figura 26).

Na condição hexano: diclorometano (90:10) foram observadas seis bandas (Figura 26a), sendo as bandas A1 e A2 presentes em todos os extratos, as bandas A3 e A4 nas frações obtidas a partir de RC, C45 e C60 e as bandas A5 e A6 presentes apenas nas frações de RC. Quando o material foi submetido à separação usando o eluente hexano:diclorometano (50:50) foram detectadas nove bandas (Figura 26b), sendo verificada a presença das bandas B1 a B5 em todos os extratos, das bandas B6 a B8

emRC, C45 e C60 e a banda B9 apenas em RC. Para o revelador utilizado, bandas de coloração roxa são indicativos da presença de substâncias da classe dos terpenos (WAGNER; BLADT,2001).

Figura 26 – CCD dos extratos em hexano de raiz coletada a campo (RC), raiz *in vitro* (RIV), cultura de raízes de 45 dias (C45) e de 60 dias (C60) de *C. spinosa*



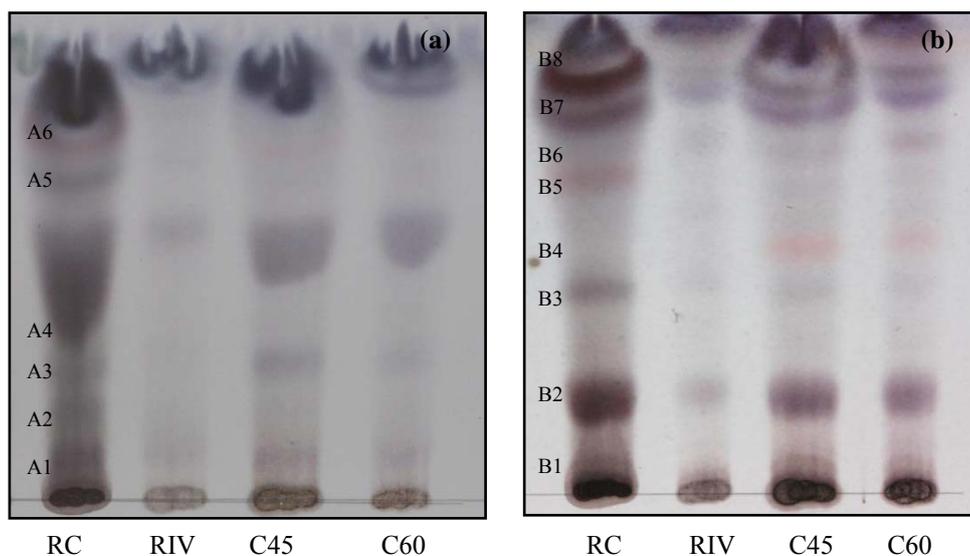
Legenda: (a)– hexano:diclorometano (90: 10);(b)– hexano:diclorometano (50: 50). Os números indicam as bandas reveladas com solução de vanilina sulfurada.

As placas dos extratos obtidos em diclorometano apresentaram bandas de coloração rosa claro à roxa escura após revelação com solução de vanilina sulfúrica (Figura 27). Na condição diclorometano:acetato de etila (50:50) foram observadas seis bandas (Figura 27a), das quais a banda A4 (substâncias que não foram separadas) estava presente em todos os materiais avaliados, sendo que em RIV as manchas se apresentavam bem claras. As demais bandas (A1, A2, A3, A5 e A6) foram detectadas em RC, C45 e C60.

Nas análises realizadas com o eluente acetato de etila 100% foram reveladas oito bandas (Figura 27b), sendo as bandas B1, B2, B6 e B7 presentes em todos os extratos, as bandas B3 e B8 visualizadas em RC, C45 e C60, a banda B5 presente apenas em material coletado a campo (RC) e a banda B4 detectada apenas nas culturas de raízes

(C45 e C60). As amostras obtidas das frações em diclorometano apresentaram um perfil cromatográfico semelhante aos das frações em hexano, com indicativo de terpenos, em função das colorações rosa a roxa das bandas reveladas com vanilina sulfúrica.

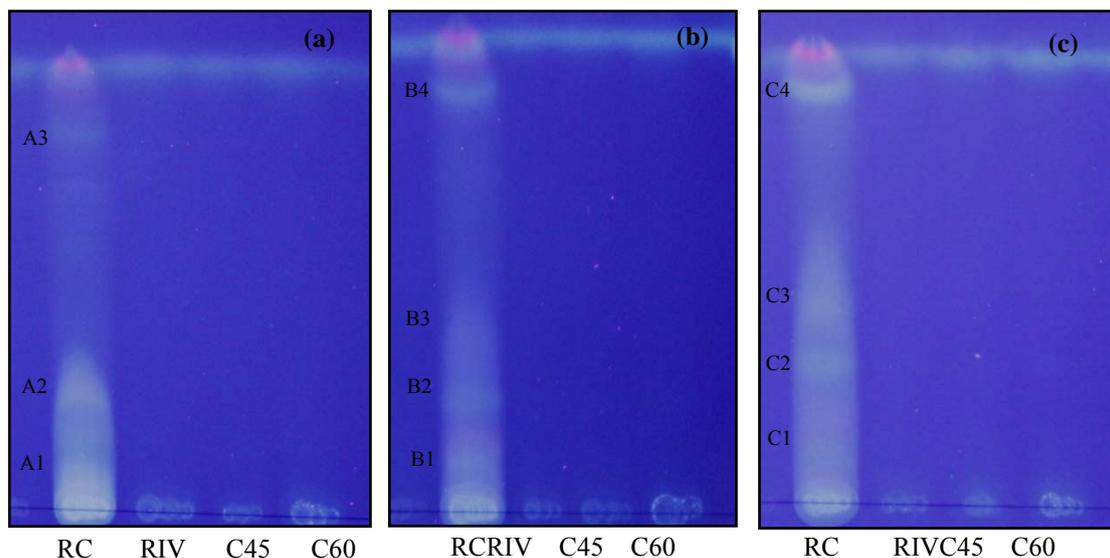
Figura 27 – CCD dos extratos em diclorometano de raiz coletada a campo (RC), raiz *in vitro* (RIV), culturas de raízes de 45 dias (C45) e de 60 dias (C60) de *C. spinosa*



Legenda: (a)– diclorometano:acetato de etila (50:50); (b)– acetato de etila 100%. Os números indicam as bandas reveladas com solução de vanilina sulfurada.

As placas obtidas dos extratos em acetato de etila reveladas com solução NP/PEG apresentaram bandas fluorescentes sob luz UV_{365nm} , apenas para o material preparado com raízes coletadas a campo (RC) (Figura 28). O sistema diclorometano:acetato de etila (75:25) revelou três bandas, sendo as duas primeiras grandes e difusas (Figura 28a). Quando o material foi eluído em diclorometano:acetato de etila (50:50) ocorreu uma melhor separação das bandas, com a revelação de quatro bandas (Figura 28b). Um perfil semelhante foi obtido quando a condição acetato de etila 100% foi empregada (Figura 28c).

Figura 28 – CCD dos extratos em acetato de etila de raízes coletada a campo (RC), raiz *in vitro* (RIV), cultura de raízes de 45 dias (C45) e de 60 dias (C60) de *C. spinosa*



Legenda: (a)– diclorometano:acetato de etila (75:25); (b)– diclorometano:acetato de etila 50%;(c)– acetato de etila 100%. Os números indicam as bandas reveladas com solução NP/PEG.

4.4.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV acoplada à espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (CLAE-UV-EM-IES)

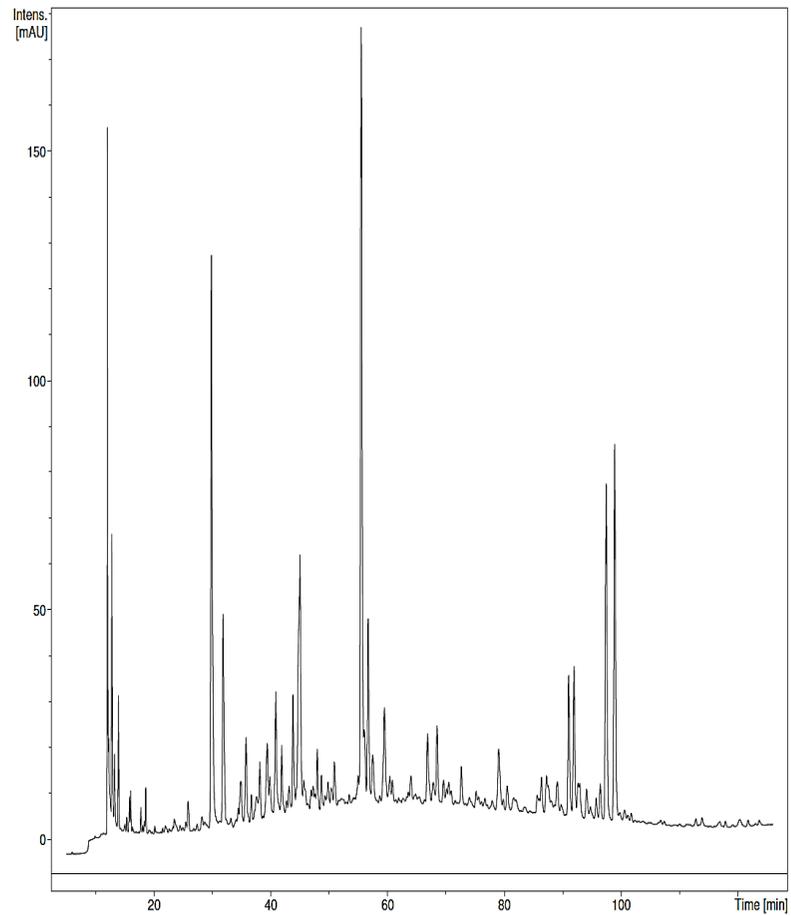
Uma vez que as análises prévias por CCD evidenciaram bandas indicativas de substâncias fenólicas nos extratos em acetato de etila, utilizou-se a técnica de CLAE-UV-EM-IES em função da sua alta sensibilidade e resolução.

Os cromatogramas dos extratos de RC apresentam diversos picos, mostrando a presença de grande quantidade de substâncias que absorvem em 254 nm (Figura 29a). O pico 1 com tempo de retenção (tR) próximo de 15 minutos está presente em todas as amostras. Nas amostras de raízes propagadas *in vitro* e nas culturas de raízes (Figura 29b–30) foram observados picos semelhantes a partir do tR 70 minutos.

Figura 29– Cromatogramas por CLAE-UV_{254nm} dos extratos em acetato de etila de raízes de *C. spinosa*

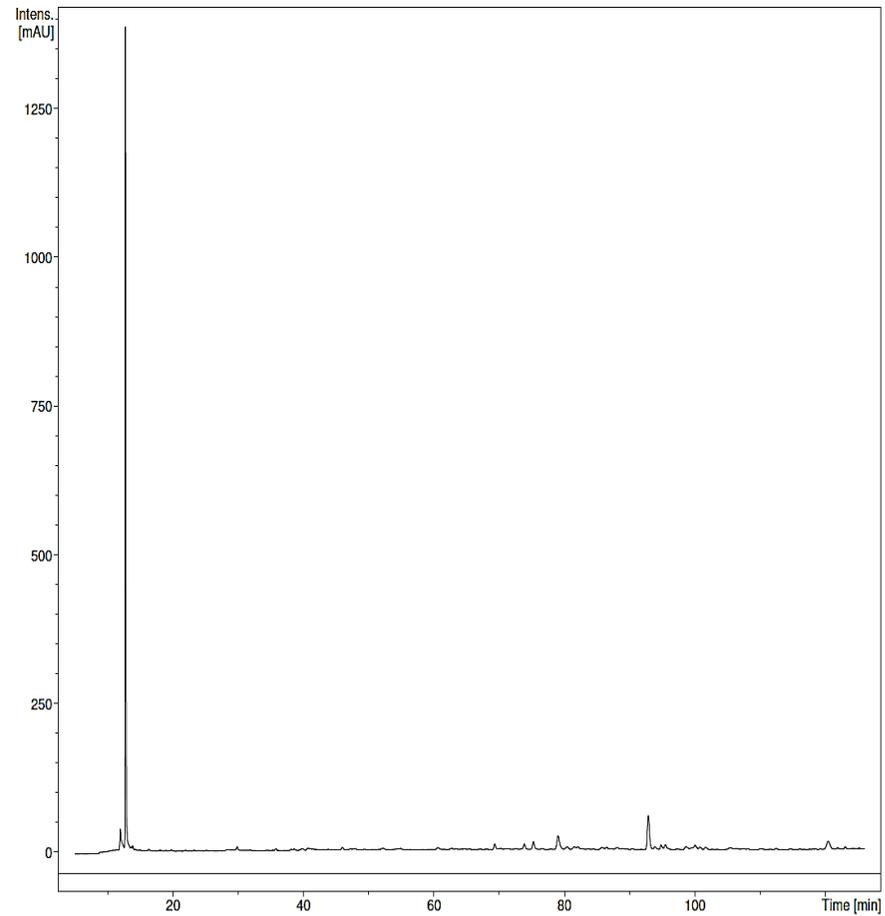
Total Chromatogram Runtime: 126.12 min

Signal 1: UV (254.0nm)



Total Chromatogram Runtime: 126.12 min

Signal 1: UV (254.0nm)

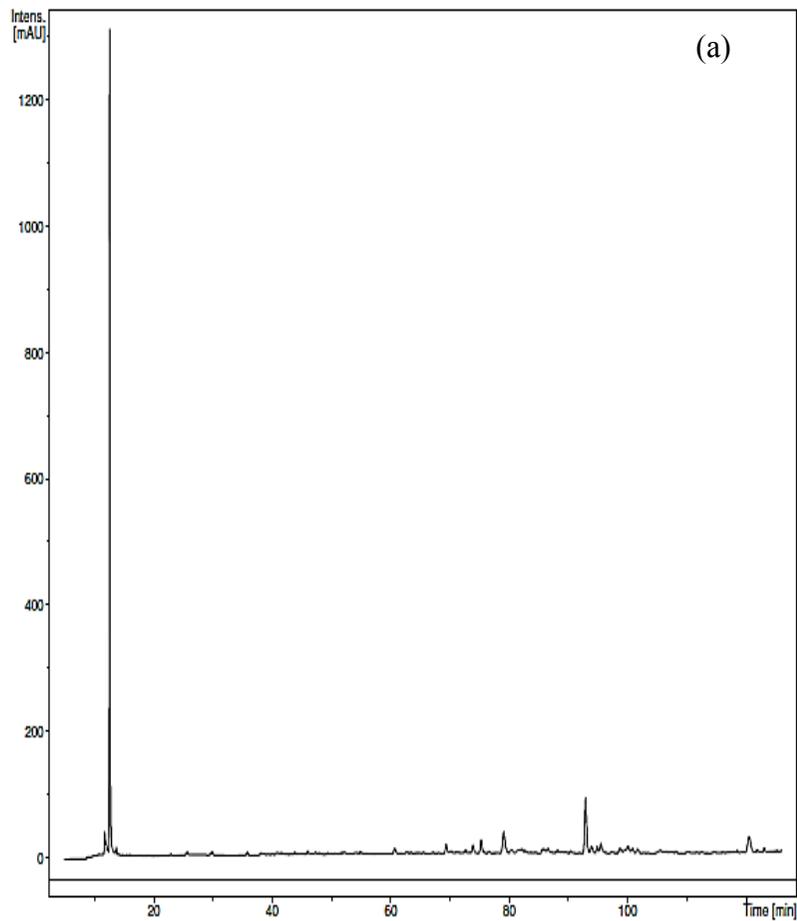


Legenda: (a)– raízes coletadas a campo; (b) –raízes de plantas propagadas *in vitro*.

Figura 30 – Cromatogramas por CLAE-UV_{254nm} dos extratos em acetato de etila de raízes de *C. spinosa*

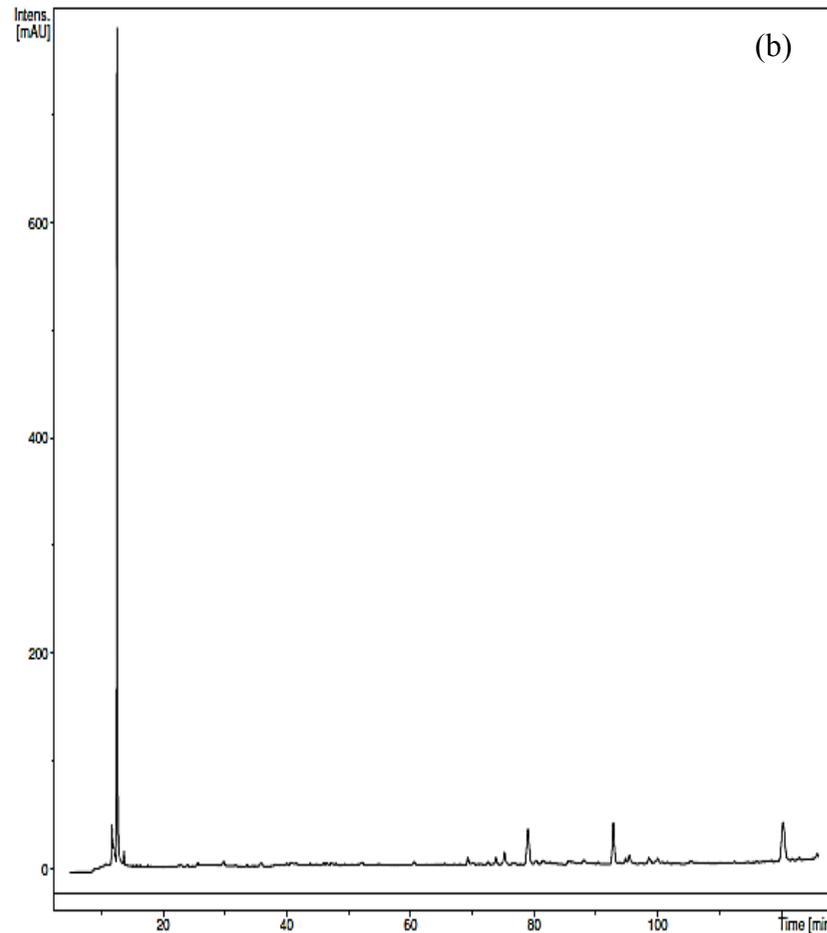
Total Chromatogram Runtime: 126.12 min

Signal 1: UV (254.0nm)



Total Chromatogram Runtime: 126.12 min

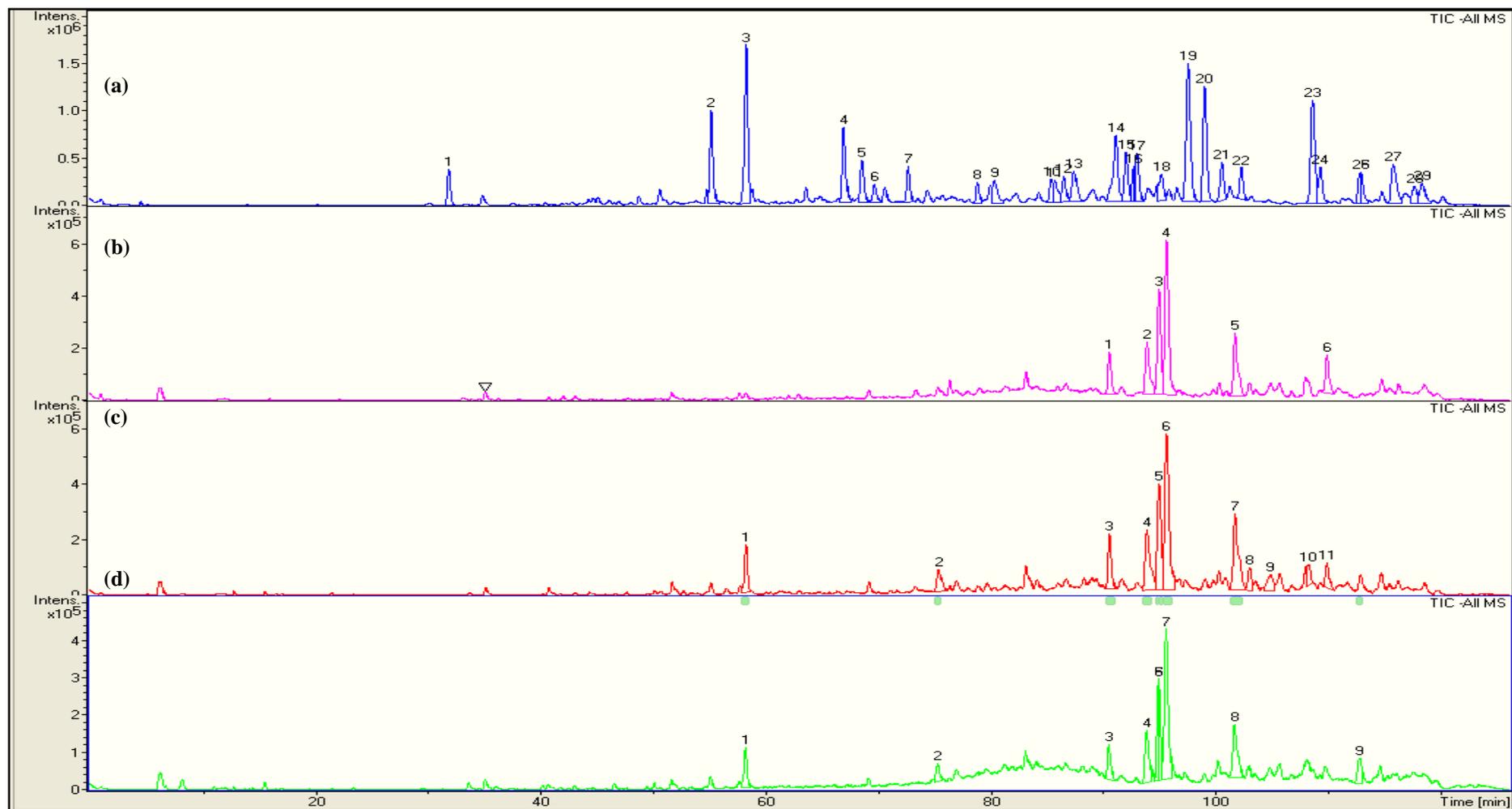
Signal 1: UV (254.0nm)



Legenda: (a)–culturas de raízes de 45 dias e (b) –de 60 dias de *C. spinosa* obtidas por germinação *in vitro*, em meio MS com 3 mg.L⁻¹ de AIB, no escuro.

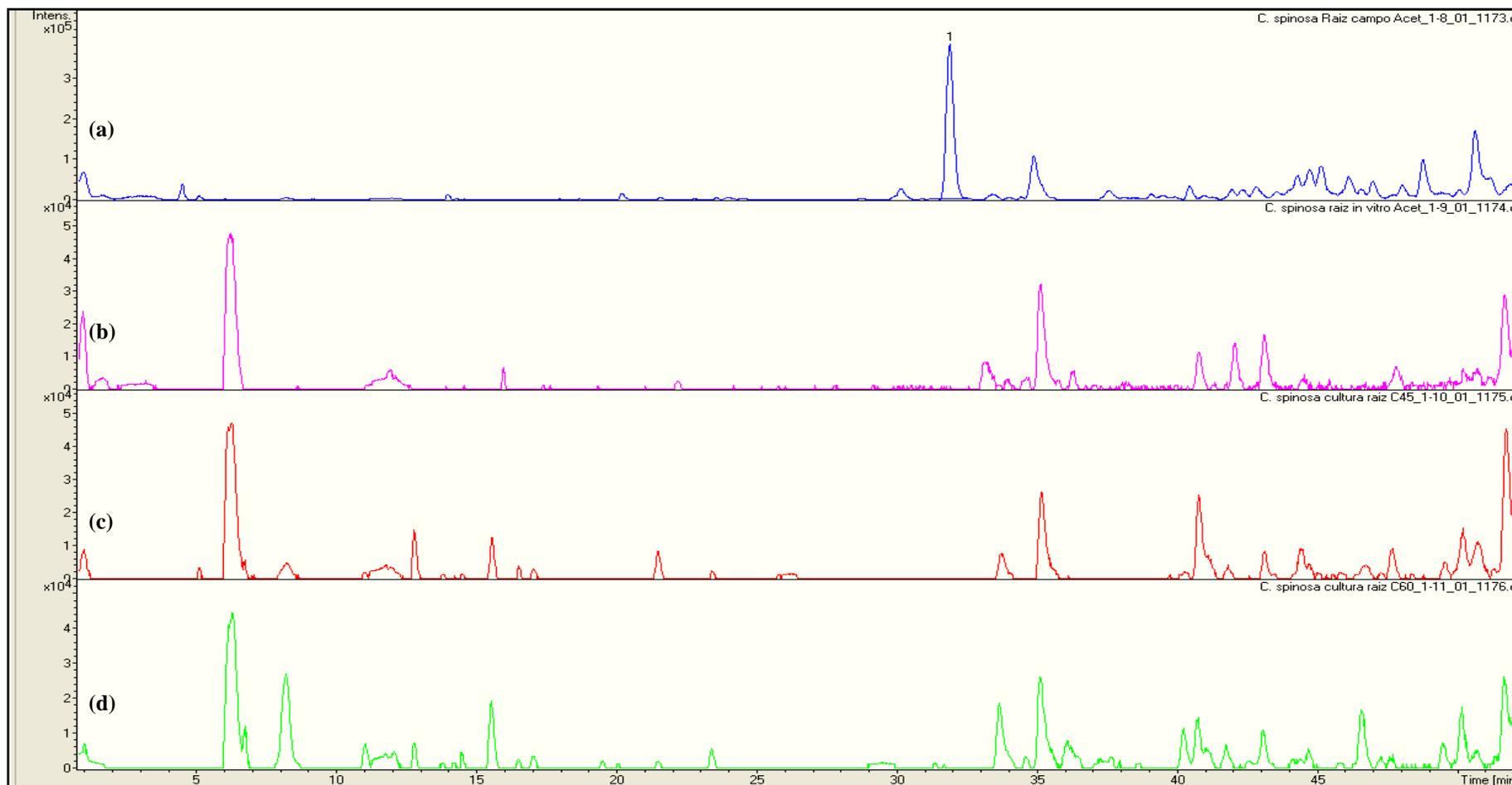
A partir da análise dos cromatogramas obtidos foi possível observar que o perfil apresentado pelo material coletado a campo (RC) mostrou-se bastante distinto daqueles observados para os materiais obtidos *in vitro* (RIV, C45 e C60) (Figura 31). Para os materiais obtidos *in vitro*, as análises mostraram um perfil semelhante, tanto para as raízes de plantas propagadas *in vitro* (RIV), como para as culturas de raízes (C45 e C60). A observação dos cromatogramas apresentados na Figura 31 sugere que as amostras do material obtido a campo apresentam maior quantidade de constituintes fitoquímicos quando comparado ao material *in vitro*. Entretanto, a observação das ampliações dos cromatogramas, como é mostrado na Figura 32 para as análises durante os tempos de retenção de 0 a 15 minutos, evidenciam uma expressiva diversidade química no material *in vitro* não apresentada no material de campo.

Figura 31– Cromatogramas por CLAE-UV-EM-IES dos extratos em acetato de etila de *C. spinosa*



Legenda: (a)– raízes coletadas a campo; (b) –raízes de plantas propagadas *in vitro*; (c) –culturas de raízes de 45 dias e (d) –de 60 dias.

Figura 32– Cromatogramas por CLAE-EM-IES dos extratos em acetato de etila de *C. spinosa*



Legenda: (a)– raízes coletadas a campo; (b) –raízes de plantas propagadas *in vitro*; (c) –culturas de raízes de 45 dias e (d) – de 60 dias. Os dados apresentados correspondem apenas aos primeiros 45 minutos da corrida.

A análise dos espectros de massas foi possível a detecção de um total de 51 substâncias presentes nos materiais avaliados, sendo observadas desde o tempo de retenção de 6,3 minutos até 116,20 minutos. Esses resultados estão reunidos na Tabela 4, considerando o tempo de retenção e a razão massa/ carga (m/z) das moléculas detectadas.

Dessas substâncias, 60% foram detectadas apenas nos materiais *in vitro*. Considerando as m/z observadas foi possível sugerir a que classes químicas pertencem algumas das substâncias encontradas.

A partir da comparação com o *MassBank* foi possível sugerir a identificação da presença de três substâncias pertencentes à classe dos flavonoides. O pico de tR entre 74,8 e 75,6 com m/z 283,1 (Figuras 33), presente apenas nos materiais *in vitro*, é característico da substância vogonina. O pico de tR entre 57,5 e 58,4 minutos com m/z 329 (Figura 34), detectado tanto nos materiais *in vivo* como nos *in vitro* é indicativo da substância cirsiol. O pico de tR 101,7 minutos com m/z 433,2 (Figura 35), encontrado apenas em raiz *in vitro*, é característico da substância reinutrina.

Figura 33– Espectro de massas da substância vogonina (tR 75,4 e m/z 283,1) encontrado em raízes de plantas propagadas *in vitro* e em culturas de raízes de *C. spinosa*

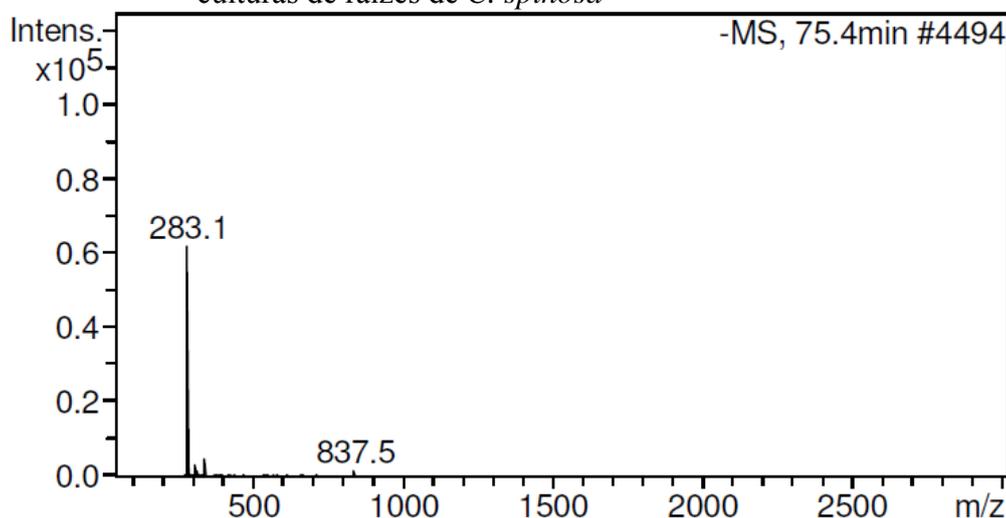


Figura 34– Espectro de massas da substância cirsiliol (tR 58,4 e m/z 329,2), encontrado em raízes de plantas coletadas a campo, raízes de plantas propagadas *in vitro* e em culturas de raízes de *C. spinosa*

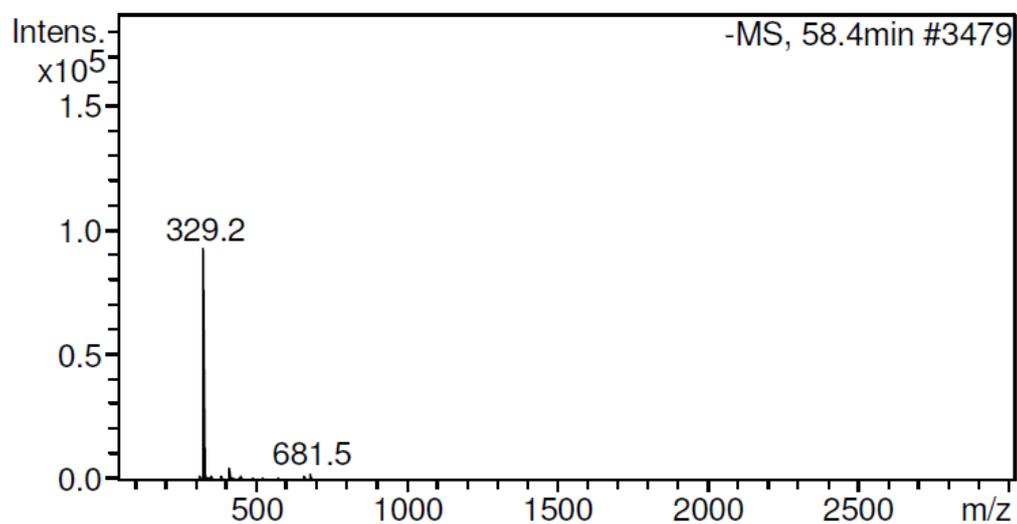


Figura 35– Espectro de massas da substância reinutrina (tR 101,7 e m/z433,2), encontrado em raízes de plantas propagadas

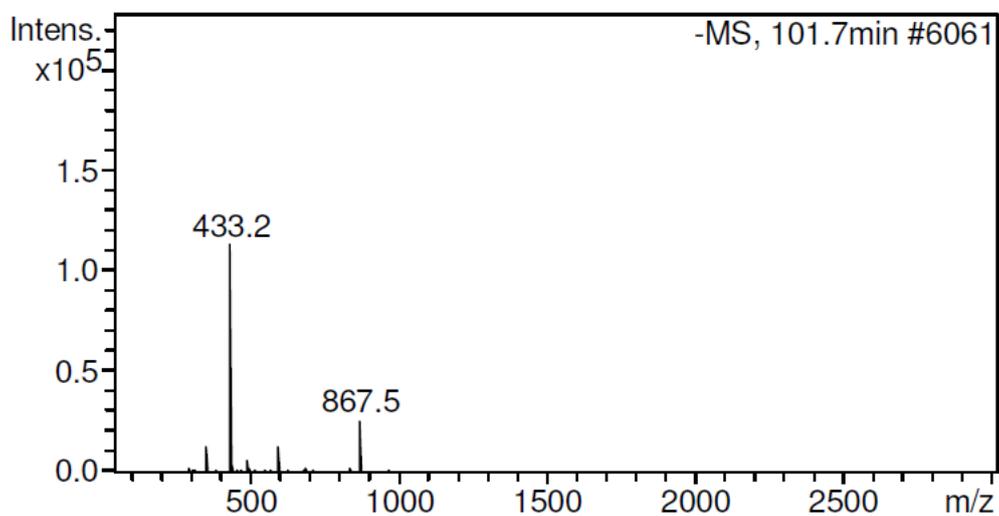


Tabela 4 – Listagem dos constituintes fitoquímicos detectados por CLAE-UV-EM-IES em extratos obtidos em acetato de etila a partir de raízes de *C. spinosa* coletadas a campo (RC), raízes de plantas propagadas *in vitro* (RIV) e culturas de raízes mantidas por tempo de cultivo de 45 dias (C45)

| tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) |
|-----------|------------------|--|-----------|-----------------|--|-------------|-----------------|--|
| 6,3 | RC | - | 31,9 | RC | 384,1 (100%) 385,1 (14%) 386,1 (5%) | 35,1 – 35,9 | RC | - |
| | RIV | 359,1 (100%) 479,1 (66%) 367,1 (27%) | | RIV | - | | RIV | 487,3 (100%) 511,4 (60%) 489,3 (34%) |
| | C ₄₅ | 359,1 (100%) 479,1 (46%) 367,1 (23%) | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | 487,3 (100%) 511,4 (69%) 489,3 (33%) |
| 12,8 | RC | - | 33,8 | RC | 322,1 (100%) 341,1 (27%) 305,0 (19%) | 40,8 | RC | 381,1 (100%) 382,1 (16%) 383,1 (7%) |
| | RIV | - | | RIV | 322,1 (100%) 341,1 (44%) 305,0 (43%) | | RIV | 381,1 (100%) 382,1 (16%) 383,1 (7%) |
| | CR ₄₅ | 279,1 (100%) 430,1 (92%) 581,1 (63%) | | C ₄₅ | 322,1 (100%) 487,3 (21%) 511,4 (18%) | | C ₄₅ | 381,1 (100%) 382,1 (17%) 383,1 (7%) |
| 15,6 | RC | - | 34,9 | RC | 368,1 (100%) 369,1 (17%) 370,1 (5%) | 42,1 | RC | - |
| | RIV | - | | RIV | - | | RIV | 523,2 (100%) 524,2 (30%) 605,2 (13%) |
| | C ₄₅ | 311,1 (100%) 396,2 (25%) 312,1 (14%) | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | - |

Tabela 4 – Listagem dos constituintes fitoquímicos detectados por CLAE-UV-EM-IES em extratos obtidos em acetato de etila a partir de raízes de *C. spinosa* coletadas a campo (RC), raízes de plantas propagadas *in vitro* (RIV) e culturas de raízes mantidas por tempo de cultivo de 45 dias (C45) (continua)

| tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) |
|-----------|-----------------|--|-----------|-----------------|--|-------------|-----------------|--|
| 43,1 | RC | | 48,8 | RC | 334,1 (100%) 669,2 (37%) 370,1 (34%) | 54,8 – 55,6 | RC | 327,2 (100%) 328,2 (17%) 677,4 (8%) |
| | RIV | 411,1 (100%) 412,1 (19%) 413,1 (8%) | | RIV | - | | RIV | - |
| | C ₄₅ | 411,1 (100%) 412,1 (25%) 476,2 (22%) | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | 327,2 (100%) 328,2 (22%) 492,2 (7%) |
| 44,4 | RC | - | 50,6 | RC | 297,1 (100%) 298,1 (17%) 595,2 (14%) | 56,6 | RC | - |
| | RIV | 343,2 (100%) 344,2 (17%) 498,2 (5%) | | RIV | - | | RIV | 345,2 (100%) 346,2 (23%) 369,1 (11%) |
| | C ₄₅ | 343,2 (100%) 344,2 (21%) 498,2 (17%) | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | 345,2 (100%) 346,2 (20%) 369,1 (13%) |
| 47,7 | RC | - | 51,7 | RC | - | 57,6 – 58,4 | RC | 329,2 (100%) 330,2 (18%) 659,5 (11%) |
| | RIV | 343,2 (100%) 387,0 (41%) 344,2 (18%) | | RIV | 435,2 (100%) 496,2 (56%) 375,2 (16%) | | RIV | 329,2 (100%) 330,2 (20%) 417,2 (12%) |
| | C ₄₅ | 343,2 (100%) 344,2 (20%) 387,0 (10%) | | C ₄₅ | 496,2 (100%) 435,2 (67%) 497,2 (27%) | | C ₄₅ | 329,2 (100%) 330,2 (18%) 411,2 (5%) |

Tabela 4 – Listagem dos constituintes fitoquímicos detectados por CLAE-UV-EM-IES em extratos obtidos em acetato de etila a partir de raízes de *C. spinosa* coletadas a campo (RC), raízes de plantas propagadas *in vitro* (RIV) e culturas de raízes mantidas por tempo de cultivo de 45 dias (C45) (continuação)

| tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) |
|-----------|-----------------|--|-----------|-----------------|--|-------------|-----------------|--|
| 62,9 | RC | - | 69,7 | RC | 306,1 (100%) 307,1 (15%) 635,2 (8%) | 73,4 | RC | - |
| | RIV | 361,2 (100%) 362,2 (22%) 311,2 (12%) | | RC | - | | RIV | 587,3 (100%) 588,3 (30%) 309,2 (27%) |
| | C ₄₅ | 361,2 (100%) 311,2 (32%) 362,2 (20%) | | RIV | 361,2 (100%) 362,2 (22%) 311,2 (12%) | | C ₄₅ | 587,3 (100%) 309,2 (88%) 588,3 (32%) |
| | RC | 544,1 (100%) 545,1 (25%) 546,1 (12%) | | RC | 306,1 (100%) 307,1 (15%) 308,1 (5%) | | RC | - |
| | RIV | - | | RIV | - | | RIV | 283,1 (100%) 341,1 (33%) 284,1 (21%) |
| | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | 283,1 (100%) 284,1 (16%) 341,1 (8%) |
| 68,6 | RC | - | 70,6 | RC | 305,2 (100%) 309,2 (38%) 306,2 (17%) | 74,8 – 75,6 | RC | - |
| | RIV | 335,1 (100%) 529,3 (56%) 507,3 (47%) | | RIV | - | | RIV | 601,3 (100%) 602,3 (32%) 623,3 (12%) |
| | C ₄₅ | 335,1 (100%) 529,3 (69%) 507,3 (65%) | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | 601,3 (100%) 602,3 (30%) 623,3 (14%) |
| | RC | - | | RC | - | | RC | - |
| | RIV | - | | RIV | - | | RIV | - |
| | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | - |
| 69,2 | RC | - | 72,7 | RC | 305,2 (100%) 309,2 (38%) 306,2 (17%) | 76,4 | RC | - |
| | RIV | 335,1 (100%) 529,3 (56%) 507,3 (47%) | | RIV | - | | RIV | 601,3 (100%) 602,3 (32%) 623,3 (12%) |
| | C ₄₅ | 335,1 (100%) 529,3 (69%) 507,3 (65%) | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | 601,3 (100%) 602,3 (30%) 623,3 (14%) |
| | RC | - | | RC | - | | RC | - |
| | RIV | - | | RIV | - | | RIV | - |
| | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | - |

Tabela 4 – Listagem dos constituintes fitoquímicos detectados por CLAE-UV-EM-IES em extratos obtidos em acetato de etila a partir de raízes de *C. spinosa* coletadas a campo (RC), raízes de plantas propagadas *in vitro* (RIV) e culturas de raízes mantidas por tempo de cultivo de 45 dias (C45) (continuação)

| tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) |
|-----------------|--|--|---|-----------------|--|-------------|-----------------|---|
| 77,0 | RC | - | 83,1 | RC | - | 86,7 – 87,5 | RC | 309,2 (100%) |
| | | | | | | | | 293,2 (22%) |
| | RIV | - | | RIV | - | | 310,2 (16%) | |
| | | | | | | | 281,2 (100%) | |
| | | | | | | | 315,3 (73%) | |
| | | | | | | | 309,2 (67%) | |
| C ₄₅ | 326,1 (100%) 445,2 (84%) 299,1 (74%) | C ₄₅ | 585,3 (100%) 586,3 (35%) 297,1 (9%) | C ₄₅ | 309,2 (100%) 315,3 (67%) 327,1 (41%) | | | |
| | | | | | | | | |
| 78,8 | RC | 313,2 (100%) 314,2 (18%) 395,2 (6%) | 85,4 | RC | 285,2 (100%) 307,2 (20%) 286,2 (14%) | 88,3 | RC | - |
| | | | | | | | | - |
| | RIV | - | | RIV | - | | RIV | - |
| | | | | | | | | |
| | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | 375,2 (100%) 355,2 (85%) 281,2 (65) |
| | | | | | | | | |
| 80,3 | RC | 313,2 (100%) 314,2 (18%) 307,2 (14%) | 86,5 | RC | 293,2 (100%) 294,2 (18%) 315,3 (16%) | 90,5 | RC | - |
| | | | | | | | | - |
| | RIV | - | | RIV | - | | RIV | 511,3 (100%) 512,3 (31%) 513,3 (5%) |
| | | | | | | | | |
| | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | - | | C ₄₅ | 511,3 (100%) 512,3 (30%) 513,3 (5%) |
| | | | | | | | | |

Tabela 4 – Listagem dos constituintes fitoquímicos detectados por CLAE-UV-EM-IES em extratos obtidos em acetato de etila a partir de raízes de *C. spinosa* coletadas a campo (RC), raízes de plantas propagadas *in vitro* (RIV) e culturas de raízes mantidas por tempo de cultivo de 45 dias (C45) (continuação)

| tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) |
|-----------------|--------------|--------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|-----------|------------|--------------------------|
| 91,1 | RC | 291,2 (100%) | 95,0 - 95,2 | RC | 293,2 (100%) | 100,3 | RC | - |
| | | 292,2 (14%) | | | 294,2 (17%) | | | - |
| | | 311,2 (8%) | | | 375,2 (13%) | | | - |
| | RIV | - | | RIV | 627,3 (100%) | | RIV | 869,4 (100%) |
| | | - | | | 628,3 (35%) | | | 870,4 (57%) |
| | | - | | | 1195,6 (15%) | | | 355,2 (38%) |
| C ₄₅ | - | C ₄₅ | 627,3 (100%) | C ₄₅ | 869,4 (100%) | | | |
| | - | | 628,3 (35%) | | 355,2 (57%) | | | |
| | - | | 1195,6 (16%) | | 870,4 (53%) | | | |
| 93,0 | RC | 295,2 (100%) | 95,4 - 95,7 | RC | - | 100,5 | RC | 293,2 (100%) |
| | | 296,2 (21%) | | | - | | | 294,2 (16%) |
| | | 613,4 (8%) | | | - | | | 375,2 (8%) |
| | RIV | - | | RIV | 627,3 (100%) | | RIV | - |
| | | - | | | 628,3 (35%) | | | - |
| | | - | | | 629,3 (8%) | | | - |
| C ₄₅ | 567,3 (100%) | C ₄₅ | 627,3 (100%) | C ₄₅ | - | | | |
| | 568,3 (33%) | | 628,3 (34%) | | - | | | |
| | 569,3 (6%) | | 629,3 (7%) | | - | | | |
| 93,9 | RC | - | 99,0 | RC | 293,2 (100%) | 101,7 | RC | - |
| | | - | | | 294,2 (16%) | | | - |
| | | - | | | 609,4 (5%) | | | - |
| | RIV | 567,3 (100%) | | RIV | - | | RIV | 433,2 (100%) |
| | | 568,3 (32%) | | | - | | | 434,2 (26%) |
| | | 627,3 (7%) | | | - | | | 867,5 (23%) |
| C ₄₅ | - | C ₄₅ | - | C ₄₅ | - | | | |
| | - | | - | | - | | | |

Tabela 4 – Listagem dos constituintes fitoquímicos detectados por CLAE-UV-EM-IES em extratos obtidos em acetato de etila a partir de raízes de *C. spinosa* coletadas a campo (RC), raízes de plantas propagadas *in vitro* (RIV) e culturas de raízes mantidas por tempo de cultivo de 45 dias (C45) (conclusão)

| tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) | tR (min.) | Ocorrência | [M-H] ⁻ (m/z) |
|------------------|-----------------|--------------------------|---------------|-----------------|--------------------------|-----------|-----------------|--------------------------|
| 102,2 – 102,9 | RC | 295,2 (100%) | 108,0 – 108,8 | RC | 295,2 (100%) | 114,7 | RC | - |
| | | 296,2 (20%) | | | 296,2 (19%) | | | - |
| | | 377,2 (11%) | | | 591,5 (7%) | | | - |
| | RIV | 295,2 (100%) | | RIV | 487,3 (100%) | | RIV | 717,4 (100%) |
| | | 377,2 (27%) | | | 585,3 (43%) | | | 718,4 (48%) |
| | | 296,2 (20%) | | | 488,3 (24%) | | | 667,4 (28%) |
| | C ₄₅ | 295,2 (100%) | | C ₄₅ | 339,2 (100%) | | C ₄₅ | 717,4 (100%) |
| | | 377,2 (21%) | | | 585,3 (89%) | | | 718,4 (47%) |
| | | 296,2 (19%) | | | 297,2 (88%) | | | 667,4 (26%) |
| 104,9 | RC | - | 109,2 – 110,0 | RC | 341,3 (100%) | 115,7 | RC | 271,2 (100%) |
| | | - | | | 342,3 (19%) | | | 543,5 (77%) |
| | | - | | | 363,3 (14%) | | | 544,5 (21%) |
| | RIV | 299,2 (100%) | | RIV | 297,2 (100%) | | RIV | - |
| | | 381,2 (34%) | | | 298,2 (17%) | | | - |
| | | 300,2 (20%) | | | 379,2 (13%) | | | - |
| | C ₄₅ | 299,2 (100%) | | C ₄₅ | 297,2 (100%) | | C ₄₅ | - |
| | | 382,2 (32%) | | | 298,2 (18%) | | | - |
| | | 381,2 (31%) | | | 379,2 (13%) | | | - |
| 105,7 | RC | - | 112,1 – 112,9 | RC | 277,2 (100%) | 116,2 | RC | - |
| | | - | | | 278,2 (16%) | | | - |
| | | - | | | 577,4 (6%) | | | - |
| | RIV | 795,4 (100%) | | RIV | 277,2 (100%) | | RIV | 623,4 (100%) |
| | | 796,4 (45%) | | | 278,2 (25%) | | | 624,4 (36%) |
| | | 641,4 (24%) | | | - | | | 367,4 (24%) |
| | C ₄₅ | 795,4 (100%) | | C ₄₅ | 277,2 (100%) | | C ₄₅ | 623,4 (100%) |
| | | 796,4 (46%) | | | 278,2 (21%) | | | 624,4 (35%) |
| | | 641,4 (26%) | | | 359,2 (21%) | | | - |

4.4.3 Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A análise dos extratos em diclorometano não apresentaram picos nos cromatogramas, evidenciando a ausência de substâncias voláteis nesses extratos. Já os cromatogramas dos extratos em hexano mostraram uma mistura complexa de substâncias nos primeiros 70 minutos da corrida, não permitindo sua identificação (Figura 36). Este resultado provavelmente é consequência do uso de extratos brutos sem fracionamento. Entretanto, a partir do tempo de retenção em 70 minutos foi possível a observação de picos mais individualizados nos cromatogramas dos extratos de raízes de plantas coletadas a campo (Figura 37a) e de culturas de raízes (Figura 37b). Através da biblioteca de espectros de massas foi possível sugerir a identificação (similaridade de 90% com os dados da biblioteca) de alguns esteroides (Tabela 5).

A presença dos esteroides detectados pela análise em CG-EM corroboram os resultados obtidos pela CCD quanto à presença de terpenos tanto nos extratos de material coletado a campo como nos materiais obtidos *in vitro*.

Figura 36– Cromatograma por CG-EM do extrato em hexano obtido a partir de raízes coletadas a campo de *C. spinosa*

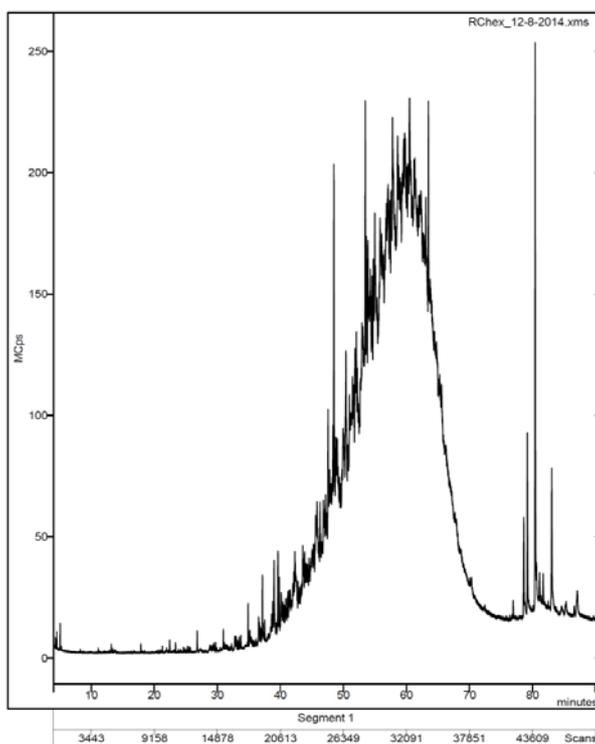
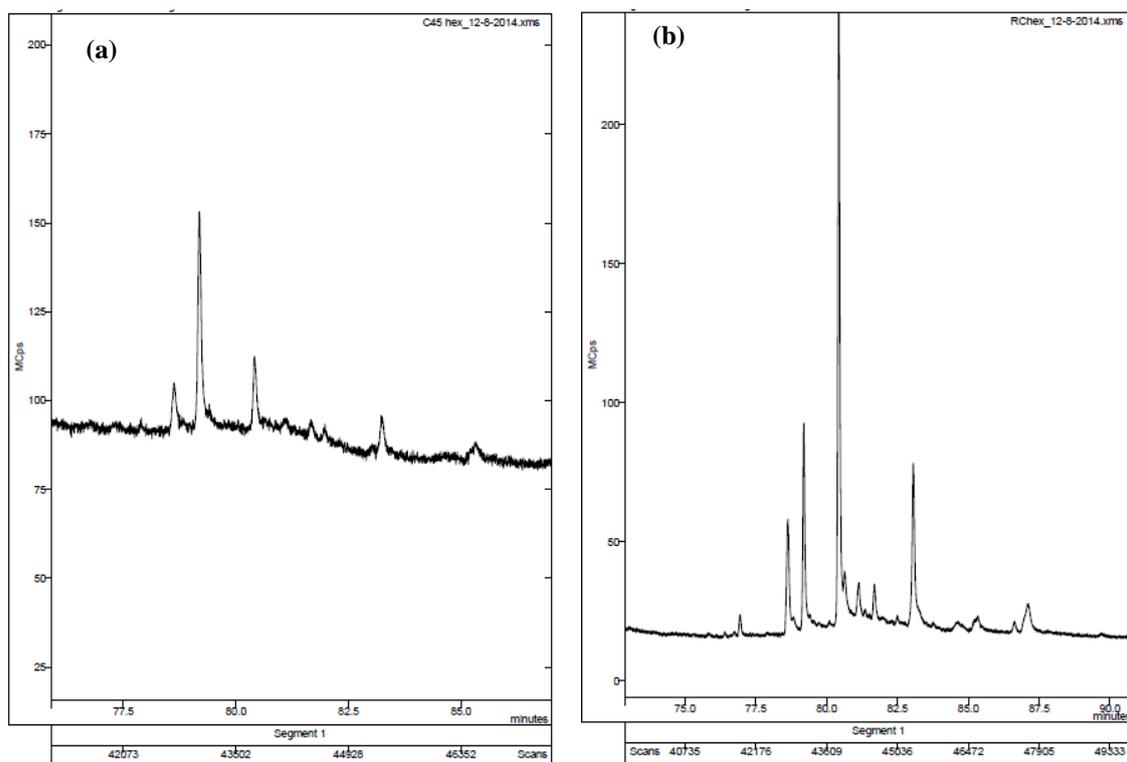


Figura 37 – Cromatogramas por CG-EM dos extratos em hexano de *C. spinosa*



Legenda: (a) – a partir de raízes coletadas a campo; (b) – a partir de culturas de raízes de 45 dias. As figuras representam os cromatogramas a partir do tempo de retenção de 70 minutos.

Tabela 5 – Esteroides detectados pela análise em CG-EM de extratos em hexano obtidos a partir de raízes coletadas a campo e de culturas de raízes de 45 dias de *C. spinosa*

| Material vegetal | Tempo de retenção (tR) | Identificação da substância |
|------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Raiz coletada a campo | 77,0 | tocoferol |
| | 78,6 | campesterol |
| | 79,2 | estigmaesterol |
| | 80,43 | gama-sitosterol |
| | 83,05 | stigmast-4-en-3-one |
| Cultura de raízes de 45 dias | 79,2 | estigmaesterol |

Identificação realizada pela comparação com a biblioteca de espectro de massas da Central Analítica do Instituto de Química/UERJ.

5 DISCUSSÃO

No cultivo vegetal *in vitro*, as técnicas que tratam das culturas com crescimento organizado ganham destaque pelo fato de algumas etapas da síntese de muitas substâncias bioativas requererem uma organização tecidual e uma diversidade de tipos celulares (AMARAL; SILVA, 2003; FALEIRO; ANDRADE; REIS JUNIOR, 2011). Entre essas técnicas, destacam-se as culturas de raízes adventícias, sistemas que permitem alto acúmulo de biomassa, possibilitando a produção em larga escala (NAGARAJANAN; ARIVALAGANB; RAJAGURUA, 2011).

Neste trabalho foram estabelecidas culturas de raízes *in vitro* de *Cleome spinosa*. O estudo avaliou a capacidade de multiplicação *in vitro* de raízes a partir de segmentos radiculares, considerando duas fontes distintas de explantes, plantas propagadas *in vitro* e plantas obtidas do processo de germinação *in vitro*.

Embora no presente estudo explantes radiculares tenham sido utilizados para dar início às culturas, diversos trabalhos têm reportado o uso de diferentes materiais vegetais para indução de raízes, como explantes caulinares (LING et al., 2009; SIVANESAN; JEONG, 2009), foliares (LING et al., 2009) e até mesmo culturas de calos (GOEL; KURKEJA; BISHT, 2009; KIM et al., 2009; FAZAL; ABBASI; AHMAD, 2014). Entretanto, o uso de segmentos radiculares *in vitro* permite a manutenção da planta matriz, uma vez que, após a remoção das raízes, a parte aérea pode ser transferida para meio fresco para o desenvolvimento de novas raízes (CORDEIRO, 2011).

A partir dos resultados obtidos com *C. spinosa*, foi possível observar que a fonte de explantes mostrou diferentes respostas em termos de indução de raízes. Embora muitos estudos utilizem raízes de plantas propagadas *in vitro* como fonte inicial de explantes (BETSUI et al., 2004; KIKOWSKA et al., 2014), e até mesmo explantes radiculares de plantas cultivadas *ex vitro* (WU et al., 2006), grande parte dos estudos de cultura de raízes apresentam como material inicial raízes obtidas de plantas oriundas do processo de germinação *in vitro*. Em *C. spinosa*, maior multiplicação de raízes foi alcançada por culturas iniciadas com material obtido por germinação *in vitro*. A literatura aponta a eficácia do uso de plântulas obtidas *in vitro* como fonte de explantes para dar início a culturas de raízes. Em *Cichorium intybus* um protocolo eficiente foi

desenvolvido para a produção de raízes a partir de folhas e hipocótilos (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007). Culturas de raízes de *Hypericum perforatum* (CUI et al., 2010) e de *Morinda citrifolia* (BAQUE et al., 2013) foram estabelecidas a partir de folhas jovens, enquanto culturas de raízes de *Raphanus sativus* foram obtidas a partir de segmentos radiculares (BETSUI et al., 2004).

O fato de o material vegetal juvenil exibir maior potencial de enraizamento é coerente com o efeito inibidor do processo de maturação sobre a capacidade de formação de raízes adventícias (DUMAS; MONTEUUIS, 1995). As plantas obtidas por germinação *in vitro*, por se tratar de material botânico mais jovem, podem apresentar maiores níveis de hormônios endógenos favorecendo a multiplicação das raízes quando transferidas para condições de cultura. A capacidade de regeneração *in vitro* depende da maturidade, do estágio fisiológico da planta e do tecido usado como fonte de explante. Usualmente, material vegetal jovem é utilizado para dar início à cultura de tecidos, uma vez que um tecido maduro já perdeu parte de sua reserva de nutrientes, podendo se encontrar em processo degenerativo (ANDADRE, 2002).

Respostas morfogênicas diferenciadas em função da idade das plantas matrizes também foram observadas em estudos anteriores com a espécie *C. spinosa* visando ao estabelecimento de protocolos de calogênese (ALBARELLO 2005; ALBARELLO et al., 2007) e de micropropagação (ALBARELLO et al., 2006). Nesses estudos, culturas iniciadas a partir de explantes oriundos de plantas propagadas *in vitro* deram origem a calos produtores do carotenoide β -caroteno, enquanto que calos mantidos nas mesmas condições de cultura, mas iniciados a partir de explantes oriundos de plantas obtidas por germinação *in vitro* não apresentaram a produção do pigmento.

Apesar de as raízes de plantas de *C. spinosa* obtidas por germinação *in vitro* terem demonstrado maior capacidade de multiplicação quando comparadas aos explantes obtidos de plantas propagadas *in vitro*, o protocolo previamente estabelecido para a germinação das sementes desta espécie (ALBARELLO et al., 2006) mostrou resposta fisiológica muito demorada, sendo necessários de dois a três meses para o início do processo e cerca de mais dois meses para que as raízes alcançassem um tamanho suficiente para servirem de explantes. Além do longo tempo necessário, o protocolo resultava em baixas porcentagens de germinação, não ultrapassando 20%. Sedo assim, foi observado que a baixa eficiência do processo germinativo estava associada ao uso do agente desinfestante hipoclorito de sódio (NaClO). Embora o

NaClO esteja entre os agentes químicos mais utilizados nos protocolos de desinfestação *in vitro*, estudos têm demonstrado sua toxidez para algumas espécies. Em sementes de *Erechtites valerianaefolia* o uso de NaClO resultou na redução do potencial germinativo, assim como em um retardo no tempo de germinação (ZAYAT; RANAL, 1997). Com base nesses resultados, o efeito de pré-tratamentos germinativos (EKPONG, 2009) e o tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na desinfestação de sementes foram avaliados para a espécie *C. spinosa*. O uso de H_2O_2 mostrou-se eficiente não somente como desinfestante superficial, mas também resultou no aumento da porcentagem de germinação. Resultados semelhantes foram observados com outras espécies. Em *Helianthus annuus* o uso de H_2O_2 (1-3%) aumentou a taxa de germinação e em *Carthamus tinctorius* agiu sobre substâncias inibidoras encontradas nas cascas das sementes (DOLATABADIAN; SANAVY, 2008). O aumento da germinação observada pelo tratamento com o H_2O_2 pode ser devido à sua atividade oxidativa, em decorrência da reação de dismutação que libera O_2 e suprime a atividade dos inibidores da germinação que revestem a semente (OGAWA; MASAKI, 2001).

A associação de escarificação mecânica das sementes seguida de embebição por 12 horas em água destilada e desinfestação com H_2O_2 foi um protocolo eficiente para a germinação *in vitro* de *C. spinosa*, com porcentagens de germinação de até 90%. A escarificação torna a semente permeável e permite a germinação por consistir no rompimento ou abrasão do tegumento da semente (FERNANDES; GROF; CARVALHO, 2000). A escarificação mecânica com lixa em um dos lados da semente por três minutos, seguida de embebição em água por 24 horas, e escarificação nos dois lados da semente, sem embebição, foram eficientes para a superação da dormência de sementes de *Sterculia foetida* (SANTOS et al., 2004). A remoção da extremidade das sementes de *Passiflora gibertii* resultou em um aumento da porcentagem de germinação *in vitro* para esta espécie (CARVALHO et al., 2012).

Para *C. spinosa*, independentemente da fonte de explantes utilizada, a suplementação hormonal foi essencial para a multiplicação das raízes *in vitro*. O cultivo dos segmentos radiculares em meio MS sem suplementação hormonal (MS0) resultou em intensa proliferação de brotos e baixa multiplicação de raízes. Nas espécies do

gênero *Cleome*, *C. rosea* (SIMÕES et al., 2009a) e *C. dendroides* (informação verbal)², a manutenção de explantes radiculares em meio MS0 embora tenha resultado em baixas taxas de multiplicação de raízes, não induziu a proliferação de brotos, sendo fundamental a utilização de fitorreguladores para induzir o desenvolvimento *in vitro*.

O efeito dos reguladores de crescimento na capacidade de multiplicação *in vitro* de raízes de *C. spinosa* foi avaliado com a adição aos meios de cultura das auxinas ANA, AIA e AIB, em diferentes concentrações. Os resultados alcançados demonstraram que o uso das diferentes auxinas promoveu respostas morfogênicas distintas. As auxinas desempenham um papel regulatório importante na rizogênese, estimulando a multiplicação de raízes laterais pela indução da divisão celular das células do periciclo. Por outro lado, altas concentrações podem inibir o alongamento das raízes, provavelmente devido ao estímulo à produção de etileno (TAIZ; ZEIGER, 2004). A suplementação com ANA resultou na calogênese dos explantes radiculares de *C. spinosa*, enquanto que a adição de AIA e de AIB induziu a multiplicação de raízes tanto em culturas iniciadas a partir de explantes de plantas propagadas *in vitro* como de plantas obtidas por germinação *in vitro*. Estudos com a espécie *C. dendroides* mostraram que explantes radiculares cultivados em meio suplementado com ANA também apresentaram formação de calos (informação verbal)³. Para a espécie *C. rosea* a maior multiplicação de raízes foi alcançada na presença deste fitorregulador, enquanto que a suplementação com AIA promoveu o desenvolvimento de brotos (CORDEIRO, 2011). Segundo George, Hall e Klerk (2008), a maior efetividade do AIB na rizogênese *in vitro* pode estar relacionada ao fato desta substância ser metabolizada mais rapidamente pelas plantas, quando comparado à AIA, além de sua maior estabilidade à luz.

O efeito da luz sobre a multiplicação de raízes de *C. spinosa* mostrou diferentes respostas. A presença de luz promoveu um maior crescimento das culturas iniciadas com explantes de plantas propagadas *in vitro*. Para as culturas iniciadas a partir de plantas obtidas pelo processo de germinação *in vitro*, a manutenção sob luz acarretou em maior proliferação nas culturas mantidas em meio suplementado com as menores

²Informação fornecida por Tatiana Castro. Pesquisadora do PGBV/UERJ. Rio de Janeiro, 2013.

³Informação fornecida por Tatiana Castro. Pesquisadora do PGBV/UERJ. Rio de Janeiro, 2013.

concentrações das auxinas (0,5; 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹), mas induziu a formação de calos nas maiores concentrações usadas (3,0 e 5,0 mg.L⁻¹). Estudos apontam a influência da luminosidade na indução de calos em diferentes espécies (MOON; STOMP, 1997; ROCHA et al., 2013). Culturas de raízes de *C. spinosa* estabelecidas em meio com 3,0 mg.L⁻¹ de AIB e mantidas na ausência de luz apresentaram maior acúmulo de biomassa sem a ocorrência de calogênese.

A manutenção das culturas de *Cichorium intybus* e *Eleutherococcus koreanum* no escuro também foi eficiente para a produção de raízes *in vitro* (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007; PARK et al., 2005). De modo semelhante, a manutenção de micro estacas de *Acacia mangium* em meio com auxinas, no escuro, resultou em um maior número de raízes adventícias. Por outro lado, a presença de luz contribuiu para o alongamento das raízes formadas (MONTEUUIS; BON, 2000).

A influência do tamanho dos explantes sobre a resposta *in vitro* foi avaliada com o uso de explantes com 0,5 e 1,0 cm. Em culturas iniciadas a partir de plantas propagadas *in vitro* este fator não acarretou em diferenças significativas na multiplicação das raízes. Resultados similares foram observados em culturas de raízes de *C. rosea* também iniciadas a partir de explantes obtidos de plantas propagadas *in vitro*. Nos estudos com esta espécie, culturas iniciadas a partir de explantes de 0,5 cm (CORDEIRO, 2011), assim como explantes de 2,0 cm (SIMÕES et al., 2009a), não apresentaram diferenças quanto à capacidade de proliferação de raízes. No entanto, para as culturas de *C. spinosa* iniciadas a partir de segmentos radiculares de plantas obtidas por germinação *in vitro*, o tamanho dos explantes foi um fator importante. Nestas culturas o uso de explantes de 0,5 cm resultou em calogênese e baixo crescimento das raízes, enquanto que culturas iniciadas com explantes de 1,0 cm apresentaram uma significativa capacidade multiplicação. Estudos reportam que o tamanho dos explantes também está relacionado a outras respostas morfogênicas *in vitro*. Em *Cynara cardunculus* a proliferação de brotos a partir de segmentos entre 1 e 1,5 cm apresentou diferenças estatísticas quando comparados com explantes com mais de 2 cm (BOULLANI et al., 2013). Para a multiplicação *in vitro* de *Psychotria ipecacuanha* explantes de 1,0 e 1,5 cm apresentaram maior número de brotações do que segmentos com 0,5 cm (REIS et al., 2004).

Em função da potencialidade de uso de plantas propagadas *in vitro* como fonte de explantes, foi avaliada a influência de fatores físicos e químicos sobre a multiplicação de raízes de *C. spinosa*.

A adição de uma fonte de carbono aos meios de cultura faz-se necessária para o fornecimento de energia metabólica, sendo essencial para a rizogênese *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Embora a sacarose seja a fonte de carbono mais utilizada nos meios nutritivos, no presente estudo foi avaliado o efeito da adição de sorbitol isoladamente e em combinação com a sacarose sobre a multiplicação de raízes em *C. spinosa*. A adição de 3% de sorbitol ao meio de cultura não foi eficiente para a indução de raízes. Por outro lado, a associação de 1,5% de sacarose e 1,5% de sorbitol em meios suplementados com AIB e AIA resultou na proliferação de raízes, apesar de não ter sido observado o aumento da capacidade de multiplicação quando comparado às culturas mantidas em meio enriquecido com sacarose como única fonte de carbono. Embora não tenha sido eficiente para a multiplicação de culturas de raízes, o uso de sorbitol como fonte de carbono no meio MS, em substituição à sacarose, resultou em maior produção de raízes em plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* (LUCENA-FILHO et al., 2013).

Segundo Flores et al. (2013), a redução no crescimento nas respostas morfológicas das plantas de *Pfaffia tuberosa* em meio enriquecido somente com sorbitol deve-se ao fato de que muitas espécies não possuem mecanismos bioquímicos para metabolizar o sorbitol. Apesar da manipulação da fonte de carbono não ter sido uma estratégia eficiente para aumentar a multiplicação de raízes de *C. spinosa*, concentrações mais elevadas de sorbitol, em comparação ao uso de outros açúcares, induziram a rizogênese *in vitro* e inibiram a formação de calos em cultivares de maçã (PAWLICKI; WELANDER, 1995).

No presente trabalho foi avaliada a influência da citocinina BAP em associação com as auxinas AIA e AIB na capacidade de multiplicação *in vitro* de raízes. Apesar de as citocininas estarem mais fortemente relacionadas à propagação de partes aéreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), estudos relatam o desenvolvimento de raízes em meio com citocininas em combinação com auxinas (CORRÊA et al., 2003; HUANG et al., 2013). Entretanto, nas culturas de *C. spinosa*, a suplementação com BAP não resultou em multiplicação de raízes, induzindo a proliferação de brotos, como observado em *Periploca sepium* (ZHANG et al., 2012) e em *Morus alba* (LEE et al.,

2011). As citocininas são essenciais ao desenvolvimento das plantas pela regulação da divisão celular, além de participarem nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004). Embora as citocininas sejam consideradas antagonistas das auxinas, funcionando como reguladores negativos da atividade meristemática da raiz e da formação de raízes laterais e adventícias, a adição de citocininas aos meios de cultivo pode estimular as divisões celulares iniciais necessárias para a indução das raízes adventícias (DE KLERK; HANECAKOVA; JASIK, 2001; KONIECZNY et al., 2009).

A redução na concentração de sais minerais totais do meio MS ($MS^{1/2}$ e $MS^{1/4}$) induziu a formação de raízes em *C. spinosa* nas primeiras semanas em cultivo, entretanto não levou à multiplicação destas raízes. Ao longo do tempo em cultura ocorreu o intumescimento das raízes, seguido de calejamento. Culturas de raízes de *Gynura procumbens* também tiveram maior acúmulo de biomassa em meio MS com a concentração de sais normal (SAIMAN et al., 2012). Contudo, estudos apontam a eficácia da redução de sais do meio MS na proliferação de raízes *in vitro*. Quando a concentração de sais foi reduzida a $1/4$, a proliferação de raízes de *C. dendroides* aumentou significativamente (informação verbal)⁴. Em *Echinacea angustifolia* baixas concentrações de sais do meio ($MS^{1/2}$ e $MS^{1/4}$) foram requeridas para produção de raízes adventícias, sugerindo que as interações entre os sais aumentaram a disponibilidade de íons para as raízes. (WU et al., 2006). Resultados semelhantes ocorreram em *Periploca sepium*, podendo indicar que menores concentrações de sais minerais no meio de cultura levam à redução da pressão osmótica, favorecendo a indução e crescimento de raízes (ZHANG et al., 2011).

O uso do meio MS solidificado com ágar resultou em respostas distintas daquelas observadas nas culturas mantidas em meio líquido. A manutenção dos explantes em meio MS0 não induziu o desenvolvimento de brotos, diferentemente da resposta apresentada pelas culturas em meio MS0 líquido. Em meio suplementado com AIA ocorreu a proliferação de raízes, contudo observou-se também a formação de brotos. Ainda que para *C. spinosa* o cultivo em meio sólido não tenha sido eficiente

⁴Informação fornecida por Tatiana Castro. Pesquisadora do PGBV/UERJ. Rio de Janeiro, 2013.

para a indução de raízes, muitos trabalhos mostram a eficácia do uso de meio solidificado. Meio MS solidificado com 0,45% de ágar suplementado com AIB isoladamente ou em associação com cinetina induziu a proliferação de raízes a partir de diferentes explantes de *Panax notoginseng* (GAO et al., 2005). Um protocolo eficiente de culturas de raízes para a espécie *Cichorium intybus* foi estabelecido em meio MS contendo 0,64% de ágar e enriquecido com ANA ou AIB (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007).

As melhores condições para a multiplicação de raízes *in vitro* da espécie *C. spinosa* foram estabelecidas a partir da inoculação de segmentos radiculares obtidos de plantas oriundas de germinação *in vitro* em meio suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB e mantidas no escuro. O acompanhamento da capacidade de multiplicação *in vitro* das raízes de *C. spinosa* mantidas por períodos de cultura de 45 dias, mostrou que a capacidade de multiplicação se manteve durante as subculturas sendo alcançado um maior acúmulo de biomassa durante a segunda subcultura. Já para as culturas mantidas por períodos de 60 dias, a multiplicação diminuiu ao longo dos subcultivos. A manutenção da capacidade de multiplicação de raízes ao longo das subculturas foi observada para culturas de *C. rosea* estabelecidas em meio suplementado com ANA, para as quais a capacidade de multiplicação se manteve até a quarta subcultura. Entretanto, culturas obtidas na presença de AIB não mantiveram a capacidade de proliferação ao longo das subculturas (CORDEIRO, 2011).

Segundo Rublo et al. (2002), a perda capacidade morfogênica dos explantes ao longo do tempo em cultivo tem sido observada em estudos de cultura de tecidos, uma vez que as condições *in vitro* induzem a estabilização, tornando os explantes não responsivos aos reguladores de crescimento que controlam as atividades regenerativas (SRISKANDARAJAH; SEREK, 2004). Entretanto, alguns autores relatam o aumento progressivo na capacidade morfogênica dos explantes ao longo das subculturas. Em culturas de raízes de *Gynura procumbens* ocorreu aumento do crescimento ao longo dos subcultivos a cada 30 dias (SAIMAN et al., 2012). Resultados semelhantes foram demonstrados em culturas de raízes de *Cornus capitata*, com aumento da produção de raízes ao longo das subculturas. Entretanto, ainda que não ocorra o aumento da proliferação, o que se espera de sucessivos subcultivos é a manutenção da capacidade de multiplicação *in vitro*, como ocorreu nas culturas de *C. spinosa* no tratamento com 3,0 mg.L⁻¹ de AIB, no escuro.

Os estudos fitoquímicos realizados com *C. spinosa* aplicando diferentes técnicas cromatográficas permitiram avaliar a presença de metabólitos secundários nas raízes de plantas coletadas a campo, em raízes de plantas propagadas *in vitro* e nas culturas de raízes. As análises por CCD e por CG-EM apontaram a presença de terpenos nos extratos em hexano e em diclorometano.

Substâncias da classe dos terpenos são os metabólitos secundários mais citados em estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Cleome*. Análises em CG-EM do extrato em clorofórmio de *C. burmanni* apontaram a presença dos terpenos neofitadieno, fitol e ácido benzeno-1,2-dicarboxílico (PILLAI; NAIR, 2013). As substâncias bucariol, estigmaesterol e *drosericarpone*, esta última relatada pela primeira vez na família *Cleomaceae* e na natureza, foram identificadas no extrato metanólico de *C. droserifolia* como terpenos (EL-ASKARY, 2005). Testes fitoquímicos detectaram a presença de terpenos em extratos obtidos com éter etílico e clorofórmio a partir de caule de *C. gynandra* (ANNADURAI; AHMED, 2014). A identificação de dois novos terpenos no extrato em éter de petróleo da parte aérea de *C. rutidosperma* foi realizada a partir da análise por cromatografia líquida (RAHMAN; MUNIRA; HOSSAIN, 2008). Análises por CCD do extrato em hexano de parte aérea de *C. viscosa* detectaram a presença de três bandas na condição clorofórmio 100%, indicando a presença de triterpenos (NIRAIMATHI; KARUNANITH; BRINDHA, 2012).

Neste trabalho, as análises fitoquímicas por CCD e CLAE apontaram a presença de compostos fenólicos nos diferentes extratos em acetato de etila de *C. spinosa*. Alguns dos fragmentos de massa obtidos a partir da análise em CLAE-EM mostraram-se característicos de flavonoides. Ensaio fitoquímico com espécies do gênero *Cleome* já demonstraram o isolamento e identificação de algumas substâncias flavonoídicas. Análises por CCD indicaram a presença de flavonoides em quatro frações de extrato metanólico de parte aérea de *C. gynandra* (BALA et al., 2011).

Embora o gênero *Cleome* apresente muitas espécies usadas na medicina tradicional, ainda são poucos os estudos de avaliação fitoquímica com materiais obtidos por técnicas de cultura de tecidos. Em culturas de células em suspensão de *C. chelidonii* foi demonstrada a presença de substâncias pertencentes à classe dos glicosinolatos (SONGSAK; LOCKWOOD, 2004), enquanto antocianinas foram identificadas em culturas de calos de *C. rosea* (SIMÕES et al., 2009b) e carotenoides em calos de *C. spinosa* (Albarelllo et al., 2007).

A presença de substâncias nas culturas de raízes de *C. spinosa* que não foram detectadas no material coletado a campo reforça a relevância do estabelecimento de culturas *in vitro* como fontes importantes para a produção de metabólitos de interesse. A cultura de tecidos tem se mostrado uma estratégia eficiente não só para a otimização da produção de metabólitos, sendo alcançadas em muitos casos taxas de produção *in vitro* maiores do que aquelas verificadas no material em campo, como também na síntese de substâncias não produzidas originalmente pelas plantas matrizes (VERPOORTE; MARASCHIN, 2001; AMARAL; SILVA, 2003).

CONCLUSÕES

- O uso de H₂O₂ em associação à escarificação mecânica das sementes seguida de embebição resultou em um protocolo eficiente para a germinação *in vitro* de *Cleome spinosa*
- A fonte de explantes mostrou-se o fator mais importante no estabelecimento das culturas de raízes *in vitro* de *Cleome spinosa*;
- O uso de segmentos radiculares de plantas oriundas do processo de germinação *in vitro* apresentaram maior capacidade de multiplicação quando comparado aos explantes obtidos de plantas propagadas *in vitro*;
- O tamanho dos explantes influenciou no crescimento das culturas, com melhores respostas em culturas iniciadas a partir de segmentos com 1,0 cm de comprimento;
- O estabelecimento de culturas de raízes no escuro em meio suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ de AIB, iniciadas a partir de plântulas germinadas *in vitro*, foi a condição mais eficiente para o acúmulo de biomassa.
- Em todos os materiais avaliados, foram encontrados metabólitos secundários de interesse medicinal;
- As análises cromatográficas permitiram a identificação de metabólitos das classes dos terpenos e de compostos fenólicos nas raízes coletadas a campo e nos materiais *in vitro*.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a viabilidade para a produção massal *in vitro* de raízes da espécie *C. spinosa* e também o potencial de exploração e modulação destes materiais com relação à produção de metabólitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.114-140, 2007.
- AHMAD, V.U et al. Cleocarpone, a triterpenoid from *Cleome brachycarpa*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 2, p. 670-672, 1990.
- ALBARELLO, N. *Aplicação de métodos biotecnológicos para estudos fitoquímicos e farmacológicos de Cleome spinosa Jacq. (Capparaceae)*. Tese (Doutorado em Biologia) - Programa de Pós-Graduação em Biociências Nucleares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- ALBARELLO, N. et al. 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. et al. *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.
- ALBARELLO, N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of field growth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 7, n. 16, p. 1043-1049, 2013.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciencia*, v. 27, n. 7, p. 336-346, 2002.
- AL-GENDY, A. A.; LOCKWOOD, G. B. GC-MS analysis of volatile hydrolysis products from glucosinolates in *Farsetia aegyptia* var. *Ovalis*. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 148-152, 2003.
- AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais – Produção de alcaloides e óleos essenciais. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, ed. 30. p. 55-59, 2003.
- ANDRADE, S. R. M. *Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002, 16 p.
- ANNADURAI, A.; ARRAMEJ, J. S. Preliminary phytochemical screening in *Cleome gynandra* L. *Advances in Applied Science Research*, v. 5, n. 2, p. 122-124, 2014.
- APARADH, V.T.; MAHAMUNI, J.R.; KARADGE, B.A. Taxonomy and physiological studies in spider flower (*Cleome* species): A critical review. *Plant Sciences Feed*, v. 2, n. 3, p. 26-46, 2012.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. *Anatomia vegetal*. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 438p.

ARCHELA, E.; ANTONIA, L. H. D. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão = Determination of Phenolic Compounds in Wine: A Review. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 34, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2013.

BAHMANI, R.; KARAMI, O.; GHOLAMI. Influence of Carbon Sources and Their Concentrations on Rooting and Hyper hydricity of Apple Rootstock MM.106. *World Applied Sciences Journal*, v. 6, cap.11, p. 1513-1517, 2009.

BALA, A. et al. Antioxidant Activity of the Fractions of *Cleome gynandra* Promotes Antitumor Activity in Ehrlich Ascites Carcinoma. *Asian Journal of Chemistry*; v. 23, n. 11, p. 5055-5060, 2011.

BAQUE, M. A. et al. Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.) in a liquid-phase airlift balloon-type bioreactor. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 49, p. 737–749, 2013.

BARROS, L. M. Embriogênese Somática - Pré-requisito para o emprego de algumas técnicas de biotecnologia no melhoramento genético de plantas perenes. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.2, n. 7, p. 36-39, jan./fev.1999.

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.

BERKOV, S. et al. Alkaloid Spectrum in Diploid and Tetraploid Hairy Root Cultures of *Datura stramonium* Z. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, v. 58, p.42-46, Jul/Aug, 2003.

BETSUI, F. et al. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. *Plant Biotechnology*, v.21, n.5, p.387–391, 2004.

BOULLANI, R. E. et al. Effect of decapitation and size of explants on *in vitro* multiplication rate of globe artichoke. *Acta Horticulturae*, v. 983: VIII International Symposium on Artichoke, Cardoon and their Wild Relatives, 2013.

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

BRIDGERS, E. N.; CHINN, M. S.; TRUONG, V. Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweet potatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, v. 32, p. 613–620, 2010.

BRASILEIRO, B. P.; CASTRO, J. A.; AMARAL, C. L. F. A. Comportamento germinativo dos gametófitos de *Cleome spinosa* Jacq: uma ferramenta para o fitomelhoramento. *Diálogos & Ciência*, v. 6, n. 15, p. 53-59, 2008.

BUSTAMANTE, K. G. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, n.3, p.341-345, 2010.

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.

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 rósea Vahl. Ex DC. 2002*. Tese (Doutorado) - Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. *Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais*. Embrapa Algodão. Documentos, 116. Campina Grande, 2003.39 p.

CARVALHO, M. A. F. et al. Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico = *In vitro* germination of *Passiflora gibertii* N. E. Brown with mechanical scarification and gibberellic acid. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1027-1032, maio/jun. 2012.

CASTRO, T.C. Comunicação verbal com a aluna de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, UERJ, 2014.

CHARLET, S. et al. Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells with Ca-alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 875-870, 2000.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 126, p. 159–175, 2009.

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

CORRÊA, L.R. et al. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Growth Regulation*, v. 45, p. 63–73, 2005.

CORRÊA, R. M. et al. Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação fotoperíodo/temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro* = Potential of active charcoal, yellow filter and interation photoperiod/ temperature on the formation of tuber roots of sweet potato *in vitro*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.3, p.423-430, mai-jun, 2003.

COSTA E SILVA, M. B. *O gênero Cleome L. (Capparaceae Juss.) no Brasil*. Tese de Doutorado. UFRPE, Recife, PE, 2000, 150 p.

CUI, X. et al. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4708-4716, 2010.

DAS, P.C. et al. Cleogynol, a novel dammarane triterpenoid from *Cleome gynandra*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 616-618, 1999.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. Atualidades em Química. *Química Nova Escola Cromatografia*, nº 7, maio, p. 21-25, 1998.

DE KLERK, G. J.; HANECAKOVA, J.; JASIK, J. The role of cytokinins in rooting of stem slices cut from apple microcuttings. *Plant Biosystems*, v. 135, n. 1, p. 79-84, 2001.

DELBONI, C. A. C.; LANDO, R. L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. In: X Congresso de Educação do Norte Pioneiro. Educar para a Emancipação: A Reorganização da Escola e do Espaço Pedagógico. *Anais JACAREZINHO – PR*, 10 a 14 de maio de 2010.

DEVI, B.P.; BOOMINATHAN, R.; MANDAL, S.C. Evaluation of antipyretic potential of *Cleome viscosa* Linn (Capparidaceae) extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 87, p. 11-13, 2003.

DOLATABADIAN, A.; SANAVY, S. A. M. Effect of the ascorbic acid, pyridoxine and hydrogen peroxide treatments on germination, catalase activity, protein and malondialdehyde content of three oil seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, v. 36, n.2, p. 61-66, 2008.

DRECHSEL, M. M.; BALDANI, V. L. D. Métodos de desinfestação superficial para obtenção de sementes de milho livres de microrganismos. Seropédica: *Embrapa Agrobiologia*, 2006. 16 p.

DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 40, p. 231-235, 1995.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, n.58, p.49-59, 2009.

EDEOGA, H.O.; OKWU, D.E.; MBAEBIE, B.O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 7, p. 685-688, July 2005.

EDEOGA, H. O. et al. Micromorphological characters of the vegetative and floral organs of some *Cleome* species from Nigeria. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, v. 4, p. 124-127, 2009.

EKPONG, B. Effects of seed maturity, seed storage and pre-germination treatments on seed germination of *Cleome* (*Cleome gynandra* L.). *Scientia Horticulturae*, v. 119, p. 236-240, 2009.

EL-ASKARY, H.I. Terpenoids from *Cleome droserifolia* (Forsake). *Molecules*, v. 10, n. 8, p. 971-977, 2005.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. *Biotecnologia: Estado da Arte e Aplicações na Agropecuária*. Planaltina, Distrito Federal, Embrapa Cerrados, 2011, 730p. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/livros/2>. Acesso em 30/01/2015.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. *Introdução à Análise Fitoquímica*. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, p. 229 – 246, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; AHMAD, N. Optimization of adventitious root culture for production of biomass and secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.174, p. 2086-2095, 2014.

FELDMAN, L. The maize root. In: Freeling M, Walbot V, eds. *The Maize Handbook*. New York; *Springer-Verlag*, p. 29–37, 1994.

FERNANDES, C.D.; GROF, B.; CARVALHO, J. *Escarificação mecânica de sementes de Stylosanthes spp. com beneficiadora de arroz*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 4p.

FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. 'Radiclé' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trens in Plant Science*, v. 4, n. 6, p. 220-226, 1999.

FLORES, R. et al. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 4, n. 3, p. 192-199, August, 2013.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n.4, p. 627-641, 2008.

GAO, X. et al. Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of *Panax notoginseng*. *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 1771-1775, 2005.

GEORGE, E., HALL, M.; KLERK, G. D. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. The Netherlands: Springer; 2008, p. 1-28.

GEORGIEV, M.I.; PAVLOV, A.I.; BLEY, T. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 1175-1185, 2007.

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

GOEL, M. J.; KUKREJA, A.K.; BISHT, N.S. *In vitro* manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n. 96, p.1-9, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A., *Micropropagação*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. v.1, p. 183-245. Brasília: EMBRAPA. 1998.

GRIFFITHS, D.W. et al. Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. *Phytochemistry*, v. 57, p. 693-700, 2001.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. *Introdução ao conceito de Biotecnologia*. Lab. Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal. Apostila de Biotecnologia: CCA/UFSC. EDIÇÃO DA STEINMACHER, 2006, 41 p.

GUEVEN, A.; KNORR, D. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. *Journal of Food Engineering*, v. 103, p. 237-243, 2011.

GUPTA, P. C.; SHARMA, N.; RAO, CH. V. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic, flavonoid content of aerial part of *Cleome viscosa* L. *International Journal of Phytomedicine*, v. 3, p. 386-391, 2011.

HAND, P. Biochemical and molecular markers of cellular competence for adventitious rooting. In *Biology of Adventitious Root Formation*. Eds. T.D. Davis and B.E. Haissig. Basic Life Sciences 62, Plenum Press, New York, p. 111-121, 1994.

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. et al. Ethnomedicine of Dharwad district in Karnataka, India - plants used in oral health care. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 261-266, 2004.

Heywood, V. H., R. K. Brummitt, A. Culham & O. Seberg. *Flowering Plants of the World*. Firefly Press, Ontario, 2007. 424p.

HETZEL. M.W. et al. Progress in mosquito net coverage in Papua New Guinea. *Malaria Journal*, v. 13, n.242, p. 1-14, 2014.

HORAI, H., et al., 2010. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 45, n° 7, p. 703–714, July, 2010.

HUANG, H.P. et al. Studies on adventitious root induction *in vitro* and suspension culture of *Polygonum multiflorum*. *China journal of Chinese materia medica*, v. 38, n. 22, p. 3857-3860, 2013.

HUANG, M. et al. Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 21, n. 12, p. 1801-1818, December 2012.

ILTIS, H. H. Studies in the Capparidaceae. XI. *Cleome afrospina*, a tropical African endemic with neotropical affinities. *American Journal of Botany*, v. 54, p.953-962, 1967.

ILTIS, H. H.; COCHRANE, T. S.. Studies in the Cleomaceae V: a new genus and ten new combinations for the Flora of North America. *Novon*, n. 17, p. 447-451, 2007.

ILTIS, H. H. et al. Studies in the Cleomaceae I. On the separate recognition of Capparaceae, Cleomaceae, and Brassicaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 98: 28-36, 2011.

JANE, R. R; PATIL, S. D. *Cleome viscosa*: an effective medicinal herb for otitis media. *International Journal of Science and Nature*, v. 3, n. 1, p. 153-158, 2012.

JAZIR, M. et al. Establishment of Normal and Transformed Root Cultures of *Artemisia annua* L. for Artemisinin Production. *Journal of Plant Physiology*, v.145, n. 1–2, January, p.175–177, 1995.

JORDHEIM, M. et al. Acylated anthocyanins in inflorescence of spider flower (*Cleome hassleriana*). *Phytochemistry*, v. 70, p. 740–745, 2009.

KIKOWSKA, M. et al. The effect of nutritional factors and plant growth regulators on micropropagation and production of phenolic acids and saponins from plantlets and adventitious root cultures of *Eryngium maritimum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 33, p.809-819, 2014.

KIM, D. S. et al. Improvement of ginsenoside production by *Panax ginseng* adventitious roots induced by γ -irradiation. *Biologia Plantarum*, v. 53, n. 3, p. 408-414, 2009.

KIM, W.; WYSLOUZIL, B.E.; WEATHERS, P.J. Invited review: Secondary Metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 38, p. 1–10, 2002.

KJAER, A.; GMELIN, R. Isothiocyanates XVIII. Glucocapparin, A New Crystalline Isothiocyanate Glucoside. *Acta Chemica Scandinavica*, v.10, n.2, p. 335- 336, 1956.

- KJAER, A.; THOMSEN, H. Isothiocyanates. XLII. Glucocleomin, A New Natural Glucoside, Furnishing (-)-5Ethyl5-methyl-2-oxazolidinethione on Enzymic Hydrolysis. *Acta Chemica Scandinavica*, v.16, n.3, p. 595- 598, 1962.
- KONIECZNY, R. et al. Cytokinin and ethylene affect auxin transport-dependent rhizogenesis in hypocotyls of common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 28, p. 331–340, 2009.
- LEAL, R.S. et al. Perfil etnobotânico e atividade antioxidante de *Cleome spinosa* (Brassicaceae) e *Pavonia varians* (Malvaceae). *Revista Fitos*, v.3, n. 3, p. 25-31, 2007.
- LEE, Y.S. et al. Enhancement of anti-inflammatory activity of *Aloe vera*. adventitious root extracts through the alteration of primary and secondary metabolites via salicylic acid elicitation. *PlosOne*, v.8, n. 12, December, 2013.
- LEE, Y.S. et al. Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 105, p. 9-19, 2011.
- LIMA, G. S. *Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicida de extrato, frações e terpenos de Croton cajucara Benth.* Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e inovação em Agropecuária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- LING, A. P. K. et al. Effects of plant growth regulators on adventitious roots induction from different explants of *Orthosiphon Stamineus*. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, v. 3, n. 3, p. 493-501, 2009.
- LOPES, R. M. et al. Flavonoides: Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 3, n. 14, p. 18-22, 2000.
- LOURENÇO, M.V. Biotecnologia de Plantas medicinais: Produção de biomoléculas. *Biológico*, São Paulo, v.65, n.1/2, p.63-65, 2003.
- LOYOLA-VARGAS, V.M.; MIRANDA-HAM, M.L. *Root culture as a source of secondary metabolites of economic importance.* In: AMASON, J.T. (Ed) *Phytochemistry of medicinal plants.* Plenum Press, New York, p. 217-248, 1995.
- LUCENA-FILHO, D. W. P. et al. Estudo da conservação *in vitro* por crescimento lento de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae). In: VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2013, Recife. *CD do VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas*, 2013. v. 1.
- MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, v. 10, 2011.
- MARTINO. R. et al. Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, p.77–92, 2010.

- MARTINS, C. R.; CARVALHO, A. C. P. P. de. Avanços da cultura de tecidos na micropropagação de plantas. In: Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas, 3., 2012, Aracaju. *Anais*. Brasília, DF: Embrapa, 2012.
- MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry: Review. *Phytochemistry*, n. 68, p. 2785–2797, 2007.
- MASSBANK. Japão. Base de dados de espectro de massas. Disponível em <http://www.massbank.jp/>.
- MCNEIL, M. J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. *Natural Product Communications*, n. 5, v.8, p. 1301-1306, 2010.
- MEDINA-BOLIVAR, F. et al. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, v. 68, n.14, p. 1992-2003, July, 2007.
- MINGLI, Z.; TUCKER, G. C. Capparaceae in der Flora of China. *Flora of China Home*, v. 7, p. 429-432, 2008. Disponível em: <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume07/Capparaceae.pdf>. Acesso em 15/08/2014.
- MONTEUUIS, O.; BON, M. C. Influence of auxins and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 63, p. 173–177, 2000.
- MOON, H. K.; STOMP, A. M. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed). *In vitro Cellular & Developmental Biology*, v. 33, n. 1, p. 20-25, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology*, v. 15, p. 473-479, 1962.
- MURTHY, H. N.; HAHN E, J.; PAEK, K. Y. Adventitious roots and secondary metabolism. *Chinese Journal of Biotechnology*, v. 24, p. 711–716, 2008.
- MURTHY, H.N.; LEE, E.; PAEK, K. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 118, p.1–16, 2014.
- NAGARAJAN, A.; ARIVALAGANB, U.; RAJAGURU, P. *In vitro* root induction and studies on an antibacterial activity of root extract of *Costusigneus* on clinically important human pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, v.1, n. 4, p. 67-76, 2011.
- NAGAYA, H. et al. Cytotoxic triterpenes from *Cleome africana*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 6, p. 1115-1119, 1997.

NANDAGOPAL, S.; KUMARI, B. D. R. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. *Journal of Central European Agriculture*, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2007.

NAMDEO, A.G. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews*, v.1, n. 1, p. 69-79, 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. 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.

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.

NIRAIMATHI, K.L.; KARUNANITHI, M., BRINDHA, P. phytochemical and in-vitro screening of aerial parts of *Cleome viscosa* Linn. Extracts (Capparidaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. 2, 2012.

OGAWA, K.; WABUCHI, M. A Mechanism for promoting the germination of *Zinia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology*, v. 43, n. 3, p. 286-291, 2001.

OLIVEIRA, F. et al. *Fundamentos de cromatografia aplicada a fitoterápicos*. São Paulo: Artheneu, 2010. 172 p.

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. Y. et al. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Science*, v. 168, p. 1221-1225, 2005.

PASSOS, C. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1A, p. 140-149, Jan./Mar. 2009.

PAWLICKI, N.; WELANDER, M. Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Science*, v.106, n.2, p. 167-176, 1995.

PEREIRA, J.V.; FERREIRA, M.J.P. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das substâncias provenientes da planta: *Baccharis oxyodonta*. Universidade Presbiteriana Mackenzie. *VII Jornada de Iniciação Científica*, 2011. Rio de Janeiro.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, v. 18, n 12, p. 1995-2018, 1998.

PILLAI, L. S.; NAIR, B. GC-MS analysis of chloroform extract of *Cleome burmanni* w. and a. (Cleomaceae). *International Journal of Pharma Sciences and Research*, v. 4, n. 5, p. 1930-1933, 2013.

PINTO, E.P.P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica – Itacaré, BA, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.20, p. 751-762, 2006.

PLETSCHI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. *Biotechnologia: Ciência e Desenvolvimento*, v.4, p. 12-15, Brasília - DF, 1998.

RAHMAN, S.M.M.; MUNIRA, S.; HOSSAIN, M.A. Pytochemical study of the arial parts of *Cleome rutidosperma* DC plant. *Indonesian Journal of Chemistry*, v. 8, n. 3, p. 459 – 462, 2008.

RAMAKRISHNA, A., RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, v.6, n.11, p.1720-1731; November, 2011.

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

RAO, G.B. et al. Investigation on regional variation in total phenolic content, alkaloid content and in-vitro antioxidant activity of *Cleome chelidonii* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 4, 2011.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856p.

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.

REIS, E. S. et al. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro* = Explant sizes and positions and volume of medium of culture on the multiplication of Ipecac (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 28, n. 3, p. 703-709, maio/jun., 2004.

REZENDE, G. A. A.; TERRONES, M. G. H.; REZENDE, D. M. L. C. Estudo do potencial alopático do extrato metanolico de raiz e caule de *Caryocar brasiliense* Camb. (PEQUI). *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 460-472, May/June 2011.

ROCHA, A. S. et al. Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the *in vitro* cultures of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2013.

- RUBLUO, A. et al. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*, v. 95, p. 341–349, 2002.
- SAIMAN, M. Z. et al. Induction, characterization, and NMR-based metabolic profiling of adventitious root cultures from leaf explants of *Gynura procumbens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 109, p. 465–475, 2012.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed, Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2004. p. 404-420.
- SANTOS, T. O. S.; MORAIS, T. G. O.; MATTOS, V. P. ESCARIFICAÇÃO MECÂNICA EM SEMENTES DE CHICHÁ (*Sterculia foetida* L.). *Revista Árvore*, v.28, n.1, p. 1-6, Viçosa, 2004.
- SIMÃO, A.A. et al. Triagem fitoquímica de plantas medicinais utilizadas como auxiliares no tratamento da obesidade. *52º Congresso Brasileiro de Química - Química e Inovação: Caminho para a sustentabilidade*. 14 a 18 de outubro, 2012. Recife, PE.
- SIMÕES, C. et al. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 98, p.79-86, 2009a.
- SIMÕES, C. et al. 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. et al. 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, n. 10, p. 895-903, 2009b.
- SIMÕES, C. et al. 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. et al. Medicinal potential from *in vivo* and acclimatized plants of *Cleome rosea* Vahl ex DC.(Capparaceae). *Fitoterapia*, v. 77, p. 94-99, 2006.
- SIMÕES, C. et al. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from stem explants of (Capparaceae). *Journal of Plant Biotechnology*, v. 6, p. 3, 199-204, 2004.
- SIMÕES-GURGEL et al. Establishment of anthocyanin-producing cell suspension cultures of ex DC.(Capparaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 106, p. 537-545, 2011.
- SIVAKUMAR, G. Bioreactor technology: A novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. *Biotechnology Journal*, v, 1, p.1419–1427, 2006.

SIVAKUMAR, G.; PAEK, Y. Methyl jasmonate induce enhanced production of soluble biophenols in *Panax ginseng* adventitious roots from commercial scale bioreactors. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 41, n. 6, p. 669-673, 2005.

SIVANESAN, I.; JEONG, B. R. Induction and establishment of adventitious and hairyroot cultures of *Plumbago zeylanica* L. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 20, p. 5294-5300, 2009.

SMART, D.R. et al. Dormant buds and adventitious root formation by *Vitis* and other woody plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 21, p. 296-314, 2003.

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 cheilidonii* plant cell cultures. *Fitoterapia*, v. 75, p. 296-301, 2004.

SUDHAKAR, M. et al. Evaluation of antimicrobial activity of *Cleome viscosa* and *Gmelina asiatica*. *Fitoterapia*, v. 77, p. 47-49, 2006.

SUGA, T. et al. The structural elucidation and the biosynthetic study of cleomeprenols-9, -10, and -11 from the leaves of *Cleome spinosa*. *Chemistry Letters*, v. 7, p. 771-776, 1975.

SRISKANDARAJAH, S.; SEREK, M. Regeneration from phylloclade explants and callus cultures of *Schlumbergera e Rhipsalidopsis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 78, p. 75-81, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 722p.

TEIXEIRA, S. A; MELO, J. I. M. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil. *Iheringia Serie Botanica*, v. 61, n. 1-2, p. 5-11, 2004.

TERMIGNONI, R. R. *Cultura de Tecidos Vegetais*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005, 182 p.

VEENA, V.; TAYLOR, C.G. *Agrobacterium rhizogenes*: recent advances and promising applications. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 43, p. 383-403, 2007.

VERPOORTE, R., MARASCHIN, M. *Engenharia do metabolismo de plantas medicinais*. In: YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. (Orgs). Chapecó: Argos, p. 382-432, 2001.

VILLAREAL, M. L. et al. Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* - a plant producing an antifungal spirostanol saponin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 50, p. 39-44, 1997.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2. ed. Germany: Springer, 2001.

WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. *Plant roots – the hidden half*. Nova York, Basel: Marcel Dekker Inc, 3 ed., 2002, 1136 p.

WILSON, S.A.; ROBERTS, S.C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol Journaul*, v. 10, p. 249–268, 2012.

WINK, M. *Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles*. p. 141-169. In: *The plant vacuole: Advances in Botanical Research – Incorporating Advances in Plant Pathology*. LEIGH, R.A.; SANDERS, J. A. CALLOW, J.A (Editor). v. 25, 462 p. 1990.

WU, C. et al. Optimization of Culturing Conditions for the Production of Biomass and Phenolics from Adventitious Roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology*, v.49, n. 3, p. 193-199. 2006.

XU, W. et al. Primary Structure and Expression of a 24-kD Vacuolar Protein (VP24) Precursor in Anthocyanin-Producing Cells of Sweet Potato in Suspension Culture. *Plant Physiology*, January 2001, v. 125, p. 447–455, 2001

YANIV, Z.; BACHRACH, U. *Roots as a Source of Metabolites with Medicinal Activity*. In: WAISEL, Y. Et al. (Ed.) *Plant Roots: The Hidden Half*. 3ed. New York: Marcel Dekker, p. 1071-1091, 2002.

ZAYAT, A.G.; RANAL, M. A. Germinação de sementes de capiçova. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, n.11, p.15-22, 1997.

ZHANG, H.Y. et al. Screening and analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines using cell extract and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p.151–157, 2007.

ZHANG, J. et al. Effects of explant types and media salt strength on growth and secondary metabolite accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 33, p. 2447–2452, 2011.

ZHANG, J. et al. Effects of sucrose concentration and exogenous hormones on growth and periplocin accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 34, p.1345–1351, 2012.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, v.3, n. 1, p. 001-007, 2008.

ZOBAYED, S.M.A.; SAXENA, P.K. *In vitro*-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv "New Stem") in a temporary immersion bioreactor. *Plant Science*, v. 165, p. 463-470, 2003.

ZHOU; J.; DU, G.; CHEN, J. Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 25, p.17–23, 2014.