



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

Aline Medeiros Saavedra de Paula


**Culturas de raízes de *Cleome dendroides* Schult & Schult f. e
caracterização química de materiais obtidos *in vitro* e coletados a campo**

Rio de Janeiro

2017

Aline Medeiros Saavedra de Paula

Culturas de raízes de *Cleome dendroides* Schult & Schult f. e caracterização química de materiais obtidos *in vitro* e coletados a campo



Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Claudia Simões Gurgel

Coorientadores: Prof. Dra. Norma Albarello

Prof. Dra. Tatiana Carvalho de Castro

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

P324 Paula, Aline Medeiros Saavedra de.
Culturas de raízes de *Cleome dendroides* Schult & Schult f. e
caracterização química de materiais obtidos in vitro e coletados a campo /
Aline Medeiros Saavedra de Paula. – 2017.
148f. : il.

Orientadora: Claudia Simões Gurgel
Coorientadores: Norma Albarello, Tatiana Carvalho de Castro

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

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

CDU 633.88

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

Assinatura

Data

Aline Medeiros Saavedra de Paula

Culturas de raízes de *Cleome dendroides* Schult & Schult f. e caracterização química de materiais obtidos *in vitro* e coletados a campo

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Marco Eduardo do Nascimento Rocha
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dra. Cristiane Pimentel Victório
UEZO

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado a todas as pessoas que me ajudaram, independente da forma de ajuda, sendo ela: emocional, intelectual, com uma palavra, com amor, carinho, amizade, apoio, um favor ou apenas com a presença. Em especial minha orientadora Claudia Simões Gurgel e minhas co-orientadoras Tatiana Carvalho de Castro e Norma Albarello, que tornaram esse trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Claudia Simões Gurgel, pelos tantos conhecimentos a mim passados, dedicação, abdicção de tanto tempo pessoal para que esse trabalho fosse possível, pelo carinho, paciência, amizade, preocupação e cuidado. Gostaria que soubesse que tenho uma imensa admiração e orgulho de ser sua aluna.

À minha querida coorientadora Tatiana Carvalho de Castro, por me apresentar à Biotecnologia Vegetal, compartilhar todo o seu conhecimento sem nenhum egoísmo, pelo carinho, amizade, dedicação, paciência, por me ouvir e ajudar a seguir em frente sempre que o caminho a ser trilhado estava mais difícil.

À minha coorientadora Norma Albarello, que se divide em mil para ser coorientadora, chefe, professora, vice-diretora e mãe, cumprindo todos os papéis perfeitamente, com muito carinho, paciência, amizade e atenção.

Aos meus amigos de trabalho, a equipe Labplan, pelos cafés, gargalhadas, apoio, ajudas em campo, no laboratório e na vida:

Anna Flávia Vilardo, Débora Lage, Lucas Lima, Marília Campos, Siomara da Costa Lemos, Thaís Athayde, Thiago Barbosa e Victor Pelliccione.

Aos farmacêuticos Eduardo Nunes e Nilda Calado pelo auxílio nas análises cromatográficas realizadas no LPPN/UERJ.

Ao pesquisador Dr. Davyson de Lima Moreira da Fiocruz e seu aluno de Ciências Biológicas Rubens Diego Castilho por me ajudarem imensamente nas análises fitoquímicas.

À Adriana Lanzotti, pelo carinho e atenção por ter feito todas as ilustrações deste trabalho.

Aos amigos, Cecília Azevedo e Matheus Tirado, pela pipoca, doce de leite, amizade, conversas, companhia, ajuda e brincadeiras, não poderia ser mais grata por essa parceria, sem vocês meus dias seriam muito sem graça.

À Lívia Cordeiro, por ser essa pessoa MA-RA-VI-LHO-SA, muito obrigada por toda a ajuda, amizade, conselhos e apoio.

A Luciano Alves, por me ouvir, acalmar e ser amigo.

Às minhas avós Maria Emília e Noemia Mattos, por todo o esforço desempenhado para me dar a melhor educação possível, além de amor, carinho, colo e paciência. Que hoje possa retribuir um pouco com a conclusão deste curso.

À minha mãe Ana Cristina de Medeiros, que acreditou em mim quando nem eu acreditava mais.

À minha irmã, Flávia Saavedra por me apoiar, ser minha melhor amiga e ajudar nos momentos mais difíceis da vida.

Ao meu namorado, Daniel Cury e ao meu filho Balu por me amarem, apoiarem e serem a família que eu escolhi.

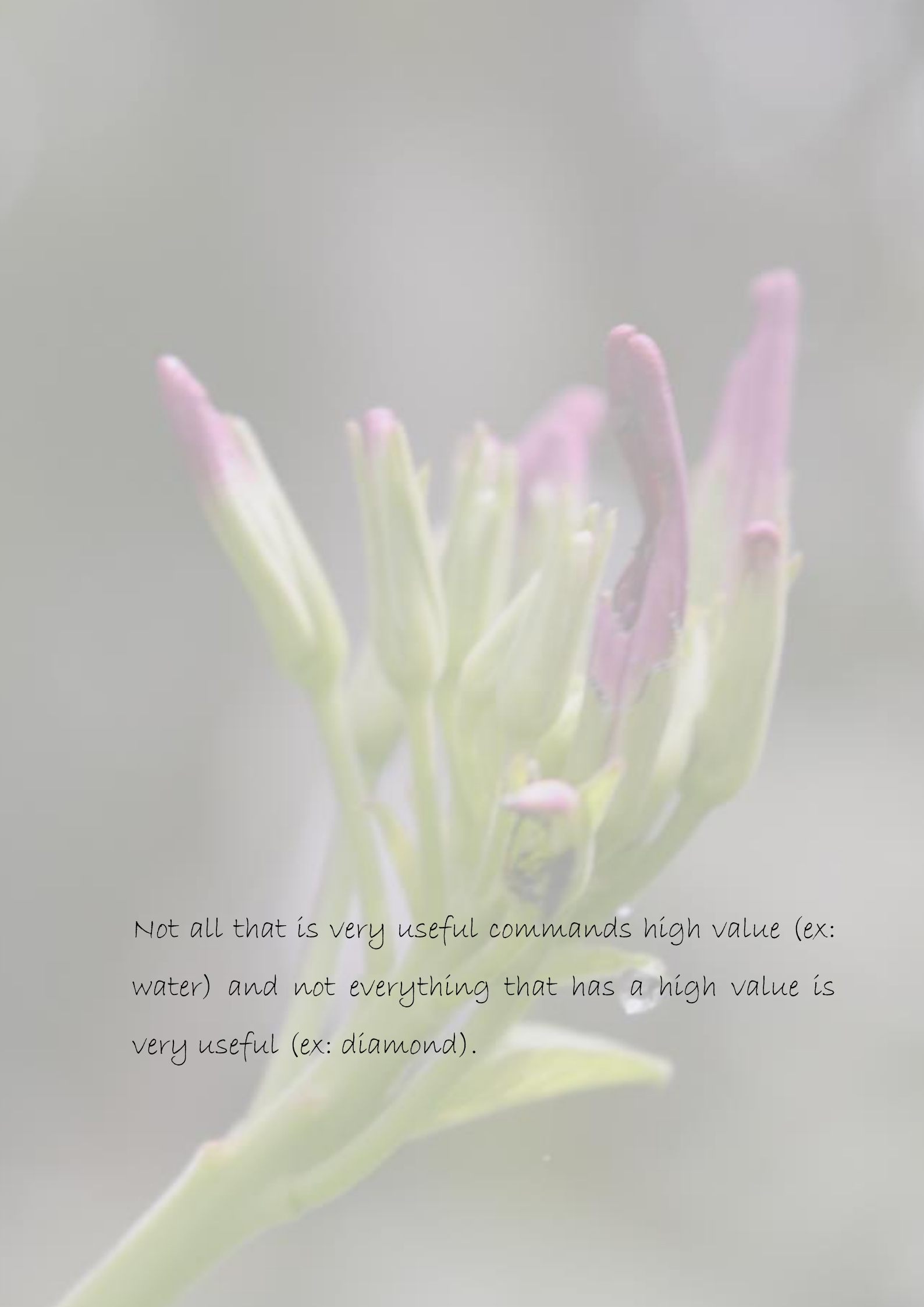
Aos meus amigos Tatiana Rodrigues, Milton Mikio, Flávio Ida, Felipe Guimarães, Vitor Maciel, Amigo Helden, Milena Machado, Roberta Novaes, por todas as idas ao broto, bode cheiroso e festas surpresas, 16 anos de muita amizade, amo vocês.

Ao meu pai Márcio Saavedra, pelo carinho.

À minha amada instituição de ensino, Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES, agencia de fomento que disponibilizou minha bolsa de estudos.

A mim mesma, por perseverar.

A close-up photograph of a plant stem with several green buds and one partially open pink flower. The background is a soft, out-of-focus grey. The text is overlaid on the lower half of the image.

Not all that is very useful commands high value (ex: water) and not everything that has a high value is very useful (ex: diamond).

RESUMO

SAAVEDRA-DE-PAULA, A. M. Culturas de raízes de *Cleome dendroides* Schult & Schult f. e caracterização química de materiais obtidos *in vitro* e coletadas a campo. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

As plantas são importante fonte de moléculas bioativas cuja síntese normalmente ocorre em baixas concentrações. Desta forma, para a exploração comercial destas moléculas, há a necessidade do uso de grandes quantidades de material botânico, o que, muitas vezes, torna o processo pouco eficiente, além de comprometer a existência das espécies. Esta questão pode ser minimizada pela aplicação das técnicas de cultura de tecidos vegetais, pelas quais é possível a produção *in vitro* de metabólitos de interesse. Dentre essas técnicas, destacam-se as culturas de raízes, que apresentam grande potencial para a produção de moléculas bioativas, principalmente por serem culturas constituídas de células diferenciadas. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivos: 1) avaliar o efeito de diferentes fatores físicos e químicos sobre o crescimento de culturas de raízes e 2) realizar a caracterização química de *Cleome dendroides*, espécie endêmica da Mata Atlântica. Para tal, plantas propagadas *in vitro* foram utilizadas como fontes de explantes radiculares. Os fatores avaliados ao longo do trabalho foram: tamanho dos explantes (0,5; 1,0; 1,5 cm), luminosidade (escuro; fotoperíodo 16h luz/8h escuro), concentração de sais minerais totais do meio de cultura MS (MS1/4; MS1/2; MS; 2MS), concentração de sacarose (10; 20; 30; 50; 70; 90 g.L⁻¹), valor inicial de pH do meio de cultura (5,0; 5,8; 6,0; 6,5; 7,2) e velocidade das mesas giratórias orbitais (60; 110; 130; 160 rpm). Os experimentos foram realizados em meio sem suplementação hormonal (MS0) ou na presença de 3,0 mg.L⁻¹ de AIB. O acúmulo de biomassa foi quantificado pela aferição do peso de matéria seca após 45 dias em cultivo. Com relação à caracterização química, foram avaliados materiais produzidos *in vitro* (plantas e culturas de raízes) e *in vivo* (plantas coletadas a campo), considerando duas metodologias para o preparo dos extratos (maceração dinâmica e maceração acelerada por ultrassom), sendo as análises realizadas por técnicas cromatográficas. Os resultados mostraram que o meio com suplementação de AIB acarretou em maior produção de raízes, quando comparado ao meio MS0. O tamanho dos explantes influenciou a proliferação de raízes apenas para as culturas mantidas no escuro. Entretanto, a presença de luz induziu uma maior capacidade de multiplicação das raízes. Desta forma, as culturas passaram a ser realizadas com explantes de 0,5 cm, em meio suplementado com AIB e mantidas na presença de luz. A redução na concentração de sais minerais do meio influenciou de forma positiva o crescimento das culturas, com maior acúmulo de biomassa em meio MS1/4. O mesmo foi verificado quando a concentração de sacarose foi elevada para 70 g.L⁻¹. A elevação do valor de pH inicial do meio de cultura para 6,5, assim como a manutenção das culturas em mesas giratórias numa velocidade de 130 rpm, também favoreceram a multiplicação das raízes. O emprego das melhores condições descritas acima em um único protocolo de cultura se mostrou uma estratégia eficiente para a manutenção da capacidade de multiplicação das raízes de *C. dendroides* ao longo do tempo em cultivo. Com relação à caracterização química, a extração por maceração dinâmica se mostrou mais eficiente para a maior parte dos extratos avaliados, tanto no que se refere à variedade de substâncias extraídas, quanto na concentração relativa das mesmas. As análises em CCD sugeriram a presença de substâncias das classes das saponinas e flavonoides. As análises em CLAE-DAD-UV mostraram, principalmente, a presença de flavonoides nos diferentes materiais avaliados. Os resultados alcançados demonstram o êxito do protocolo definido para a produção de raízes *in vitro* de *C. dendroides* empregando plantas propagadas *in vitro* como fonte de explantes, além de fornecer informações quanto às suas propriedades químicas que poderão servir de base para estudos do potencial medicinal da espécie.

Palavras-chave: Cleomaceae; Concentração salina, cromatografia, pH, sacarose, velocidade de agitação.

ABSTRACT

SAAVEDRA-DE-PAULA, A. M. Root culture of *Cleome dendroides* Schult & Schult f. and chemical characterization of *in vitro* materials and field-grown plants. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Plants are an important source of bioactive molecules whose synthesis usually occurs at low concentrations. The need to use large amounts of plant material for the commercial exploitation of these molecules makes the process less efficient and can compromise species conservation. This issue can be minimized by the application of plant tissue culture techniques through which *in vitro* production of metabolites of interest is possible. Among these techniques, the adventitious root cultures have great potential for bioactive's production because roots are constituted by differentiated cells. This study aims to: (1) evaluate the effect of different physical and chemical factors on *in vitro* root multiplication, and (2) to perform the chemical characterization of *Cleome dendroides*, an endemic herbaceous species of the Atlantic forest. As source of explants were used *in vitro* propagated plants. The parameters tested were: explant size (0.5; 1.0; 1.5 cm), light (dark and 16:8 hrs photoperiod), the medium total mineral salts (MS1/4; MS1/2; MS; 2MS), the sucrose concentration (10; 20; 30; 50; 70 ; 90 g.L⁻¹), the culture medium pH (5.0; 5.8, 6.0, 6.5 and 7.2) and agitation speed (60; 110; 130; 160 rpm). The explants were cultured in MS medium without hormone supplementation (MS0) or in the presence of 3.0 mg.L⁻¹ of IBA. The accumulation of biomass was quantified by measuring the dry weight after 45 days in culture. The chemical characterization was performed with *in vitro* materials (plants and root cultures) and field-grown plants, considering two methodologies of extraction (dynamic maceration and ultrasound-accelerated maceration) and chromatographic analyses. The results showed that the supplementation with AIB increased the production of roots when compared to cultures kept in MS0. Size of the explants influenced root proliferation only for cultures kept in the dark. However, the presence of light favored root multiplication. Considering the results obtained in these first assays, for the continuation of studies were selected explants with 0.5 cm cultured on medium supplemented with 3.0 mg.L⁻¹ AIB in the presence of light. The reduction in the total minerals salt concentration has a positive effect in root multiplication, mainly on MS1/4. The same response was observed when the sucrose concentration was raised to 70 g.L⁻¹. The increase of the initial pH value of the culture medium to 6.5, as well as maintenance of cultures under a speed agitation of 130 rpm, also favored the process of roots multiplication. The use of the best conditions described above in a single culture protocol proved an efficient strategy to maintain the multiplication capacity of roots over time in culture. Considering the chemical characterization, for most of the extracts evaluated, the dynamic maceration was more effective. The CCD analyses suggested the presence of saponins and flavonoids. The analyses in HPLC showed, mainly, the presence of flavonoids. The results demonstrated the feasibility in the production of *in vitro* root cultures of *C. dendroides* using *in vitro* propagated plants as source of explants. In addition showed its chemical profile, important information for studies related to the medicinal potential of the species.

Keywords: Cleomaceae; chromatography, *in vitro* culture, pH, saline concentration, speed agitation, sucrose

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Principais estruturas constituintes de alcaloides.....	23
Figura 2 -	Estrutura química do isopreno.....	24
Figura 3 -	Esqueleto básico dos flavonoides.....	25
Figura 4 -	Técnicas de Cultura de Tecidos Vegetais.....	27
Figura 5 -	Estrutura química básica de um glicosinolato.....	34
Figura 6 -	Espécime de <i>Cleome dendroides</i> ocorrente na trilha de acesso ao morro da Urca, Rio de Janeiro.....	35
Figura 7-	Metodologia empregada para a preparação de extratos etanólicos brutos por maceração acelerada por ultrassom.....	42
Figura 8-	Metodologia empregada para a preparação de extratos etanólicos brutos por maceração dinâmica.....	43
Figura 9 -	Culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> iniciadas a partir de explantes com diferentes tamanhos e mantidas na presença de luz, após 45 dias de cultivo.....	49
Figura 10-	Culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> iniciadas a partir de explantes com diferentes tamanhos e mantidas no escuro, após 45 dias de cultivo.....	50
Figura 11 -	Culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> estabelecidas em meio MS com diferentes concentrações de sais minerais, após 45 dias de cultivo.....	52
Figura 12 -	Culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> estabelecidas em meio MS com diferentes concentrações de sacarose, após 45 dias de cultivo.....	55
Figura 13 -	Culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> estabelecidas em meio de cultura MS apresentando diferentes valores de pH, após 45 dias de cultivo.....	57
Figura 14 -	Culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> estabelecidas em meio de cultura MS e mantidas em mesa agitadora sob diferentes velocidades de rotação, após 45 dias de cultivo.....	58
Figura 15 -	Culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> mantidas em condições controle (A) e na associação das melhores condições de cultivo (B), após 45 dias....	60

Figura 16 - Subcultura de raízes de <i>Cleome dendroides</i> mantidas em condições controle (A) e na associação das melhores condições de cultivo (B), após 45 dias.....	61
Figura 17 - Cromatografia em camada delgada de extratos de material coletado a campo e material produzido <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> para análise de saponinas.....	65
Figura 18 - Cromatografia em camada delgada de extratos etanólico bruto de raízes coletadas a campo e material produzido <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> para análise de saponinas.....	66
Figura 19 - Cromatografia em camada delgada de extratos de material coletado a campo e material produzido <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> para análise de flavonoides.....	67
Figura 20 - Cromatografia em camada delgada de extratos de raízes coletadas a campo e produzidas <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> para análise de flavonoides.....	68
Figura 21- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} de extrato etanólico bruto de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	73
Figura 22 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} de extrato etanólico bruto de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	74
Figura 23 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} do extrato etanólico bruto de folhas coletadas a campo de <i>C. dendroides</i>	75

Figura 24 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} da partição em hexano de extrato etanólico de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	76
Figura 25-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} da partição em hexano de extrato etanólico de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	77
Figura 26-	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} da partição em hexano de extrato etanólico de folhas coletadas a campo de <i>C. dendroides</i>	78
Figura 27-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} da partição em diclorometano de extrato etanólico de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	79
Figura 28-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} da partição em diclorometano de extrato etanólico de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	80
Figura 29-	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} da partição em diclorometano de extrato etanólico de folhas coletadas a campo de <i>C. dendroides</i>	81
Figura 30-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} da partição em acetato de etila de extrato etanólico de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	82

Figura 31-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} da partição em acetato de etila de extrato etanólico de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	83
Figura 32-	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} da partição em acetato de etila de extrato etanólico de folhas coletadas a campo de <i>C. dendroides</i>	84
Figura 33-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} do resíduo aquoso do extrato etanólico de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo, obtidos: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.	85
Figura 34-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} do resíduo aquoso do extrato etanólico de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	86
Figura 35-	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} do resíduo aquoso do extrato etanólico de folhas coletadas a campo de <i>C. dendroides</i>	87
Figura 36-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} de extrato etanólico bruto de raiz de <i>C. dendroides</i> coletada a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	89
Figura 37-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} de extrato etanólico bruto de raiz de <i>C. dendroides</i> coletada a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	90
Figura 38-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{275nm} de extrato etanólico bruto de raiz de <i>C. dendroides</i> coletada a campo, obtidos por maceração dinâmica.....	91

Figura 39-	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} de extrato etanólico bruto de raiz de <i>C. dendroides</i> coletada a campo.....	92
Figura 40-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} de extrato etanólico de parte aérea de planta <i>in vitro</i> de <i>C. dendroides</i> : (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	93
Figura 41-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} de extrato etanólico de parte aérea de planta <i>in vitro</i> de <i>C. dendroides</i> : (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	94
Figura 42-	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} de extrato etanólico de parte aérea de planta <i>in vitro</i> de <i>C. dendroides</i> : (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	95
Figura 43-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} de extrato etanólico de raiz de planta <i>in vitro</i> de <i>C. dendroides</i> : (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	96
Figura 44-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} de extrato etanólico de raiz de planta <i>in vitro</i> de <i>C. dendroides</i> : (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	97
Figura 45-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} de extrato etanólico de cultura <i>in vitro</i> de raízes de <i>C. dendroides</i> na condição controle: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	98
Figura 46-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} de extrato etanólico de cultura <i>in vitro</i> de raízes de <i>C. dendroides</i> na condição controle: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	99

Figura 47-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{254nm} de extrato etanólico de cultura <i>in vitro</i> de raízes de <i>C. dendroides</i> estabelecida nas melhores condições (MC): (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	100
Figura 48-	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV _{340nm} de extrato etanólico de cultura <i>in vitro</i> de raízes de <i>C. dendroides</i> estabelecida nas melhores condições (MC): (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.....	101
Figura 49-	Cromatograma obtido por CLAE-DAD-UV _{275nm} do regulador de crescimento AIB.....	103
Figura 50-	Cromatograma por CG-EM das partições em hexano (A) e diclorometano (B) do extrato etanólico bruto de folhas de <i>C. dendroides</i> coletadas a campo, obtidos por maceração dinâmica (1) e maceração acelerada por ultrassom.....	104

LISTA DE QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS

Quadro 1 -	Sistemas de solventes (fase móvel) e reveladores empregados nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD)	44
Tabela 1 -	Valores de pH do meio de cultura MS aferidos antes e depois do processo de autoclavagem (121°C por 15 min)	56
Tabela 2 -	Rendimento dos extratos brutos e partições obtidos a partir de material coletado a campo e material produzido <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i>	63
Tabela 3 -	Espectros de absorção no UV dos sinais com maiores porcentagens de área relativa dos cromatogramas de extratos etanólicos brutos de folhas de campo de <i>C. dendroides</i> e suas partições em acetato de etila e resíduo aquoso.....	87
Tabela 4 -	Espectros de absorção no UV dos sinais com maiores porcentagens de área relativa dos cromatogramas de extratos etanólicos brutos de raiz de campo e material <i>in vitro</i> de <i>C. dendroides</i>	101
Gráfico 1-	Influência do tamanho dos explantes e da suplementação com AIB no acúmulo de biomassa de culturas de raízes <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> , após 45 dias de cultivo. (A) Presença de luz ; (B) Escuro.....	48
Gráfico 2-	Influência da concentração salina do meio de cultura no acúmulo de biomassa de culturas de raízes <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> , após 45 dias de cultivo. (A) Meio sem suplementação hormonal; (B) Meio suplementado com 3 mg.L ⁻¹ de AIB.....	53
Gráfico 3-	Influência da concentração de sacarose no acúmulo de biomassa de culturas de raízes <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> , mantidas em meio suplementado com 3 mg.L ⁻¹ de AIB, após 45 dias de cultivo.....	55
Gráfico 4-	Influência do valor do pH do meio de cultura no acúmulo de biomassa de culturas de raízes <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> , mantidas em meio	

	suplementado com 3 mg.L ⁻¹ de AIB, após 45 dias de cultivo.....	57
Gráfico 5-	Influência da velocidade de agitação das mesas orbitais no acúmulo de biomassa de culturas de raízes <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> , mantidas em meio suplementado com 3 mg.L ⁻¹ de AIB, após 45 dias de cultivo.....	58
Gráfico 6-	Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> , mantidas em condições controle e na associação das melhores condições de cultivo (MC), após 45 dias.....	60
Gráfico 7-	Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i> , mantidas em condições controle e na associação das melhores condições de cultivo (MC), com subcultivo após 45 dias.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB -	Ácido indolilbutírico
BA -	6-benzilaminopurina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE-DAD-UV	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
DAD	Detector de rede de diodos
MS -	Meio de cultura de Murashige e Skoog, 1962
MS0 -	Meio de cultura de Murashige e Skoog isento de reguladores de crescimento
MS ^{1/2} -	Meio de cultura de Murashige e Skoog contendo 1/2 da composição salina
MS 1/4 -	Meio de cultura de Murashige e Skoog contendo 1/4 da composição salina
2MS -	Meio de cultura de Murashige e Skoog contendo o dobro da composição salina original
NP/PEG -	Revelador para cromatografia em camada delgada - solução de difenilboriloxietilamina adicionada à solução de polietilenoglicol 4000
PS -	Peso de matéria seca
Rf -	
rpm -	Rotação por minuto
UV -	Ultra-violeta
μmol m ⁻² s ⁻¹ -	Unidade de intensidade luminosa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
1.1 Plantas medicinais	22
1.2 Metabólitos secundários	23
1.3 Cultura de tecidos vegetais	27
1.3.1 <u>Cultura de tecidos vegetais aplicada às plantas medicinais</u>	29
1.3.2 <u>Culturas de raízes</u>	30
1.4 Gênero Cleome L.	33
1.5 Cleome dendroides Schult & Schult f.	35
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral	38
2.2 Específicos	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Material vegetal.....	39
3.2 Estabelecimento das culturas de raízes	40
3.3 Avaliação de fatores físicos e químicos sobre o acúmulo de biomassa nas culturas de raízes .	40
3.4 Análises estatísticas.....	42
3.5 Caracterização química	42
3.5.1 <u>Material vegetal</u>	42
3.5.2 <u>Preparo dos extratos</u>	42
3.5.3 <u>Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)</u>	44
3.5.4 <u>Análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV)</u>	46
3.5.5 <u>Análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)</u> ..	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Estabelecimento das culturas de raízes adventícias	48
4.2 Avaliação do rendimento dos extratos e análises cromatográficas	63
4.2.1 Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)	65
4.2.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV)	69
4.2.3 Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).	105
5 DISCUSSÃO	106
CONCLUSÃO	117

REFERÊNCIAS	
APÊNDICE A -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir dos materiais coletados a campo..... 133
APÊNDICE B -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir da partição em hexano de folhas de plantas coletadas a campo..... 135
APÊNDICE C -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir da partição em diclorometano de folhas de plantas coletadas a campo..... 136
APÊNDICE D -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir da partição em acetato de etila de folhas de plantas coletadas a campo..... 138
APÊNDICE E -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir do resíduo aquoso de folhas de plantas coletadas a campo..... 139
APÊNDICE F -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir de partes aéreas de plantas <i>in vitro</i> de <i>C. dendroides</i> 141
APÊNDICE G -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir de etanólicos brutos raízes de plantas <i>in vitro</i> de <i>C. dendroides</i> 143
APÊNDICE H -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir de cultura de raízes de <i>C. Dendroides</i> mantidas em condição controle..... 145
APÊNDICE I -	Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir de cultura de raízes de <i>C. Dendroides</i> submetidas a condição MC..... 147

INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

Os registros da utilização de plantas medicinais pelo homem remontam antigas civilizações, desde 3.000 a.C., como os chineses, egípcios, assírios e hebreus (MARTINS, 1994). Entretanto, o uso de plantas na medicina tradicional ou popular, na grande maioria das vezes, não é respaldado por estudos científicos (PEDROSO et al., 2007; ARNOUS et al., 2005). Um exemplo característico trata da espécie *Cassia grandis* (Fabaceae), indicada na medicina popular da Tailândia para o tratamento de doenças gastrointestinais e na cura de úlceras, sendo sua casca utilizada como cicatrizante e a resina presente na vagem, no tratamento de dores de ouvido (JUNIOR-VEIGA et al., 2005). Entretanto, pesquisas demonstraram que sua vagem é tóxica, podendo causar fortes diarreias (VILELLA et al., 2000).

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (JUNIOR-VEIGA et al., 2005). Este dado demonstra a relevância das pesquisas em produtos naturais vegetais e a importância do desenvolvimento tecnológico para avaliação das propriedades medicinais dessas espécies, somadas ao conhecimento popular (KYOSHABIRE et al., 2017).

O Brasil apresenta um enorme potencial a ser explorado na área dos produtos naturais devido à sua grande biodiversidade. Nesse sentido, diretrizes do Ministério da Saúde determinaram a investigação das plantas medicinais e a implantação da fitoterapia como prática oficial no Sistema Único de Saúde (SUS), política aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Entretanto, para que essa inclusão ocorra é essencial que os profissionais da área de saúde conheçam e tenham acesso a informações, não só sobre as atividades farmacológicas, como também sobre os efeitos tóxicos das plantas medicinais (SANTOS et al., 2011).

Embora seja reconhecida a importância das plantas medicinais como alternativa terapêutica, esses recursos ainda exigem a aplicação de estratégias de conservação

considerando que espécies de interesse medicinal vêm sendo retiradas do ambiente de forma extrativista sem controle ou fiscalização. Estudos têm demonstrado que a exploração dessas espécies tem sido realizada sem a preocupação com o manejo adequado, ou mesmo seu status de conservação, com vistas ao aproveitamento das substâncias de interesse (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002).

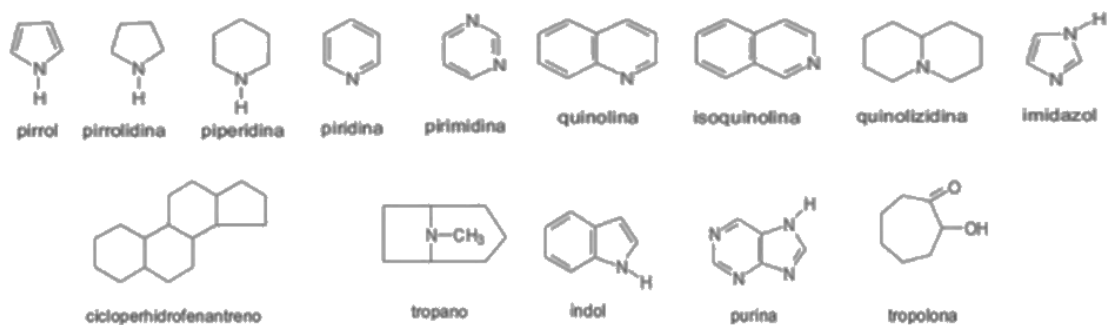
1.2 Metabólitos secundários

Uma variedade de substâncias químicas é sintetizada pelos vegetais, sendo classificadas como metabólitos primários e secundários. São considerados metabólitos primários aqueles envolvidos nos processos fisiológicos essenciais, como por exemplo, fotossíntese, respiração, crescimento, desenvolvimento e síntese proteica. Já o metabolismo secundário está relacionado a reações, derivadas muitas vezes do metabolismo primário, que dão origem a substâncias que conferem proteção e adaptação do organismo ao seu ambiente, como por exemplo, defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios UV, atração de animais dispersores de sementes (RAVEN et al., 2014; GANDHI et al., 2015), além de servirem como atrativos para polinizadores (GONZÁLEZ-TEUBER; HEIL, 2009). Essas substâncias, atuam no sistema de defesa dos vegetais às condições naturais adversas, e muitas vezes apresentam atividades biológicas (BAENAS et al., 2014), sendo, desta forma, utilizadas pelo homem no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e agroquímicos, assim como na elaboração de fragrâncias, corantes, pigmentos e conservantes para alimentos (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013; FAZAL et al., 2014). Os metabólitos secundários podem ser classificados em diferentes classes químicas, como exemplo os alcaloides, terpenos e flavonoides.

Os alcaloides são substâncias cíclicas que contêm um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo. Esta classe é representada por um grande número de substâncias estruturalmente muito diversas. Esta diversidade deve-se ao fato de a origem biogenética dos alcaloides não ser restrita a uma rota metabólica, havendo uma combinação de substâncias oriundas de uma ou mais rotas metabólicas distintas. Desta forma, classificam-se os alcaloides

de acordo com os sistemas de anéis que constituem a parte principal de suas estruturas (Figura 1), como por exemplo, indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, benzilisoquinolínicos, dentre outros. Estas moléculas muitas vezes têm efeitos farmacológicos relacionados ao sistema cardiovascular (ANDRAWS et al., 2005) e ao sistema nervoso central (SURH; KIM, 2010). São exemplos de alcaloides a cocaína e a atropina, usadas como estimulantes, a morfina, utilizada como analgésico e a quinina, fármaco usado como relaxante muscular (DE OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009; DE UGAZ, 2017).

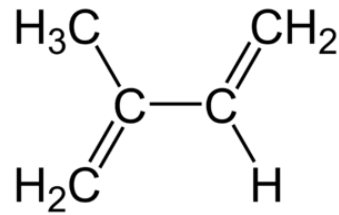
Figura 1- Principais estruturas constituintes de alcaloides.



Fonte: Adaptado de HENRIQUES et al. (2010)

Terpenoides são substâncias formadas a partir da condensação de unidades isoprênicas (Figura 2) provenientes da via do acetato-mevalonato. Os esqueletos carbonados dos terpenoides, em função da condensação de um número variável de unidade isoprênicas, podem ser classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40). Os mono e sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem as misturas chamadas óleos voláteis, muito utilizados no setor industrial de alimentos como condimentos e aromatizantes; de cosméticos, principalmente em perfumes; de produtos de higiene e farmacêutico, em preparo de infusões e na aromatização de formas farmacêuticas (SINGH; SHARMA, 2015).

Figura 2- Estrutura química do isopreno.

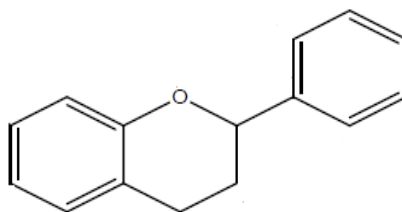


Fonte: SIMÕES; SPITZER (2010)

Dentre os triterpenos de origem vegetal, destacam-se as saponinas triterpênicas, que são glicosídeos de terpenos policíclicos. As saponinas também podem ser glicosídeos de esteroides. Essas substâncias se caracterizam por suas propriedades tensoativas em função de sua estrutura que apresenta uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra parte hidrofílica (açúcares). Desta forma, quando em solução, as saponinas formam espuma persistente e abundante. As saponinas apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidante, antineoplásica e imunoestimulante (NEGI et al., 2013), e têm sido empregadas na indústria farmacêutica não só como substâncias ativas, mas também como adjuvantes em formulações farmacêuticas (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004).

Os flavonoides são representados por produtos naturais amplamente distribuídos no Reino Vegetal, caracterizados por um esqueleto básico constituído por dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (Figura 3). Esse grupo químico provém de duas rotas biossintéticas: a do ácido chiquímico e a do acetato, sendo seus componentes classificados de acordo com suas estruturas moleculares em: flavonois, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas, antocianinas e chalconas. Os flavonoides possuem diversas funções nos vegetais, como proteção contra raios UV, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, e ainda como agentes alelopáticos. O interesse econômico por esta classe de substâncias decorre de suas propriedades farmacológicas, dentre elas, antitumoral, antioxidante, antiviral (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Figura 3- Esqueleto básico dos flavonoides.



Fonte: ZUANAZZI ; MONTANHA (2010)

Inúmeros metabólitos secundários têm sido utilizados como princípios ativos na elaboração de medicamentos. Para obtenção dessas substâncias é necessário estabelecer metodologias de extração, purificação, identificação e elucidação estrutural (FALKENBERG et al., 2010; SCHENKEL et al., 2004). Estudos fitoquímicos têm o intuito de conhecer a composição química de espécies vegetais, isolar e avaliar atividades biológicas de substâncias de interesse comercial ou medicinal, contribuindo desta forma com a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (NOLDIN, 2003; CAVALHEIRO, 2009).

Dentre as técnicas utilizadas para separação de substâncias, a cromatografia tem sido uma ferramenta extremamente eficiente. A Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia em Fase Gasosa (CG) e a Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD-UV) permitem obter informações sobre a presença de constituintes em extratos brutos e também servem para direcionar as operações de fracionamento visando ao isolamento de substâncias de interesse (FALKENBERG et al., 2010; SCHENKEL et al., 2004).

Os métodos de elucidação estrutural mais frequentemente aplicados têm sido a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (EM). O uso de técnicas cromatográficas acopladas às técnicas de elucidação estrutural, como a cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-UV/UV/EM) ou de ressonância magnética nuclear (CLAE-DAD-UV/RMN), tem permitido acelerar a busca por novas substâncias bioativas (FALKENBERG et al., 2010; SCHENKEL et al., 2004). Considerando a relevância dessas metodologias na pesquisa de plantas

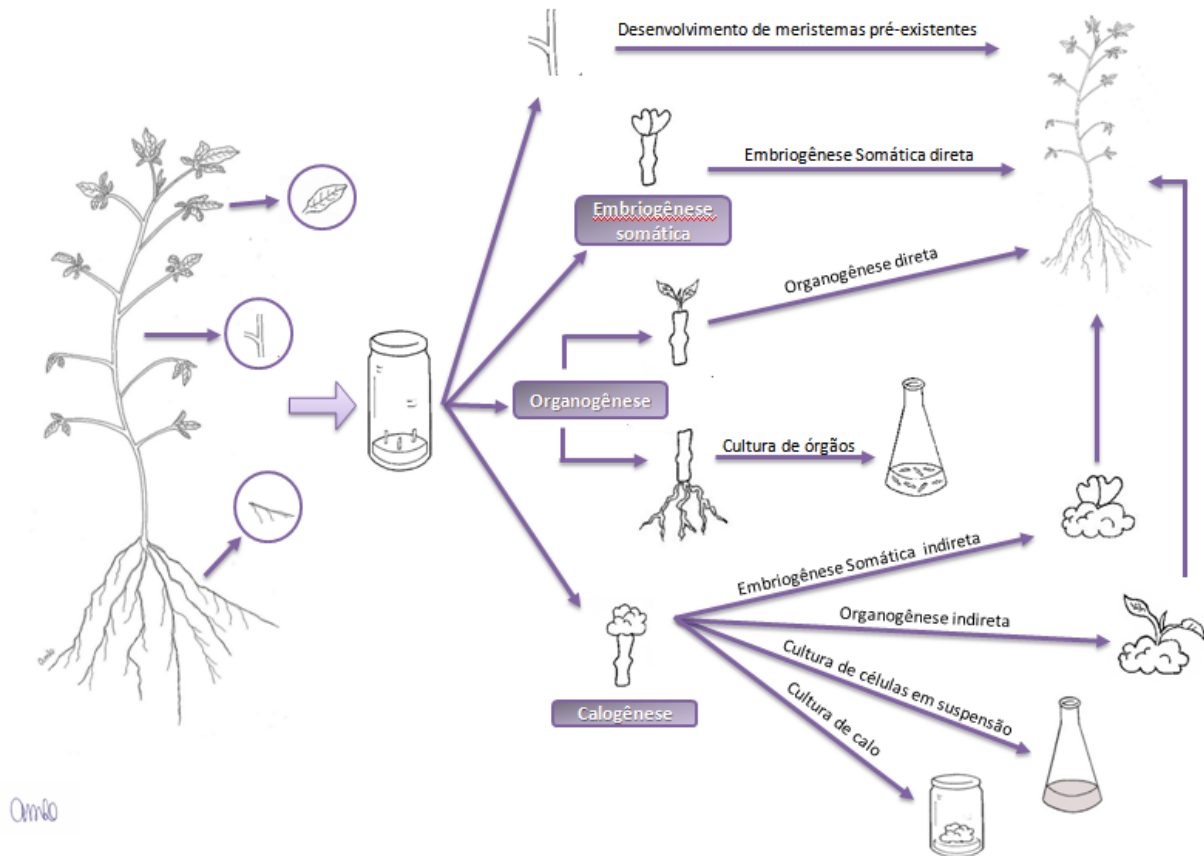
medicinais e exploração de metabólitos secundários, muitas têm sido empregadas nos estudos de substâncias bioativas produzidas *in vitro* (ALVES et al., 2010).

1.3 Cultura de tecidos vegetais

As técnicas de cultura de tecidos vegetais (CTV) consistem em um conjunto de metodologias de cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos, em condições controladas (HUSSAIN et al., 2012). Essas técnicas baseiam-se na totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade que estas células mantêm de regenerar parte ou todo o organismo, mesmo após sua diferenciação (TERMIGNONI, 2005). As técnicas de CTV (Figura 4) apresentam diversas aplicações, como a multiplicação de plantas em larga escala, a eliminação de vírus, o melhoramento vegetal, a conservação de germoplasma *in vitro* e a produção de metabólitos secundários (CANHOTO, 2010; ANASTÁCIOL et al., 2011; ABDULLAHIL et al, 2012; THORPE, 2012). Estas técnicas também contribuem com os estudos relacionados aos mecanismos moleculares, bioquímicos, genéticos e fisiológicos do desenvolvimento de órgãos e tecidos vegetais (GUERRA; NODARI, 2006).

Uma das técnicas mais utilizadas é a micropropagação, que consiste na proliferação de plantas sob condições controladas e assépticas a partir de um pequeno fragmento de tecido vegetal, denominado explante. Essa técnica permite obter clones da planta matriz livres de patógenos, em um curto espaço de tempo e independente de variações climáticas e sazonais (TERMIGNONI, 2005). A micropropagação pode ser alcançada por três vias: a proliferação de meristemas pré-existentes, onde as gemas são estimuladas a crescer originando novas partes aéreas; a indução de gemas adventícias a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênico, mas que em geral não se expressa na planta em condições naturais, processo denominado de organogênese, e através da embriogênese somática, caracterizada pelo desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas (GEORGE et al., 2008).

Figura 4- Técnicas de cultura de tecidos vegetais.



A organogênese e a embriogênese podem ocorrer por via direta ou indireta. Na via direta, as células do explante são induzidas à dediferenciação celular, seguido do processo de rediferenciação, dando origem a partes aéreas e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese somática). No caso da via indireta, as células do explante passam por dediferenciação, e, em seguida, por uma fase com intensa proliferação celular, resultando em uma massa de células desorganizadas denominada de calo, que pode sofrer rediferenciação ou então, manter-se na condição de células desorganizadas (RAVEN et al., 2014). A partir dos calos, pode-se estabelecer as chamadas culturas de células em suspensão, que consistem em células individuais ou agregados celulares inoculados em meio líquido mantidos sob agitação para fornecer aeração adequada (GUERRA; NODARI, 2006).

Outra técnica empregada no cultivo vegetal *in vitro* é a cultura de órgãos, sendo esse o termo que engloba as culturas que preservam a estrutura básica do explante inicial, com um crescimento organizado que pode ser continuamente mantido. São exemplos de culturas de órgãos: culturas de meristema, onde normalmente é utilizado o ápice como explante inicial dando origem a uma nova planta, culturas de embriões e culturas de raízes (GEORGE et al., 2008). Todos esses sistemas podem ser utilizados na produção *in vitro* de plantas medicinais e de metabólitos secundários.

1.3.1 Cultura de tecidos vegetais aplicada às plantas medicinais

O cultivo de plantas medicinais em condições de campo está sujeito às variações climáticas, ataque de patógenos, assim como à própria ação antrópica, o que muitas vezes dificulta a produção de material com qualidade e quantidade necessárias para atender a diferentes demandas. Já a produção de plantas medicinais pelas técnicas de cultura de tecidos vegetais possibilita a obtenção de forma contínua e controlada de material botânico e de metabólitos de interesse, permitindo o cultivo em qualquer época do ano, independentemente das condições climáticas, e sem a necessidade de extrativismo no ambiente natural. Desta forma, a produção *in vitro* contribui para a manutenção das espécies medicinais em seu habitat (RAVEN et al., 2014).

A aplicação das diferentes técnicas de cultura de tecidos vegetais na produção de substâncias de interesse comercial, com destaque para o uso medicinal, tem sido bastante difundida. Entretanto, uma característica importante relacionada à síntese dos metabólitos secundários pelas células vegetais, trata, muitas vezes, da necessidade da presença de organização estrutural dos tecidos para a síntese e armazenamento dessas substâncias (VERPOORTE; ALFERMANN, 2000). Neste sentido, as técnicas de cultura que envolvem tecidos diferenciados (culturas de órgãos, como brotos e raízes, além de embriões) podem ser vantajosas para a produção dessas substâncias quando comparadas às técnicas onde são empregados tecidos indiferenciados, como calos e culturas de células em suspensão.

1.3.2 Culturas de raízes

Frequentemente, a raiz é a primeira estrutura a surgir da semente durante o processo de germinação, possibilitando à plântula fixar-se no solo, permitindo assim a absorção de água e sais minerais, além de condução e armazenamento de substâncias presentes no solo (RAVEN et al., 2014). Pela sua própria localização no vegetal em contato com o solo/substrato, as raízes são fontes de muitas substâncias bioativas, principalmente empregadas na defesa contra a ação de microrganismos (REIS et al., 2011), e desta forma, o seu cultivo *in vitro* apresenta-se como uma importante estratégia de produção de metabólitos vegetais de interesse comercial (GAO et al., 2005; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR et al., 2002; MURTHY et al., 2016). Além disso, muitas vezes, as raízes multiplicadas *in vitro* apresentam uma alta capacidade proliferativa, o que pode resultar em maiores taxas de produção de metabólitos em um menor período de tempo, com a possibilidade de modulação da produção dos metabólitos (MURTHY et al., 2008).

As culturas de raízes *in vitro* podem ser iniciadas a partir de diferentes partes dos vegetais, sendo bastante utilizados os segmentos de folhas, caules e raízes (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007; HUSSAIN et al., 2012). Mas também podem ser iniciadas a partir de culturas de calos (LUDWIG-MÜLLER et al 2005). Entretanto, o uso de raízes produzidas *in vitro* como fonte de explantes apresenta a vantagem de não ser necessário eliminar a planta matriz (FRANKLIN; SHEEBA; LAKSHMI SITA, 2004). Além disso, uma mesma planta mantida em estoque *in vitro* pode servir para o fornecimento de explantes radiculares por um longo período de tempo.

Diversos fatores influenciam a produção de raízes *in vitro*. Dentre eles, destaca-se o balanço hormonal, sendo as auxinas o principal grupo de fitohormônios utilizado para a indução de raízes. As auxinas estão envolvidas em uma grande gama de efeitos fisiológicos, atuando com destaque no alongamento celular e enraizamento. Sua interação sinérgica evidenciada com hormônios da classe das citocininas está relacionada à regulação do processo de divisão celular (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dentre as espécies vegetais para as quais auxinas são essenciais à multiplicação de raízes *in vitro*, estão algumas espécies do gênero *Cleome*,

como *C. rosea* (SIMÕES et al., 2009; CORDEIRO et al., 2015) e *C. spinosa* (MORAES, 2015).

Embora a suplementação hormonal seja muito empregada na indução da multiplicação de raízes *in vitro*, outra estratégia que pode ser utilizada, que dispensa o uso de fitorreguladores, é a transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes*. Através desta metodologia são produzidas as chamadas *hairy roots* ou raízes em cabeleira, que se caracterizam por apresentarem um rápido crescimento (KARUPPUSAMY, 2009; RON et al., 2014).

Entretanto, a obtenção de cultura de raízes não transformadas, as chamadas raízes adventícias, é muito desejável, já que propicia a multiplicação sem a necessidade de alteração no genoma da planta (MARTIN et al., 2008). Muitos estudos têm sido realizados visando ao estabelecimento de protocolos de multiplicação de raízes *in vitro* não transformadas a partir de diversas espécies vegetais (MURTHY; HAHN; PAEK, 2008; CUI et al., 2010; CASTRO, 2015). Diferentes estratégias têm sido avaliadas, como o uso de biorreatores (BAQUE et al., 2012; HENKES, 2016), a manipulação de fatores químicos e físicos, tais como, variação no tamanho inicial do explante, luminosidade, pH, concentração de sais minerais, concentração de sacarose, velocidade de agitação, além da avaliação do efeito da suplementação hormonal ao meio de cultura (GUERRA; NODARI, 2006; GEORGE et al., 2008).

O tamanho do explante é um fator que pode ser determinante no processo de estabelecimento de sistemas *in vitro*, como as culturas de raízes. Segundo Hartmann e colaboradores (1997), o tamanho do explante tem relação direta com as divisões celulares, apresentando, desta forma, uma grande influência na sobrevivência e capacidade de crescimento das culturas.

A presença de luz também pode influenciar o acúmulo de biomassa nas culturas *in vitro* (KOZAI, 1991; KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999). Apesar de as taxas de fotossíntese em culturas *in vitro* serem consideradas baixas (VIÑA et al., 1999) para a maior parte das espécies já estudadas, a intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, mantida com o emprego de lâmpadas fluorescentes, tem sido a mais empregada para as culturas de raízes *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O pH é um fator muito importante no preparo do meio de cultura, uma vez que ele influencia na disponibilidade de nutrientes e fitorreguladores. Dependendo do pH utilizado, pode ocorrer maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Como por exemplo o amônio, componente do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), valores de pH mais baixos (ácidos) dificultam a utilização do amônio, enquanto valores mais altos (básicos) diminuem a utilização do nitrato (MARTIN; ROSE, 1976; STREET; SHEAT, 1958). Durante o crescimento da cultura de raízes, o pH do meio se altera à medida que diferentes íons são absorvidos e os produtos metabólicos são dispersos no meio de cultura. A autoclavagem e a estocagem também podem acarretar na acidificação dos meios de cultura devido à perda de algumas substâncias que se volatilizam em altas temperaturas (SKIRVIN et al., 1986).

Segundo George e colaboradores (2008), os microelementos e os macronutrientes do meio de cultura agem como sinais para a alteração da fisiologia da planta. Esta resposta fica ainda mais evidente nas raízes, cuja principal função é a captação de íons do solo. Desta forma, nas condições *in vitro*, muitas vezes pode ser necessário um ajuste na concentração de sais minerais do meio de cultura, a fim de propiciar um melhor crescimento das culturas.

A sacarose é utilizada na maioria das culturas de tecidos como fonte de carboidrato em substituição ao carbono que a planta obtém através do processo de fotossíntese, uma vez que este processo nas condições *in vitro* é reduzido. Além da sacarose, também podem ser utilizadas outras fontes como manitol, dextrose e frutose (SAIMAN et al., 2012). A concentração inicial de sacarose pode afetar parâmetros como o crescimento e a produção de metabólitos secundários, pois é de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (PASQUAL, 2001). Além disso, ela atua como agente osmótico que pode induzir ao estresse nas culturas quando utilizada acima de determinadas concentrações (SHOHAEL et al., 2006). A concentração padrão utilizada no preparo do meio de cultura MS, meio de cultura mais utilizado para cultura de tecidos vegetais é de 30 g.L⁻¹. Embora modificações nesse valor possam beneficiar o cultivo *in vitro* (PASQUAL, 2001), altas concentrações de sacarose no meio, podem ser prejudiciais, por induzir a redução da capacidade fotossintética das plantas (YAMADA; SATO, 1978). Tais fatos demonstram a

importância em se avaliar a concentração de sacarose empregada no meio de cultura, uma vez que ela pode influenciar de forma significativa a produção *in vitro* (BERNARDI et al., 2004).

Além dos fatores citados anteriormente, o acúmulo de biomassa nas culturas de raízes também pode ser influenciado pela origem do material botânico. Para algumas espécies, culturas oriundas de raízes obtidas de plantas propagadas e mantidas *in vitro* apresentam menor acúmulo de biomassa quando comparadas a culturas provenientes de plantas obtidas a partir de germinação sob condições *in vitro* (CASTRO, 2015; SCHNEIDERS et al., 2015). Esta diferença no potencial de multiplicação das raízes pode estar relacionada ao fato de que as plantas recentemente germinadas, mesmo que em condições *in vitro*, apresentam um ritmo de crescimento ativo, característico de um desenvolvimento pós-seminal. Estudos anatômicos indicam diferenças histológicas entre estas duas fontes de materiais para fornecimento de explantes, onde as plantas propagadas *in vitro* guardam mais semelhanças ao material adulto, do que as plântulas da mesma espécie (ALBARELLO et al., 2001; MAYER et al., 2008). As plantas propagadas e mantidas *in vitro*, estariam em uma condição fisiológica mais estável, com um ritmo de crescimento já estabilizado. Entretanto, o estabelecimento de culturas a partir de plantas propagadas *in vitro*, apresenta vantagens, como o fato de não ser necessária à coleta frequente de sementes para o processo de germinação ou a frequente retirada de plantas de seu ambiente natural (SCHNEIDERS et al., 2015). Além disso, o fato dessas plantas estarem mantidas sob condições assépticas facilita os processos *in vitro*, uma vez que dispensa a etapa de descontaminação.

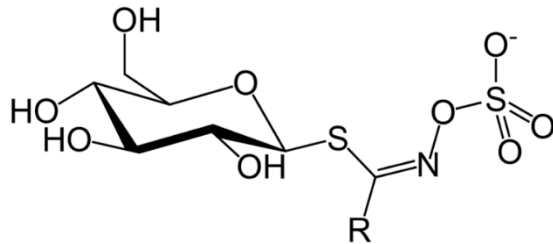
1.4 Gênero *Cleome* L.

O gênero *Cleome*, pertencente à família Cleomaceae, contém de 180 a 275 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais da África, América, Ásia e Oceania (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017). No Brasil, encontram-se 21 espécies e duas subespécies (MACIEL et al., 2013), as quais recebem o nome popular de mussambê (COSTA-E-SILVA, 2000). As espécies do gênero têm importância econômica e ornamental devido às suas belas inflorescências, que se apresentam de diversas cores e tons (SIMÕES et al., 2009).

Além da importância ornamental, algumas espécies são utilizadas na medicina popular. No Brasil, duas espécies apresentam registro de uso medicinal. Folhas da espécie *C. spinosa* são utilizadas na região nordeste na forma de chá e indicadas contra asma, tosse e bronquite enquanto suas flores são indicadas contra febre (AGRA et al., 2007). Na Amazônia, *C. latifolia* é usada na forma de infusão, como analgésico e antitérmico (DI STASI, 1994). Outras espécies do gênero também apresentam amplo uso popular. Dentre essas destacam-se *C. gynandra* e *C. viscosa*, espécies muito utilizadas na medicina tradicional da Índia e em países da África. O óleo preparado a partir das sementes de *C. gynandra* é empregado no tratamento de doenças da pele (DAS et al., 1999), e para o alívio da dor de dente (HEBBAR et al., 2004) e úlcera péptica (TIWARI; PADHYE, 1993). Enquanto na forma de pó, as sementes são utilizadas para estancar hemorragias (DAS et al., 1999). As folhas de *C. gynandra* também apresentam uso popular, sendo utilizadas contra a febre decorrente da malária (SINGH; ALI, 1994). Com relação à espécie *C. viscosa*, suas sementes são popularmente utilizadas pelos efeitos anti-helmíntico, laxativo e anticonvulsivo (RAY; CHATTOPADHYAY, 1980). Além disso, o sumo obtido de folhas é usado no tratamento de otites (CHOPRA et al., 1956) e dor de dentes (SINGH, 1986).

Várias espécies do gênero *Cleome* já foram investigadas sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico, apresentando grande potencial para exploração de metabólitos secundários (BALA et al., 2010; APARADH et al., 2012). Entre as diversas classes de metabólitos já identificadas em *Cleome* sp. destacam-se glicosinolatos, flavonoides e terpenos. Estas substâncias já foram identificadas em 24 espécies do gênero e estão relacionadas a diversas atividades medicinais, como por exemplo, antineoplásica, fungicida, bactericida e nematocida (DAXENBICHLER et al., 1991; FAHEY et al., 2001; HALKIER; GERSHENZON, 2006; APARADH et al., 2012). Outras propriedades medicinais já detectadas em espécies de *Cleome* são: atividades antinociceptiva (BOSE et al., 2011), hepatoprotetora (GUPTA; DIXIT, 2009), anti-helmíntica, analgésica, antiemética (PILLAI; NAIR, 2012), antioxidante (NARENDHIRAKANNAN et al., 2005) e anti-inflamatória (NARENDHIRAKANNAN et al., 2007).

Figura 5- Estrutura química básica de um glicosinolato.



Fonte: Adaptado de SANTOS (2010)

1.5 *Cleome dendroides* Schult & Schult f.

Cleome dendroides é uma espécie endêmica do bioma Mata Atlântica nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, área de intensa atividade antrópica, estando sua preservação em iminente ameaça. Existem apenas alguns registros de ocorrência da espécie em áreas de conservação, como no Parque Estadual da Serra da Tiririca (Niterói), Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Teresópolis, Nova Friburgo e Petrópolis), Parque Estadual de Paraty-Mirim (Paraty) e Morro da Urca (Rio de Janeiro. Área Protegida - Tombamento Federal/73 e decreto municipal 02/06/2006). Registros em áreas urbanas da cidade do Rio de Janeiro datam de 1916, 1935 e 1957, nos bairros da Gávea, Recreio dos Bandeirantes e Grajaú, respectivamente (COSTA-E-SILVA, 2000; ANDREATA et al., 2008). Estes dados indicam a necessidade de um levantamento e estudo florístico para que essa espécie seja incluída na lista vermelha de espécies ameaçadas.

Cleome dendroides possui hábito arbustivo, atingindo dois metros de altura. Apresenta folhas compostas com cinco a onze folíolos e inflorescências vistosas (Figura 6), dispostas em corimbo, de coloração roxa intensa (HOOKER, 1834; COSTA-E-SILVA, 2000).

Figura 6 - Espécime de *Cleome dendroides* ocorrente na trilha de acesso ao morro da Urca, Rio de Janeiro.



Legenda: Detalhe da inflorescência. Barra: 3 cm. Foto: Cláudia Simões Gurgel (UERJ).

Cleome dendroides vem sendo objeto de estudos inéditos sob o aspecto biotecnológico e fitoquímico no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), que integra o Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Já foram estabelecidos protocolos de micropropagação, calogênese e culturas de raízes, além da avaliação fitoquímica de alguns materiais produzidos *in vitro* e de materiais coletados a campo (CASTRO, 2015). Estudos comparativos da germinação sob condições *in vivo* e *in vitro* também foram realizados, junto a outras espécies do gênero (CASTRO et al., 2014). Os resultados já alcançados demonstram o potencial de exploração da espécie aplicando estratégias biotecnológicas e reforçam a importância da continuidade desses estudos, visando

estabelecer metodologias adequadas à exploração de metabólitos de interesse produzidos sob condições *in vitro*.

Diante do exposto, o presente estudo propõe avaliar o efeito de diferentes fatores físicos e químicos no estabelecimento de culturas de raízes de *Cleome dendroides*, a partir de plantas propagadas *in vitro*. Este trabalho dá continuidade a avaliação da multiplicação de raízes *in vitro* com a espécie, realizada utilizando explantes radiculares obtidos de plantas oriundas do processo de germinação *in vitro* (CASTRO, 2015). O presente estudo visa o estabelecimento de um sistema eficiente que possa ser explorado para a produção de substâncias bioativas de interesse, sem a necessidade de retirada de material botânico da natureza. Adicionalmente, visa investigar a presença de classes de metabólitos de importância medicinal no material *in vitro*, comparando ao material vegetal obtido em condições naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer a cultura de raízes adventícias da espécie *Cleome dendroides* a partir de plantas propagadas *in vitro* e realizar a caracterização química dos materiais produzidos *in vitro* e coletados a campo.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar a influência de fatores físicos e químicos na produção *in vitro* de raízes adventícias;
- ✓ Estabelecer a melhor condição para a multiplicação das raízes;
- ✓ Monitorar a capacidade de multiplicação das raízes *in vitro* ao longo do tempo em cultivo;
- ✓ Caracterizar os extratos e partições pelas técnicas cromatográficas CCD, CLAE-DAD-UV e CG.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relativos ao cultivo *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) do NBV/IBRAG/UERJ, na Central Analítica Fernanda Coutinho do Instituto de Química (IQ) da UERJ, e no Laboratório de Toxicologia Ambiental - DCB - ENSP – FIOCRUZ.

3.1 Material vegetal

O material botânico utilizado para dar início aos estudos encontra-se depositado no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ), sob o número de registro HRJ 11.104.

O material de campo (folha, caule e raiz) foi coletado no Parque Estadual da Serra da Tiririca, fragmento de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, município de Niterói, (22° 58' 04" S e 43° 01' 17" W).

Como material vegetal para o cultivo *in vitro*, foram utilizadas, como fonte de explantes radiculares, plantas de *Cleome dendroides* propagadas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 8 g.L⁻¹ de ágar e suplementado com 2 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BA). Para a indução da rizogênese, os brotos propagados *in vitro* foram transferidos para meio MS sem adição de reguladores de crescimento (MS0). Esta etapa foi realizada com base no trabalho de Castro (2015). A manutenção deste estoque de plantas *in vitro* foi realizada pelo subcultivo de segmentos caulinares com 2 - 3 cm de comprimento para meio fresco de igual composição a cada 45 dias. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a temperatura de 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa de 45 μmol m⁻²s⁻¹.

3.2 Estabelecimento das culturas de raízes adventícias

As culturas de raízes adventícias foram iniciadas a partir de segmentos radiculares desprovidos de raízes laterais, excisados da região próxima ao caule (primeiros 2 - 3 cm a partir do caule) de plantas propagadas *in vitro* com 45 dias. Os explantes foram inoculados em frascos tipo erlenmeyer (50 mL), contendo 25 mL de meio de cultura MS líquido com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose. As culturas foram mantidas em MS0 ou em meio suplementado com o fitorregulador ácido indolbutírico (AIB) na concentração de 3,0 mg.L⁻¹, por se tratar da suplementação hormonal que resultou na maior produção de biomassa em trabalho anterior com a espécie (CASTRO, 2015).

O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C por 15 min). Foram inoculados quatro explantes por frasco, totalizando cinco frascos por tratamento (20 explantes). Os frascos foram vedados com tampa dupla de folha de alumínio e mantidos sob agitação em mesas giratórias orbitais a 110 rpm.

Para a determinação do acúmulo de biomassa após 45 dias em cultivo, as culturas foram removidas do meio de cultura e secas em papel de filtro. A seguir, foram transferidas para estufa a 45°C por 24 h, para a quantificação do peso de matéria seca (PS). Para a determinação dos valores iniciais de biomassa, foram utilizadas 20 amostras de quatro explantes, no tamanho usado para o início das culturas, que foram secas em estufa, conforme metodologia descrita acima.

3.2.1 Avaliação de fatores físicos e químicos sobre o acúmulo de biomassa nas culturas de raízes

Inicialmente, foram avaliados o tamanho dos explantes e a influência da luminosidade aplicada às culturas. Segmentos radiculares de 0,5; 1,0 e 1,5 cm foram inoculados nos meios de cultura descritos acima. A influência da luz foi avaliada com a manutenção das culturas sob fotoperíodo de 16h luz/8h escuro e intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, gerada por lâmpadas fluorescentes brancas, ou pela manutenção das culturas no escuro.

Uma vez determinado o tamanho dos explantes a serem utilizados para iniciar as culturas e as condições de luminosidade ideais, esses parâmetros passaram a ser utilizados nos próximos ensaios experimentais, visando avaliar a influência de outros fatores físicos e químicos sobre a capacidade de multiplicação das raízes.

O efeito da concentração total de sais minerais do meio MS foi avaliado pelo cultivo dos explantes radiculares em meio com diferentes concentrações desta composição salina, conforme a seguir: concentração padrão (MS), concentração reduzida em 50% ($MS^{1/2}$), concentração reduzida em 75% ($MS^{1/4}$) e o dobro da concentração padrão (2MS). Os ensaios foram realizados tanto com a adição do hormônio AIB (3 mg.L^{-1}) ao meio de cultura, quanto em meio MS0.

A fim de determinar a influência da concentração da fonte de carbono fornecida ao meio de cultura sobre a capacidade de proliferação das raízes, foram estabelecidas culturas em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose (10; 20; 30; 50; 70; 90 g.L^{-1}).

Para verificar a influência do pH do meio de cultura, o valor inicial deste parâmetro foi ajustado para 5,0; 5,8; 6,0; 6,5 e 7,2. Após a autoclavagem, porém antes do preparo das culturas, a aferição do pH foi novamente realizada, para verificar possíveis alterações decorrentes da exposição do meio de cultura às altas temperaturas e pressão necessárias ao processo de esterilização.

Para avaliar o efeito da velocidade de rotação aplicada às mesas agitadoras sobre a multiplicação das raízes *in vitro*, as culturas foram mantidas em diferentes velocidades (60; 110; 130; 160rpm).

Uma vez determinadas as melhores condições para a produção de biomassa com base nos parâmetros acima descritos, as mesmas foram reunidas em um novo protocolo, denominado MC (Melhores Condições). As culturas mantidas nesta formulação foram acompanhadas por 90 dias, com subcultura realizada após os primeiros 45 dias, visando avaliar a manutenção da capacidade de multiplicação *in vitro* das raízes ao longo do tempo em cultivo. Para a realização da subcultura, foi aplicada a mesma metodologia descrita acima, a saber: quatro segmentos radiculares, retirados da cultura de origem e desprovidos de raízes

laterais, inoculados em frasco erlenmeyer contendo meio fresco de igual composição. O acúmulo de biomassa foi avaliado como descrito anteriormente.

3.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata, com um número amostral de 20 explantes para cada repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00.

Para a comparação entre as culturas mantidas na condição controle e as culturas mantidas no protocolo que reuniu as melhores condições de crescimento foi aplicado o teste t com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5.00.

3.5 Caracterização química

3.5.1 Material vegetal

Para as análises fitoquímicas foram utilizados materiais coletados a campo e obtidos sob condições *in vitro*. O material de campo (folha, caule e raiz) foi coletado no Parque Estadual da Serra da Tiririca, fragmento de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, município de Niterói, (22° 58' 04" S e 43° 01' 17" W), em dezembro de 2015, quando as plantas se encontravam no período de floração. O material produzido sob condições *in vitro* consistiu da parte aérea e raiz de plantas propagadas *in vitro*, mantidas como estoque em meio MS0 e também de culturas de raízes.

3.5.2 Preparo dos extratos

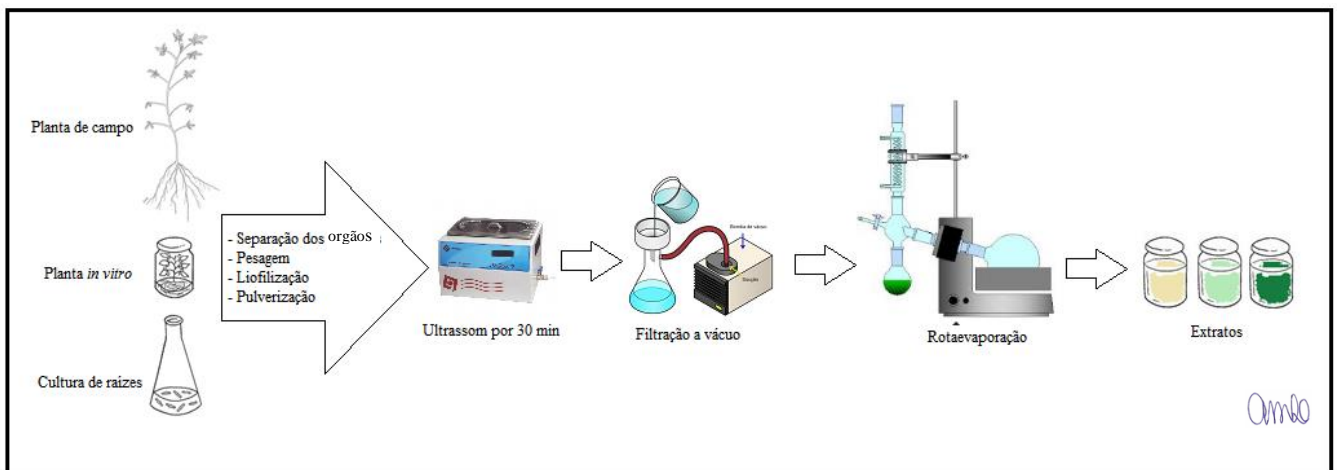
Para o preparo dos extratos, os materiais vegetais (partes aéreas e raízes de plantas de campo e de plantas propagadas *in vitro* e culturas de raízes) foram pesados e em seguida armazenados em potes de vidro (13 cm x 6,5 cm) à temperatura de -20° C por dois dias. Após

o congelamento, foram liofilizados por cinco dias e, em seguida, pulverizados em moinho IKA®WERKE (mod. MF10basic).

Foram avaliadas duas metodologias de extração: maceração acelerada por ultrassom e maceração dinâmica.

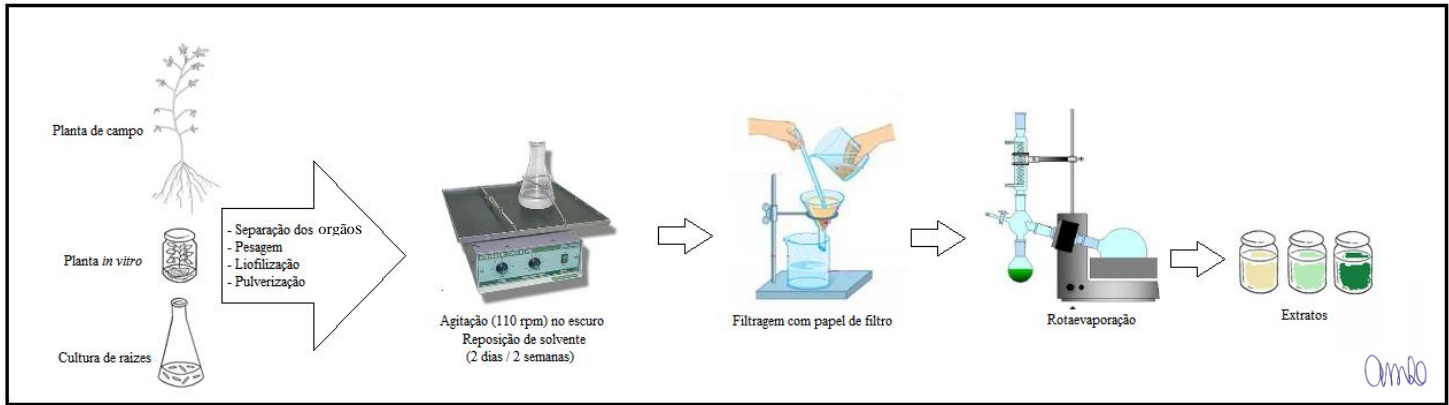
Para a metodologia de extração com ultrassom (Figura 7), 10 g de material seco foram adicionados a 50 ml de etanol 95° (VETEC), e submetidos a banho de ultrassom por 30 min. Em seguida, o material foi filtrado em algodão, sob vácuo. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório (Marconi®) com temperaturas que variaram de 35°C a 50°C e após a secagem, foi calculado o rendimento da extração.

Figura 7- Metodologia empregada para a preparação de extratos etanólicos brutos por maceração acelerada por ultrassom.



Para a metodologia de extração por maceração dinâmica (Figura 8), 10 g de material seco foram adicionados a 50 mL de etanol 95° (VETEC). O frasco foi mantido no escuro, sob agitação constante (110 rpm) e à temperatura de 26 ± 2 °C. A fim de realizar uma extração exaustiva, durante duas semanas, o solvente foi trocado a cada dois dias. O solvente recolhido era armazenado no escuro à temperatura de 4 °C. Ao final do processo, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório (Marconi®) a 35°C e, após secagem, foi calculado o rendimento da extração.

Figura 8 - Metodologia empregada para a preparação de extratos etanólicos brutos por maceração dinâmica.



Em função da disponibilidade de material, apenas os extratos brutos etanólicos de folha de campo foram particionados. Estes extratos foram resolubilizados em água e em seguida submetidos ao fracionamento por partição com solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, além do resíduo aquoso. Em seguida foram concentrados em evaporador rotatório e, após secagem, foi calculado o rendimento de cada partição.

3.5.3 Análise 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} 10 x 10cm, espessura de 0,20 mm (Macharey-Nagel®). As amostras dos extratos foram aplicadas nas placas em bandas com o auxílio de um tubo capilar, a fase móvel foi específica para cada grupo químico (Quadro 1).

Quadro 1 - Sistemas de solventes (fase móvel) e reveladores empregados nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD).

Classe química	Fase móvel (v/v)	Revelador	Preparação das placas após a revelação	Visualização
Terpenos	Hexano: diclorometano (25:75)	Liebermann-Burchard*	Secagem da placa na capela	Luz visível
	Hexano: diclorometano (50:50)			
	Diclorometano			
	Diclorometano: acetato de etila (90:10)			
	Diclorometano: acetato de etila (75:25)			
	Diclorometano: acetato de etila (50:50)			
	Diclorometano: acetato de etila (25:75)			
	Acetato de etila (100)			
Saponinas	Clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60:32:12:8)	Anisaldeído sulfúrico**	Secagem da placa na capela	Luz visível
Flavonoides	Diclorometano: acetato de etila (50:50)	NP/ PEG***	A placa foi aquecida a 100°C em placa aquecedora por 5 min.	Ultravioleta (254nm)
	Diclorometano: acetato de etila (25:75)			
	Acetato de etila			
	Acetato de etila: metanol (75:25)			
	Metanol (100)			
	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)			

*Liebermann-Burchard - 5ml de anidrido acético e 5ml de ácido sulfúrico PA, adicionado cuidadosamente a 50ml de etanol absoluto.

**Anisaldeído sulfúrico - solução de 0,5ml anisaldeído em 10ml de ácido acético glacial, 85ml de metanol e 5ml de ácido sulfúrico PA

*** NP/PEG - solução de difenilboriloxietilamina a 1% em metanol adicionada à solução de polietilenoglicol 4000 a 1% em metanol

Todas 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. Após a eluição, quando a frente do solvente

atingiu a distância de 1,5 cm da extremidade superior, as placas foram retiradas da cuba com auxílio de pinça e transferidas para capela de exaustão a fim de evaporar o solvente residual. Os reveladores variaram conforme a classe química analisada (Quadro 1).

Cálculo para indicar o Rf (Fator de retenção) :

$$Rf = a/v$$

Onde:

Rf = Fator de retenção

a = distância percorrida pelo composto

v = distância percorrida pelo solvente

3.5.4 Análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV)

Amostras de 10 mg dos extratos secos foram pesadas e diluídas em 1 mL de metanol grau espectroscópico (Tedia, Brasil). Em seguida, foram submetidas à solubilização com auxílio de ultrassom por 5 minutos e filtradas em filtros Millipore (Merck, Alemanha) de 0,45 μm .

A avaliação cromatográfica das amostras foi realizada por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV) acoplada a detector de rede de diodos (DAD), utilizando um sistema cromatográfico Shimadzu Class-VP, equipado com bomba LC-10AD, misturador FCV 10AL, desgaseificador DGU-14A, forno CTO-10AS, analisador DAD-UV-VIS SPD-M10A e controlador SCL-10A. A separação foi realizada usando uma coluna C18 Supelco (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 μm). A fase móvel foi constituída por água ultrapura acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) (A) e acetonitrila (B). O método empregado foi o de gradiente e consistiu em: início 95% (A) / 5% (B); em 80 minutos 5% (A) / 95% (B); em 80,01 minutos 95% (A) / 5% (B); mantendo nessa condição por 10 minutos. A detecção foi realizada em 254, 275 e 340 nm, empregando um fluxo de 1 mL/min, e um volume de injeção de 20 μL . Os cromatogramas foram manipulados com auxílio do programa Class-VP.

3.5.5 Análise por cromatografia com fase gasosa (CG)

As partições de hexano e diclorometano do extrato etanólico bruto de folha de campo foram submetidas à derivação com base no método descrito por Bannon e colaboradores (1982). Para o processo, 1mg de amostra foi misturado a 5 mL de solução de metóxido de sódio ($0,25 \text{ mol.L}^{-1}$), 15 mL de solução de NaCl 10% e 3 mL de diclorometano. A seguir, a mistura foi submetida a banho de ultrassom por 20 min, transferida para uma ampola de decantação e após 3 minutos, a fase inferior (diclorometano) foi recolhida e diluída na proporção 1:10. As amostras foram submetidas a análise por CG utilizando um sistema sistema cromatográfico automatizado Scion GC-TQ-MS 456 com injetor automático e coluna capilar Bruker BR-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil, com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). 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 min e mais 11 min para recondicionamento do equipamento. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C, e da linha de transferência, 270°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 cm^3/min . O volume injetado foi de 1 μL com divisão de fluxo de 1:10. A faixa de varredura das razões massa/carga (m/z) foi de 40 a 500.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento das culturas de raízes adventícias

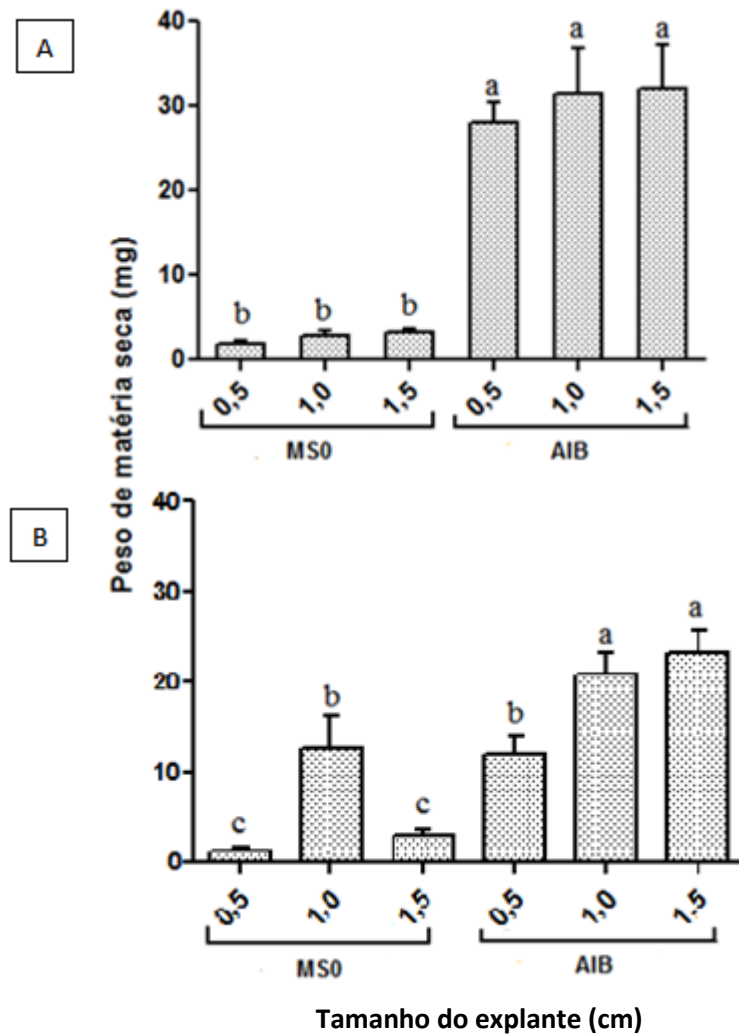
Os parâmetros avaliados no presente trabalho influenciaram a capacidade de multiplicação *in vitro* das raízes adventícias de *C. dendroides*. A suplementação do meio de cultura com 3,0 mg.L⁻¹ de AIB, mostrou-se um fator importante para a indução da rizogênese *in vitro*. Culturas mantidas na presença deste regulador de crescimento alcançaram maiores valores de acúmulo de biomassa quando comparadas às culturas estabelecidas em meio MS0 (Gráficos 1A e 1B).

O tamanho dos explantes não resultou em diferenças significativas quanto ao acúmulo de biomassa nas culturas mantidas em presença de luz (Gráfico 1A). Já para aquelas mantidas no escuro, o aumento do tamanho dos explantes resultou em maior capacidade de proliferação (Gráfico 1B).

A luminosidade influenciou a capacidade de proliferação das raízes. A manutenção das culturas em presença de luz resultou em maior acúmulo de biomassa (Figura 9 e Gráfico 1A), em relação às culturas mantidas no escuro (Figura 10 e Gráfico 1B). Na presença de luz, as culturas apresentaram início de crescimento logo após a primeira semana de cultivo, com a formação de raízes laterais finas e de coloração branca. O mesmo padrão de crescimento também foi observado para as culturas mantidas no escuro. Entretanto, para essas culturas, o início do crescimento foi observado somente a partir da terceira semana de cultivo.

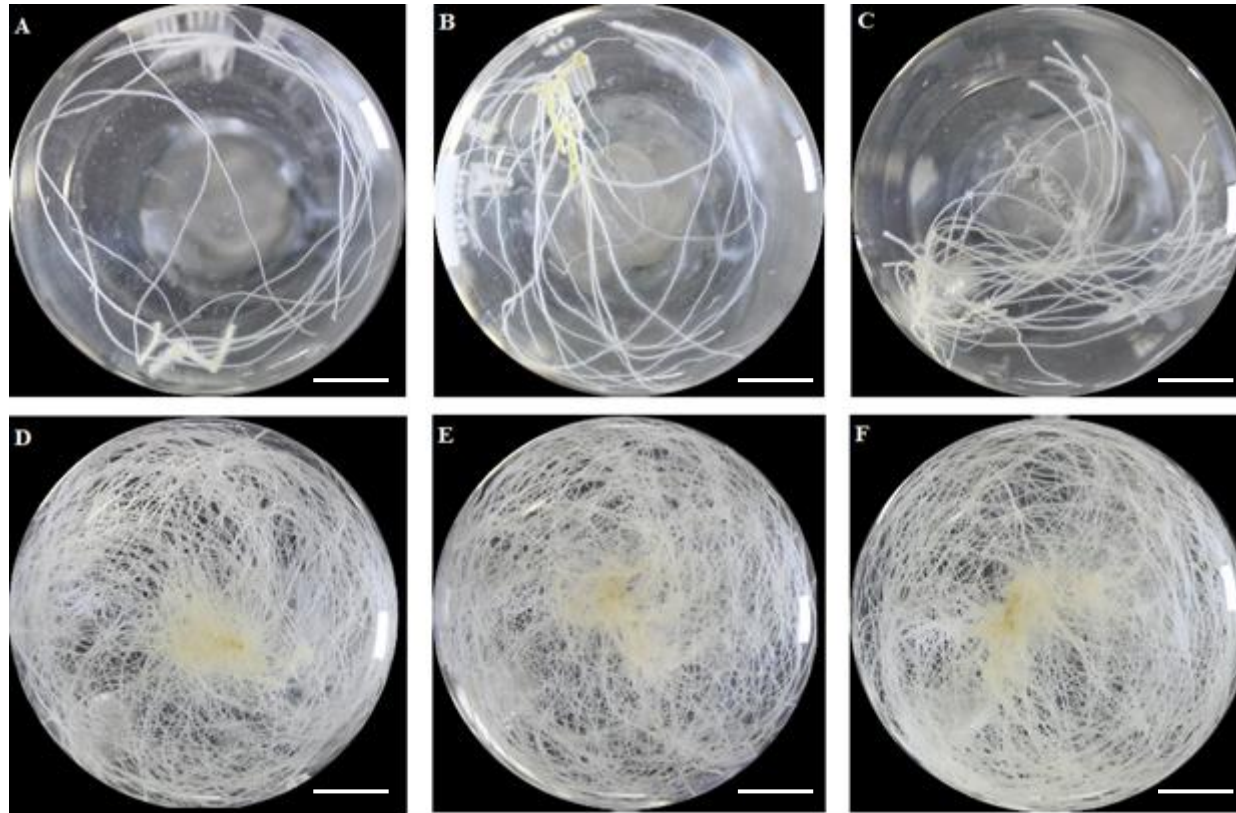
Em função desses resultados, foram selecionados o tamanho inicial de explantes de 0,5 cm e a manutenção das culturas em presença de luz, como condições mais adequadas a serem empregadas nas próximas etapas do trabalho.

Gráfico 1- Influência do tamanho dos explantes e da suplementação com AIB no acúmulo de biomassa de culturas de raízes *in vitro* de *Cleome dendroides*, após 45 dias de cultivo.



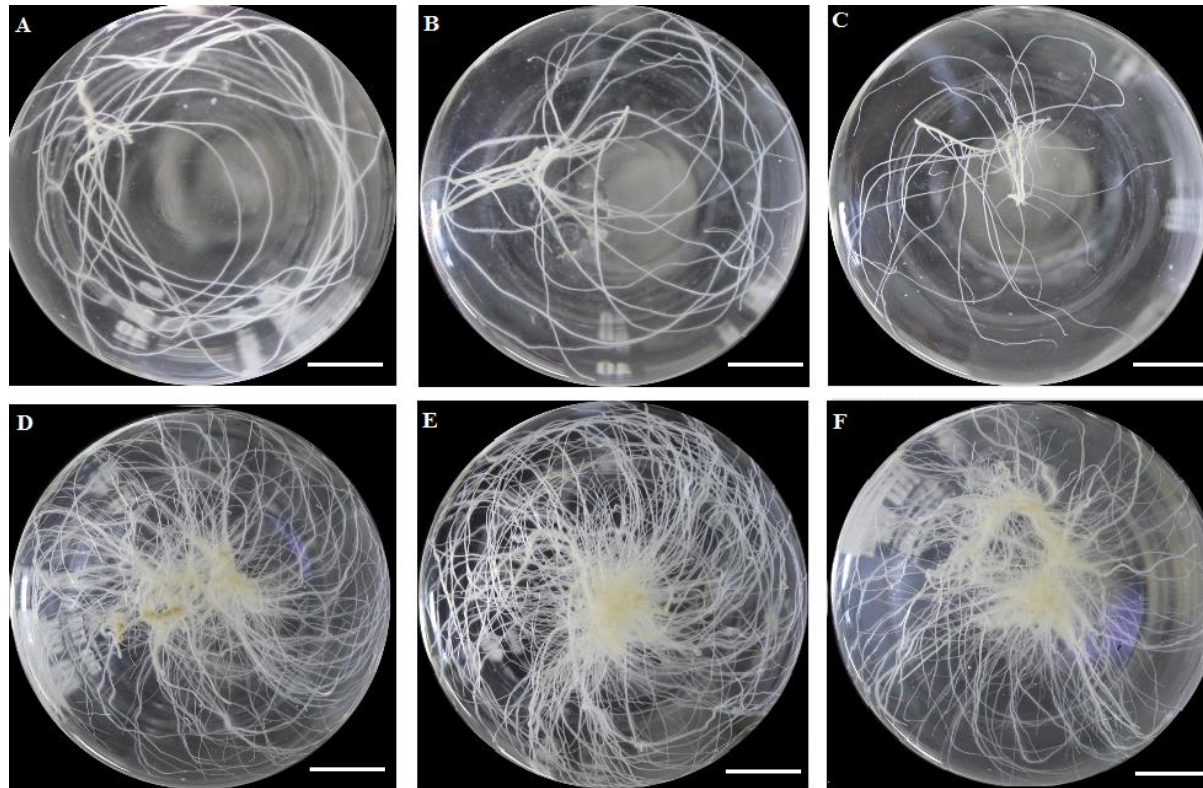
Legenda: (A) Presença de luz; (B) Escuro. Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas significa diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

Figura 9- Culturas de raízes de *Cleome dendroides* iniciadas a partir de explantes com diferentes tamanhos e mantidas na presença de luz, após 45 dias de cultivo.



Legenda: Culturas em meio MS0 iniciadas a partir de explantes com (A) 0,5 cm; (B) 1,0 cm; (C) 1,5 cm e culturas em meio MS + 3 mg.L⁻¹ de AIB iniciadas a partir de explantes com (D) 0,5 cm; (E) 1,0 cm; (F) 1,5 cm. Barras = 1,0 cm

Figura 10- Culturas de raízes de *Cleome dendroides* iniciadas a partir de explantes com diferentes tamanhos e mantidas no escuro, após 45 dias de cultivo.

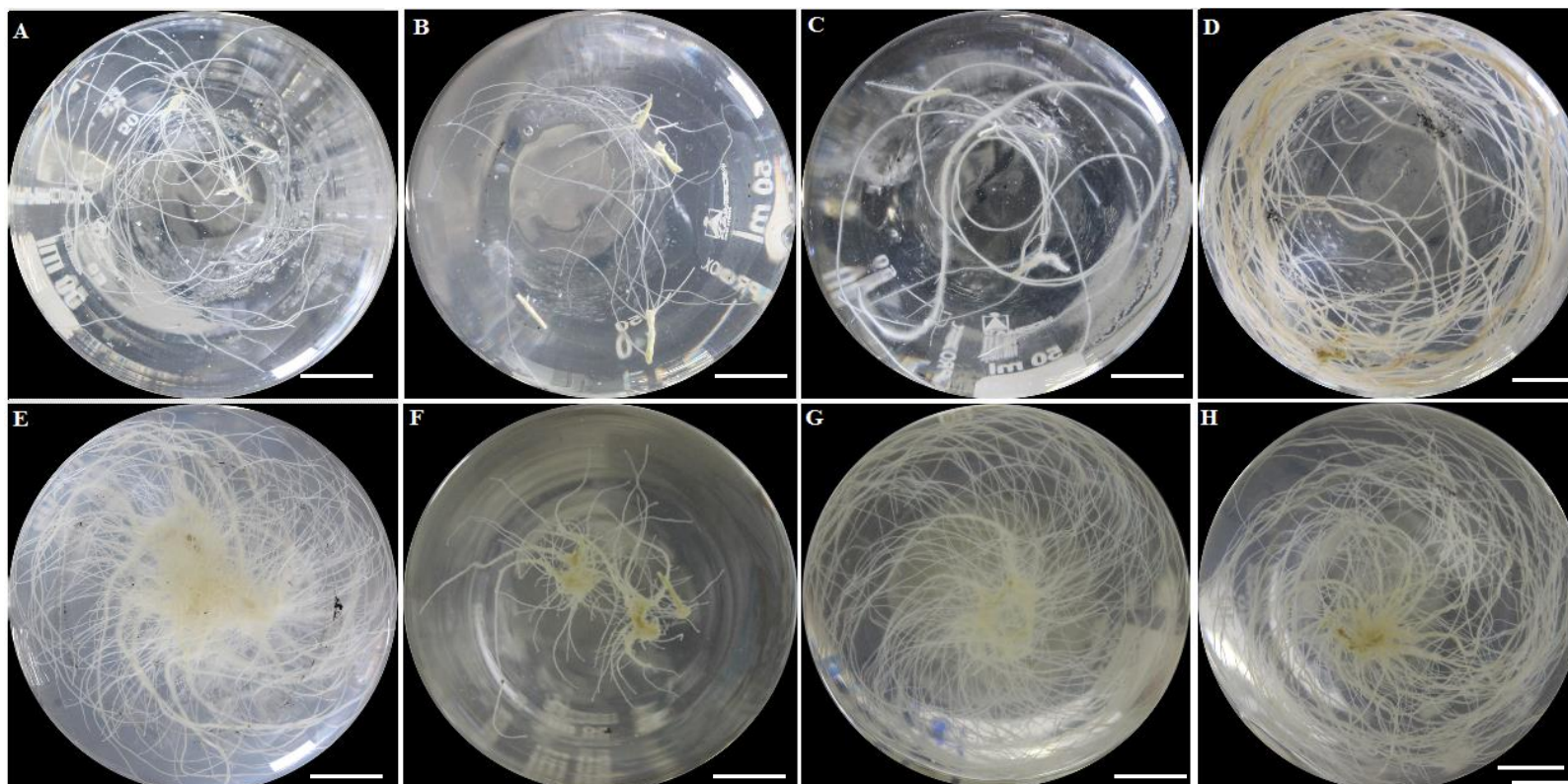


Legenda: Culturas em meio MS0 iniciadas a partir de explantes com (A) 0,5 cm; (B) 1,0 cm; (C) 1,5 cm e culturas em meio MS + 3 mg.L⁻¹ de AIB iniciadas a partir de explantes com (D) 0,5 cm; (E) 1,0 cm; (F) 1,5 cm. Barras = 1,0 cm

Nos experimentos onde foi avaliado o efeito da concentração de sais minerais do meio MS na capacidade de proliferação das raízes, foi verificado que a redução na concentração influenciou positivamente a capacidade de proliferação. Nas culturas mantidas em MS0, a redução a 75% do total de sais (MS1/4) acarretou em um significativo aumento do acúmulo de biomassa (Figura 11 e Gráfico 2A). Para as culturas estabelecidas em meio suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB, embora a diluição da concentração salina tenha acarretado o aumento da multiplicação das raízes, não houve diferença estatística com relação ao meio de cultura de concentração padrão (Figura 11 e Gráfico 2B). Por outro lado, o aumento da concentração de sais acima dos valores padrões (2MS), mostrou-se um fator negativo à indução da multiplicação *in vitro* das raízes de *C. dendroides*.

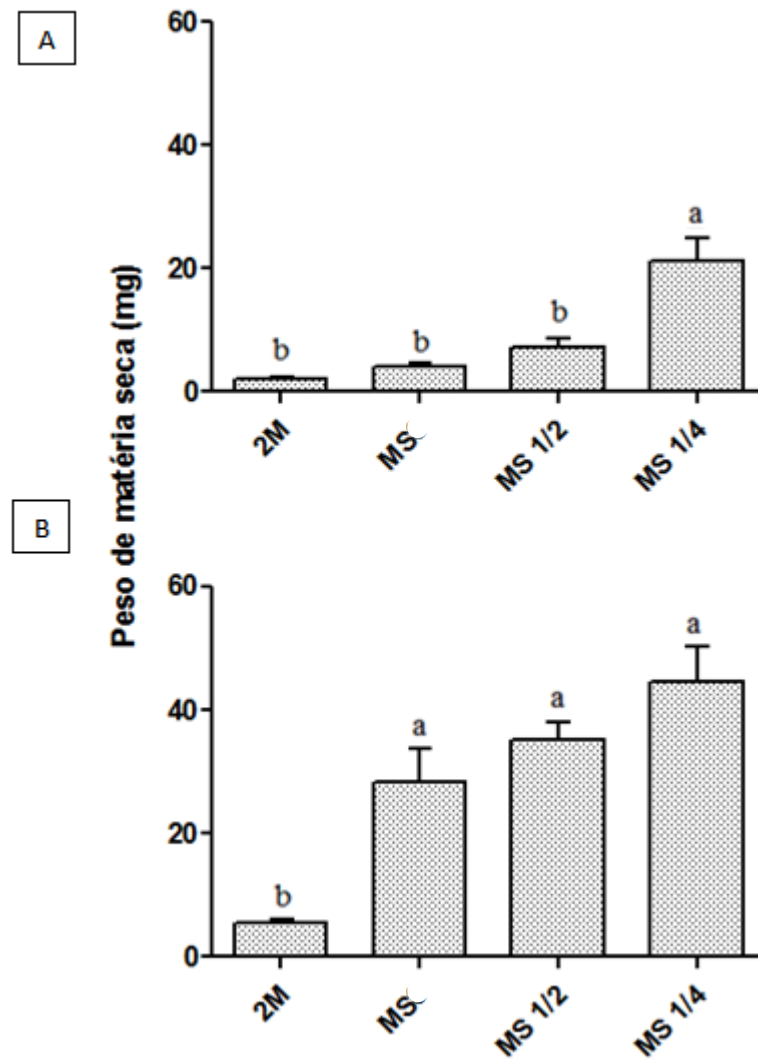
Os resultados mostraram que, apesar da diluição do meio MS ter sido eficiente na indução da proliferação de raízes em meio sem suplementação hormonal, os valores de biomassa alcançados foram inferiores àqueles observados para as culturas mantidas em meio suplementado com AIB. Desta forma, optou-se por dar continuidade aos estudos de avaliação dos demais parâmetros apenas utilizando culturas mantidas em meio MS na presença de AIB.

Figura 11- Culturas de raízes de *Cleome dendroides* estabelecidas em meio MS com diferentes concentrações de sais minerais, após 45 dias de cultivo.



Legenda: Culturas estabelecidas em meio MS sem suplementação hormonal com (A) concentração total de sais (MS); (B) duas vezes a concentração de sais (2MS); (C) redução em 50% na concentração de sais (MS ½); (D) redução em 75% na concentração de sais (MS ¼). Culturas estabelecidas em meio MS suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB com (E) MS; (F) 2MS; (G) MS ½; (H) MS ¼ . Barras = 1 cm.

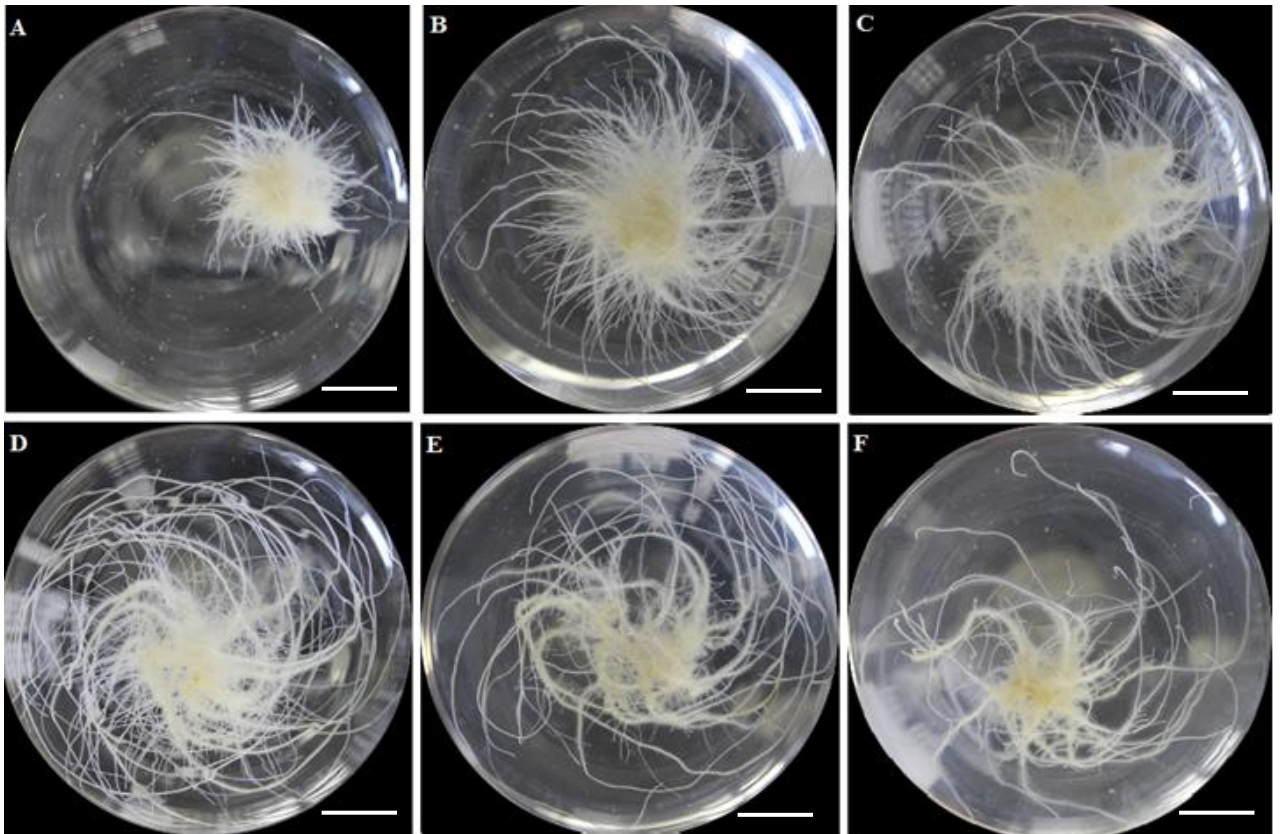
Gráfico 2 - Influência da concentração salina do meio de cultura no acúmulo de biomassa de culturas de raízes *in vitro* de *Cleome dendroides*, após 45 dias de cultivo.



Legenda: (A) Meio sem suplementação hormonal; (B) Meio suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB. Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas significa diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

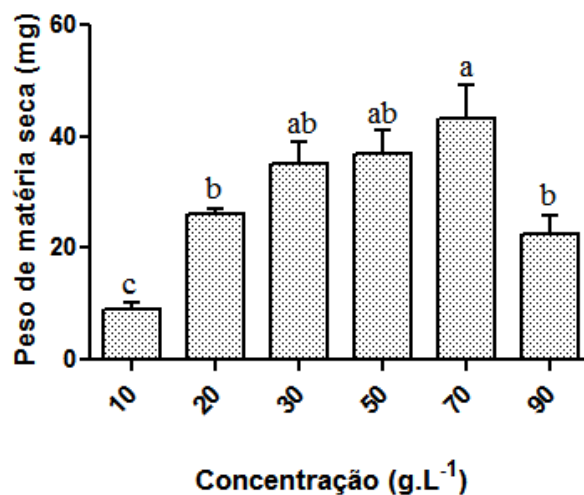
Com relação à concentração de sacarose, os resultados alcançados demonstraram que a suplementação com 10 mg.L^{-1} , concentração abaixo daquelas frequentemente empregadas nos meios de cultura para a cultura *in vitro* de muitas espécies (20 mg.L^{-1} a 30 mg.L^{-1}), acarretou em significativa diminuição da capacidade de proliferação das raízes de *C. dendroides*. Por outro lado, o aumento da concentração até 70 mg.L^{-1} resultou em um progressivo incremento do acúmulo de biomassa, embora sem diferenças estatísticas significativas quando comparado aos valores alcançados por culturas na presença de 30 mg.L^{-1} e de 50 mg.L^{-1} de sacarose. Entretanto, o efeito positivo do aumento da concentração de sacarose no acúmulo de biomassa não se manteve em concentrações mais elevadas, como observado quando o meio de cultura foi suplementado com 90 mg.L^{-1} , resultando em redução significativa da capacidade de proliferação (Figura 12 e Gráfico 3).

Figura 12- Culturas de raízes de *Cleome dendroides* estabelecidas em meio MS com diferentes concentrações de sacarose, após 45 dias de cultivo.



Legenda: Culturas em meio suplementado com 3 mg.L^{-1} de AIB contendo sacarose nas concentrações de (A) 10 mg.L^{-1} ; (B) 20 mg.L^{-1} ; (C) 30 mg.L^{-1} ; (D) 50 mg.L^{-1} ; (E) 70 mg.L^{-1} ; (F) 90 mg.L^{-1} . Barras = 1 cm.

Gráfico 3- Influência da concentração de sacarose no acúmulo de biomassa de culturas de raízes *in vitro* de *Cleome dendroides*, mantidas em meio suplementado com 3 mg.L^{-1} de AIB, após 45 dias de cultivo.



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

Para a avaliação da influência do pH do meio de cultura na capacidade de proliferação das raízes adventícias de *C. dendroides*, inicialmente foram determinados os valores de pH antes e depois do processo de autoclavagem do meio de cultura. Foi observado que a exposição às altas temperaturas e pressão durante o processo de esterilização resultava em redução nos valores de pH em cerca de $0,64 \pm 0,02$ (Tabela 1). Esses resultados mostraram que o valor padrão utilizado para o pH dos meios de cultura empregados nas técnicas de culturas de tecidos vegetais (5,8), atinge, após a autoclavagem, valores em torno de 5,13. Além disso, constatou-se que para se obter, após a autoclavagem, o valor de pH de 5,8 o mesmo deve ser aferido a um valor inicial de 6,5.

Tabela 1- Valores de pH do meio de cultura MS aferidos antes e depois do processo de autoclavagem (121°C por 15 min).

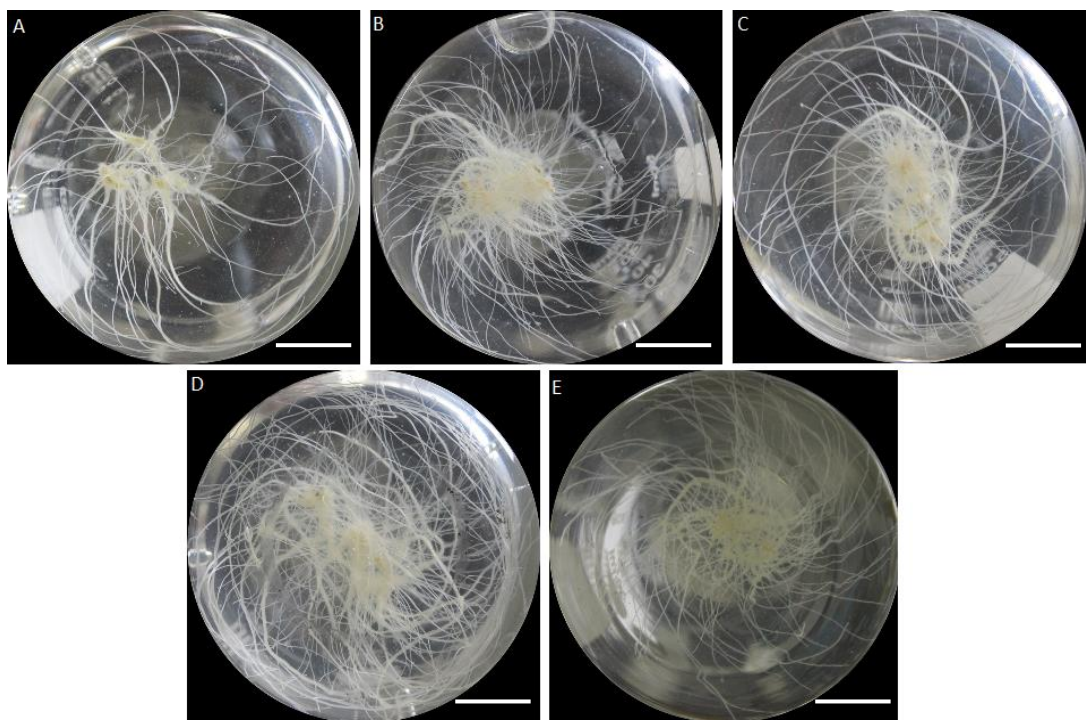
Valores de pH	
Antes da autoclavagem	Depois da autoclavagem*
5,0	4,35
5,8	5,13
6,0	5,41
6,5	5,83
7,2	6,44

Legenda: *Média dos valores

A elevação no pH do meio de cultura antes da autoclavagem até o valor de 6,5 resultou em aumento da capacidade de proliferação das raízes (Figura 13 e Gráfico 4). Culturas estabelecidas em meio de cultura apresentando este valor de pH resultaram em maior acúmulo de biomassa. Apesar de ser observada uma influência positiva do aumento do pH inicial do meio na capacidade de proliferação das raízes, não houve diferença estatística entre os valores testados, à exceção das culturas mantidas em meio estabelecidos no valor de pH inicial mais ácido (5,0). Culturas iniciadas nesta condição apresentaram intumescimento dos

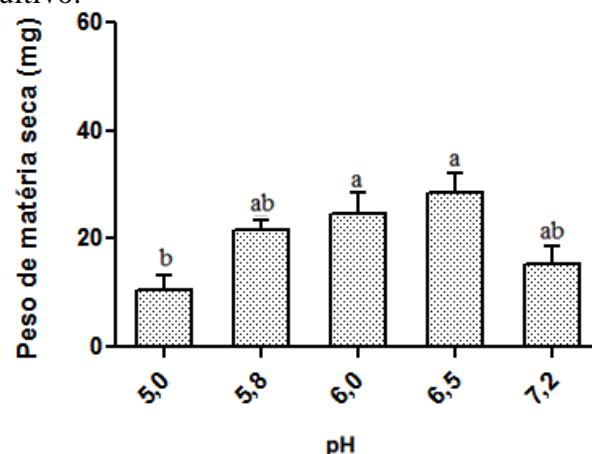
explantes e, em alguns casos, a proliferação de pequenos calos durante a primeira semana em cultivo. Estas culturas também apresentaram um atraso no início da resposta proliferativa das raízes, quando comparadas às demais culturas, sendo a formação de raízes laterais iniciada apenas após a segunda semana em cultivo.

Figura 13- Culturas de raízes de *Cleome dendroides* estabelecidas em meio de cultura MS apresentando diferentes valores de pH, após 45 dias de cultivo.



Legenda: Culturas em meio suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB apresentando os valores iniciais de pH de (A) 5,0; (B) 5,8; (C) 6,0; (D) 6,5; (E) 7,2. Barras = 1 cm.

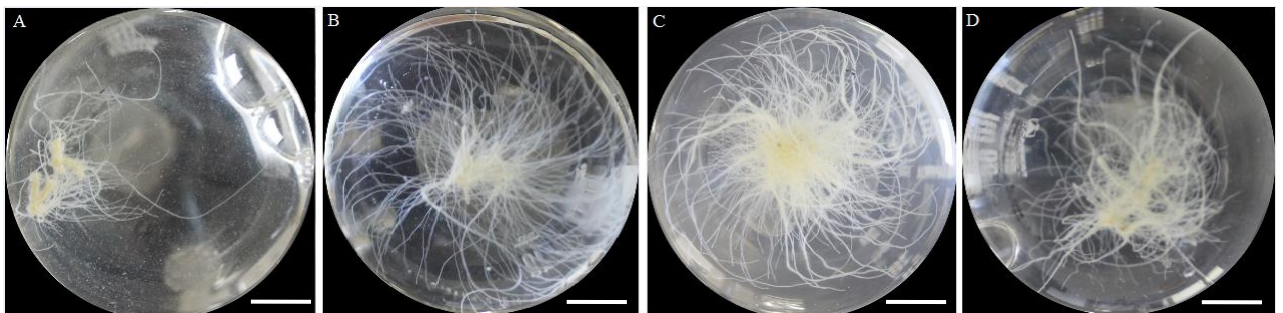
Gráfico 4- Influência do valor do pH do meio de cultura no acúmulo de biomassa de culturas de raízes *in vitro* de *Cleome dendroides*, mantidas em meio suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB, após 45 dias de cultivo.



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

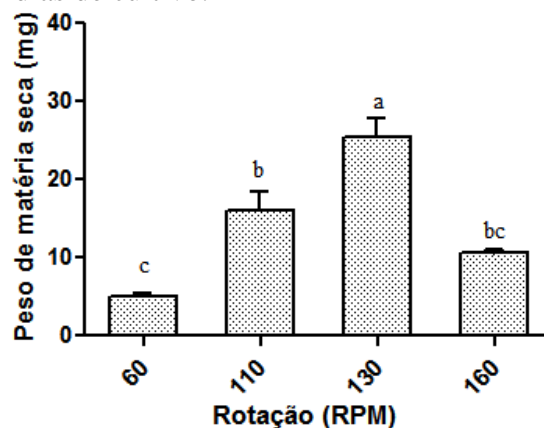
Os resultados referentes à avaliação do efeito da velocidade de agitação empregada às mesas orbitais mostraram que a manutenção das culturas de raízes de *C. dendroides* na condição de 130 rpm acarretou em uma maior capacidade de proliferação (Figura 14 e Gráfico 5). Essa velocidade é superior àquela tradicionalmente empregada para as culturas *in vitro* (100 rpm). Entretanto, o aumento da velocidade de agitação a um valor de 160 rpm resultou em redução significativa do acúmulo de biomassa. De forma semelhante, o emprego de uma velocidade de agitação mais baixa (60 rpm) também não se mostrou favorável ao processo de proliferação das culturas de raízes. Tanto a 60 rpm como a 160 rpm, foi observado intumescimento em alguns explantes com formação de pequenos calos dos quais se desenvolviam raízes finais de coloração branca.

Figura 14- Culturas de raízes de *Cleome dendroides* estabelecidas em meio de cultura MS e mantidas em mesa agitadora sob diferentes velocidades de rotação, após 45 dias de cultivo.



Legenda: Culturas estabelecidas em meio MS suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB com rotação: A- 60; B-110; C-130; D-160 rpm. Barra= 1cm.

Gráfico 5- Influência da velocidade de agitação das mesas orbitais no acúmulo de biomassa de culturas de raízes *in vitro* de *Cleome dendroides*, mantidas em meio suplementado com 3 mg.L⁻¹ de AIB, após 45 dias de cultivo.

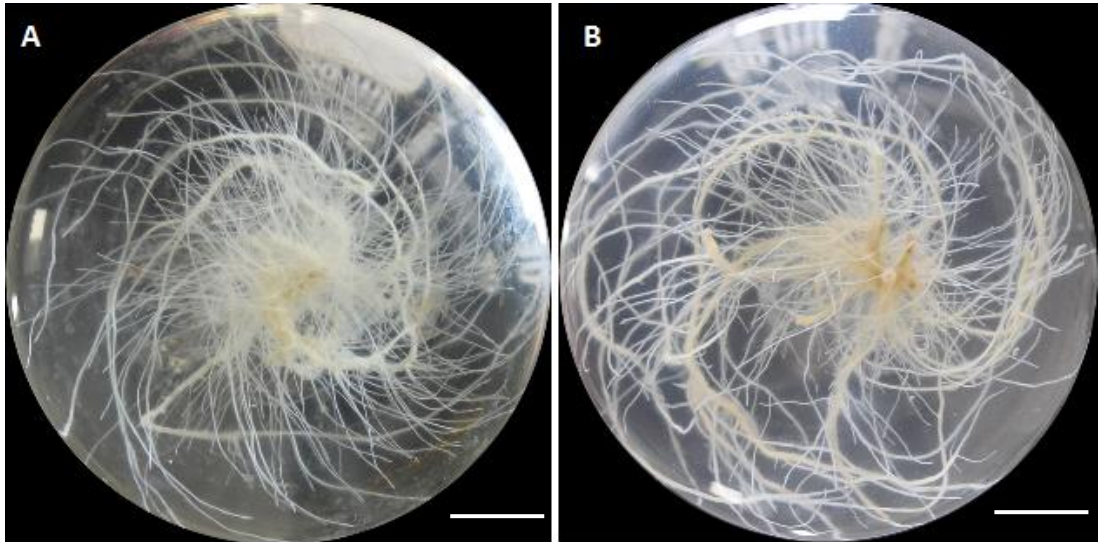


Legenda: Médias \pm desvio padrão com letras diferentes nas colunas significa diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste de Tukey.

Em função dos resultados alcançados visando à produção *in vitro* de raízes de *C. dendroides*, foi realizada uma nova avaliação na qual as melhores condições para a multiplicação das raízes determinadas nos experimentos anteriores foram reunidas em uma única condição de cultura, denominada MC (Melhores condições). A saber: MS¼ suplementado com 3 mg.L⁻¹ AIB, 70 g.L⁻¹ de sacarose, em pH 6,5, rotação 130 rpm e manutenção sob fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro. O início do crescimento das raízes mantidas na condição MC foi observado a partir da primeira semana em cultivo, com o desenvolvimento de finas raízes laterais. Porém, quando comparadas às culturas mantidas na condição considerada como controle (MS + 3 mg.L⁻¹ AIB, 30 g.L⁻¹ de sacarose, em pH 5,8, rotação 110 rpm e manutenção sob fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro), as raízes multiplicadas em MC apresentavam uma coloração ligeiramente mais escurecida (Figura 15). A eficiência da combinação das diferentes condições de cultura anteriormente avaliadas para a multiplicação das raízes foi constatada pelos valores de acúmulo de biomassa alcançados pelas culturas em MC quando comparado à condição controle. Após 45 dias em cultivo foi observado para as culturas em MC um acúmulo de biomassa significativamente maior (Figura 15 e Gráfico 6).

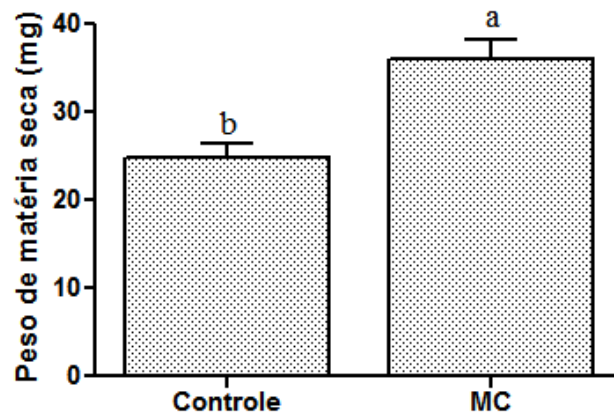
Quando as raízes foram subcultivadas para avaliação da capacidade de crescimento ao longo do tempo, foi possível observar que aquelas mantidas em MC apresentaram uma maior capacidade de multiplicação quando comparado ao período inicial de 45 dias em cultivo. Por outro lado, as culturas em condição controle apresentaram redução na capacidade de crescimento (Figura 16 e Gráfico 7).

Figura 15 - Culturas de raízes de *Cleome dendroides* mantidas em condições controle (A) e na associação das melhores condições de cultivo (B), após 45 dias.



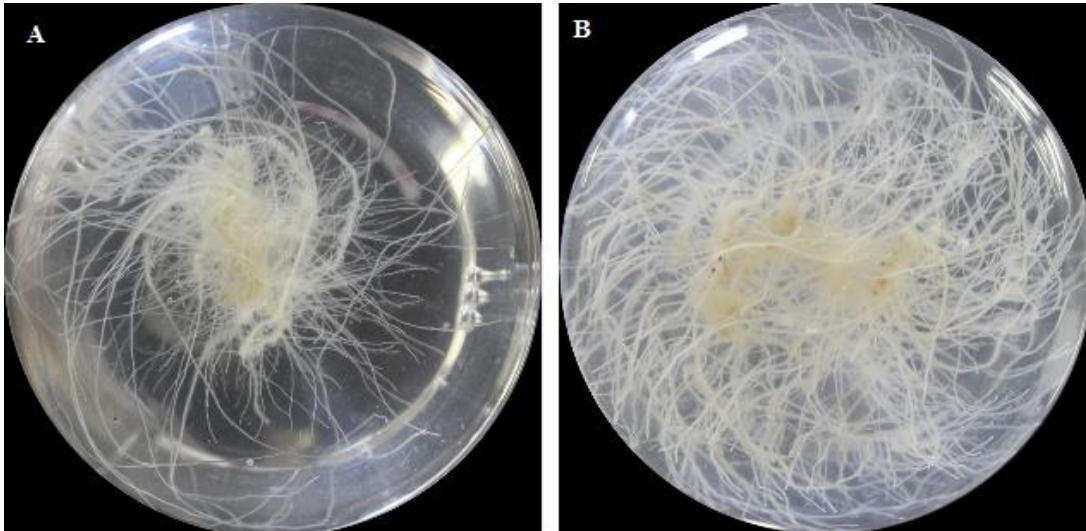
Legenda: (A) MS + 3 mg.L⁻¹ AIB, 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH 5,8, rotação 110rpm; (B) MS^{1/4} + 3 mg.L⁻¹ AIB, 70 g.L⁻¹ de sacarose, pH 6,5, rotação 130rpm. Barra= 1cm.

Gráfico 6 - Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de *Cleome dendroides*, mantidas em condições controle e na associação das melhores condições de cultivo (MC), após 45 dias.



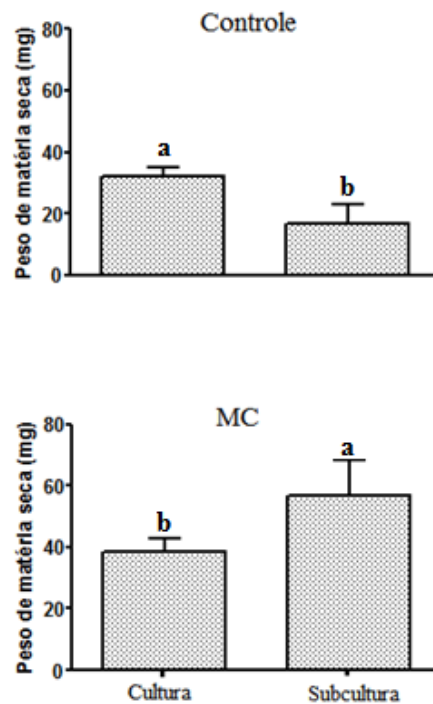
Legenda: Controle: MS + 3 mg.L⁻¹ AIB, 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH 5,8, rotação 110rpm; MC: MS^{1/4} + 3 mg.L⁻¹ AIB, 70 g.L⁻¹ de sacarose, pH 6,5, rotação 130rpm. Médias ± desvio padrão com letras diferentes nas colunas significa diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste t.

Figura 16 – Subcultura de raízes de *Cleome dendroides* mantidas em condições controle (A) e na associação das melhores condições de cultivo (B), após 45 dias.



Legenda: (A) MS + 3 mg.L⁻¹ AIB, 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH 5,8, rotação 110rpm; (B) MC: MS^{1/4} + 3 mg.L⁻¹ AIB, 70 g.L⁻¹ de sacarose, pH 6,5, rotação 130rpm. Barra= 1cm.

Gráfico 7- Acúmulo de biomassa em culturas de raízes de *Cleome dendroides*, mantidas em condições controle e na associação das melhores condições de cultivo (MC), com subcultivo após 45 dias.



Médias ± desvio padrão com letras diferentes nas colunas significa diferença estatística ($p \leq 0,05$), determinada pelo teste t.

4.2 Avaliação do rendimento dos extratos e análises cromatográficas

Os dados relativos aos rendimentos (Tabela 2) obtidos com o extrato etanólico bruto de folhas de campo, raiz de campo, parte aérea e raiz *in vitro* e cultura de raízes mostraram que a maceração dinâmica resultou em um maior rendimento quando comparada ao método de extração por maceração acelerada por ultrassom.

Com relação ao rendimento das partições, calculado com base no resíduo de extrato bruto, pode-se observar maiores porcentagens na partição de hexano (37,24%) e resíduo aquoso (36,55%) na metodologia de extração por maceração dinâmica e maior porcentagem na partição de acetato de etila (44,90%) na metodologia de extração por maceração acelerada por ultrassom.

As análises cromatográficas foram realizadas com os extratos obtidos a partir das duas metodologias de extração. Os resultados são referentes ao extrato etanólico bruto de folhas coletadas a campo e suas partições (hexano, diclorometano, acetato de etila e resíduo aquoso), raízes coletadas a campo, parte aérea e raízes de plantas propagadas *in vitro* e culturas de raízes.

Tabela 2 – Rendimento dos extratos brutos e partições obtidos a partir de material coletado a campo e material produzido *in vitro* de *Cleome dendroides*.

Material vegetal	Métodos de extração	Fração	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Resíduo (g)	Rendimento (%)
Folha	Maceração dinâmica	Bruto	53,80	9,41	1,45	15,40
		Hexano	-	-	0,54	37,24*
		Diclorometano	-	-	0,11	7,59*
		Acetato de etila	-	-	0,15	10,34*
		Resíduo aquoso	-	-	0,53	36,55*
	Maceração no ultrassom	Bruto	64,88	10,01	0,98	9,79
		Hexano	-	-	0,22	22,45*
		Diclorometano	-	-	0,12	12,24*
		Acetato de etila	-	-	0,44	44,90*
		Resíduo aquoso	-	-	0,19	19,40*
Raiz	Maceração dinâmica	Bruto	57,07	10,43	1,86	17,83
	Maceração no ultrassom	Bruto	55,07	10,60	1,54	14,53
Parte aérea <i>in vitro</i>	Maceração dinâmica	Bruto	51,84	10,23	1,74	17,01
	Maceração no ultrassom	Bruto	50,90	10,32	1,56	15,12
Raiz <i>in vitro</i>	Maceração dinâmica	Bruto	27,89	4,94	0,73	14,78
	Maceração no ultrassom	Bruto	28,22	5,11	0,86	16,83
Cultura de raízes (Controle)	Maceração dinâmica	Bruto	2,3749	0,2084	0,0677	32,48
	Maceração no ultrassom	Bruto	5,5992	0,3392	0,0078	2,30
Cultura de raízes (MC)	Maceração dinâmica	Bruto	2,3317	0,3183	0,1472	46,24
	Maceração no ultrassom	Bruto	4,1304	0,4177	0,0078	2,00

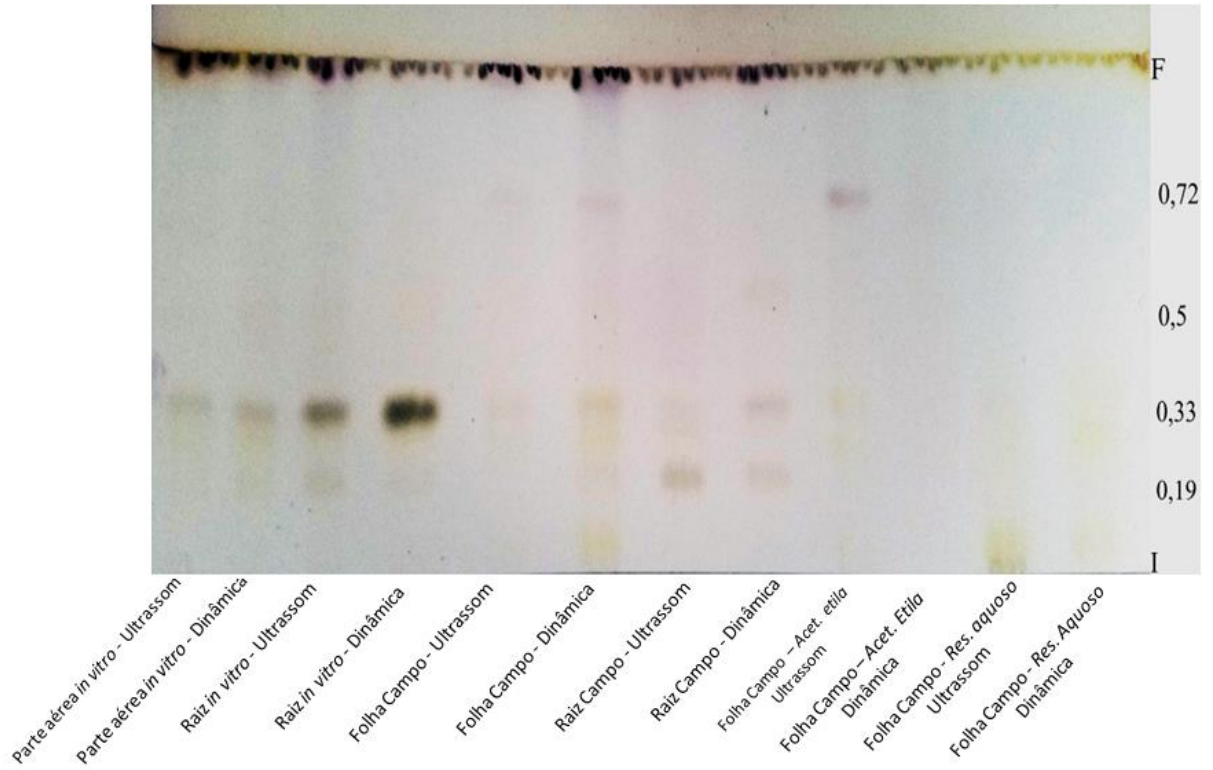
*Rendimento calculado com base no resíduo de extrato bruto.

4.2.1 Análises por cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por CCD sugeriram a presença de saponinas e flavonoides nos extratos de *C. dendroides*.

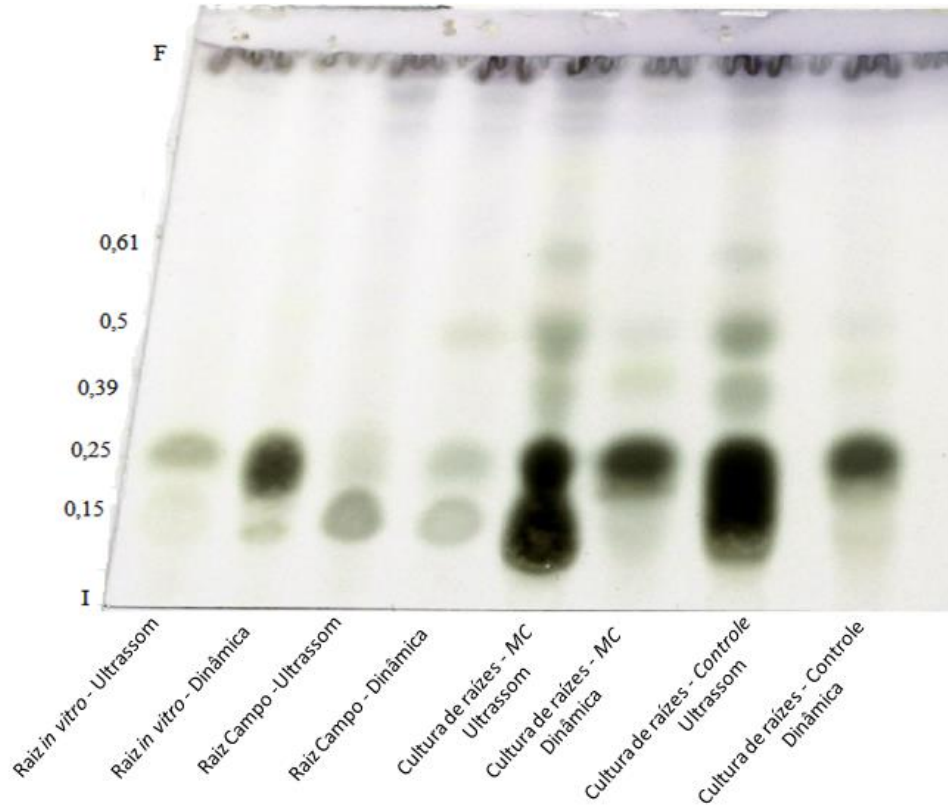
Considerando as análises realizadas para a detecção de saponinas por CCD, foi possível verificar a presença de substâncias dessa classe química na maior parte dos materiais avaliados, com destaque para os extratos de raízes (Figuras 17 e 18). A presença de saponinas foi constatada pela visualização de bandas na cor castanho escuro sob luz visível com Rf 0,72; 0,33 e 0,19. Essas bandas foram observadas em folhas e raízes de plantas de campo, partes aéreas e raízes de plantas *in vitro* e em culturas de raízes, a partir de extratos preparados pelas duas metodologias de extração. E também na partição em acetato de etila de extratos de folhas de plantas de campo, obtidos pela extração por maceração acelerada por ultrassom. Considerando o número de bandas obtidas, assim como sua intensidade, foi possível verificar uma maior presença de saponinas em extratos de culturas de raízes, sendo mais eficiente a extração por maceração acelerada por ultrassom (Figura 18). Saponinas foram detectadas por bandas com Rf 0,15; 0,25; 0,39; 0,5; 0,61, com destaque para bandas com Rf 0,25 que foram verificadas nas amostras de extratos de raízes, independente da sua origem e do tipo de extração.

Figura 17 – Cromatografia em camada delgada de extratos de material coletado a campo e material produzido *in vitro* de *Cleome dendroides* para análise de saponinas.



Legenda: Eluente: Clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60:32:12:8 v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico.

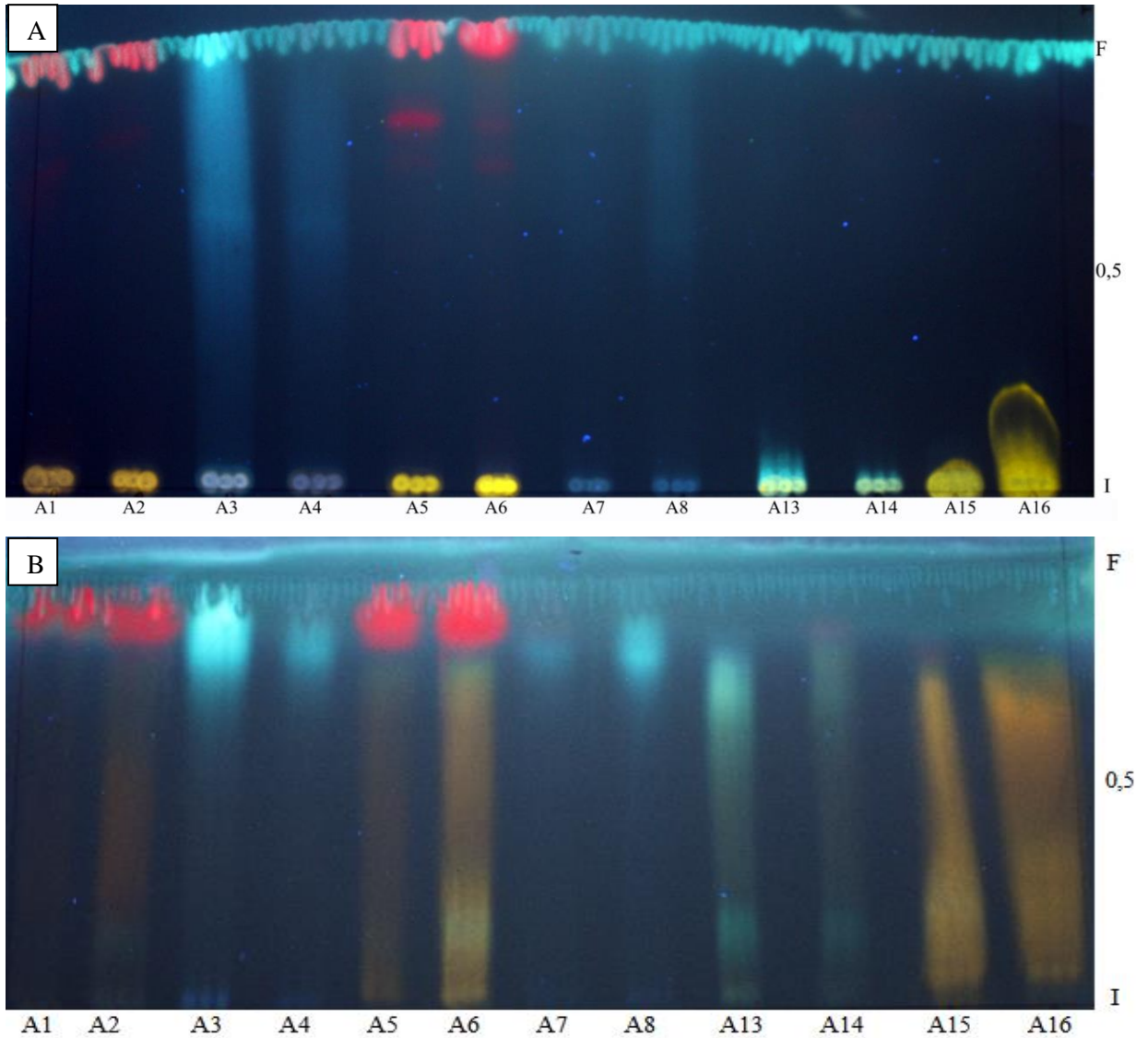
Figura 18 – Cromatografia em camada delgada de extratos etanólico bruto de raízes coletadas a campo e material produzido *in vitro* de *Cleome dendroides* para análise de saponinas.



Legenda: Eluente: Clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60:32:12:8 v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico. I – linha de base; F – frente do solvente.

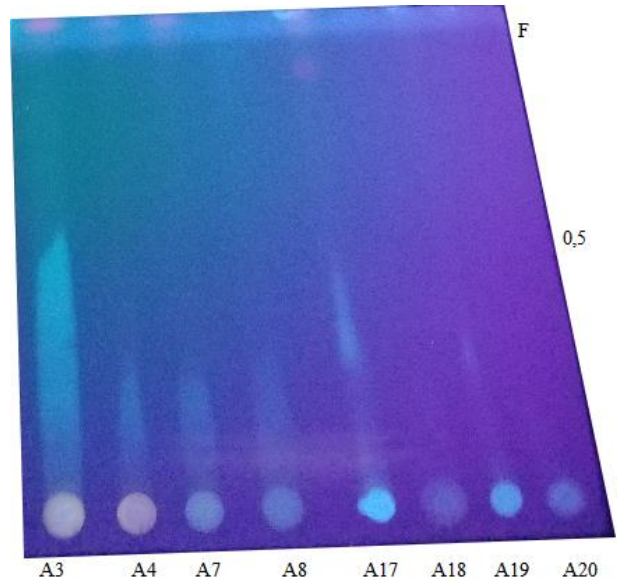
As metodologias empregadas para a detecção de flavonoides em CCD, não resultaram no aparecimento de bandas ao longo das placas cromatográficas. Entretanto, foram visualizados rastros de coloração amarelada e fluorescência desta coloração nas regiões de aplicação das amostras (Figura 19), quando utilizadas diferentes proporções dos eluentes. Esses resultados foram observados nos extratos de parte aérea *in vitro*, de folha de campo e de suas partições em acetato de etila e resíduo aquoso. Entretanto, para os extratos de raízes, a técnica de CCD não permitiu a visualização de bandas de coloração amarelada (Figura 20). A ocorrência de fluorescência de coloração amarelada, que sugere a presença de flavonoides, serviu como indicativo da ocorrência de substâncias dessa classe química nos extratos de *C. dendroides*.

Figura 19- Cromatografia em camada delgada de extratos de material coletado a campo e material produzido *in vitro* de *Cleome dendroides* para análise de flavonoides.



Legenda: Placa cromatográfica irradiada a 365 nm. Eluente: (A) 50:50 v/v diclorometano:acetato de etila. (B) 50:50 v/v acetato de etila:metanol Revelador: NP/PEG. Extrato etanólico bruto de parte aérea *in vitro*: A1- extração por maceração acelerada por ultrassom A2- extração por maceração dinâmica; Extrato etanólico bruto de raiz *in vitro*: A3- Extração por maceração acelerada por ultrassom A4- Extração por maceração dinâmica; Extrato etanólico bruto de folha de campo: A5- Extração por maceração acelerada por ultrassom A6- Extração por maceração dinâmica; Extrato etanólico bruto de raiz de campo: A7- Extração por maceração acelerada por ultrassom A8- Extração por maceração dinâmica; Extrato de folha de campo na partição de acetato de etila: A13- Extração por maceração acelerada por ultrassom A14- Extração por maceração dinâmica; Extrato de folha de campo no resíduo aquoso: A15- Extração por maceração acelerada por ultrassom A16- Extração por maceração dinâmica. I – linha de base; F – frente do solvente.

Figura 20 – Cromatografia em camada delgada de extratos de raízes coletadas a campo e produzidas *in vitro* de *Cleome dendroides* para análise de flavonoides.



Legenda: Eluente: 50:50 v/v diclorometano:acetato de etila. Revelador: NP/PEG. Extrato etanólico bruto de raiz *in vitro*: A3- Extração por maceração acelerada por ultrassom A4- Extração por maceração dinâmica; Extrato etanólico bruto de raiz de campo: A7- Extração por maceração acelerada por ultrassom A8- Extração por maceração dinâmica; Extrato etanólico bruto de culturas MC: A17- Extração por maceração acelerada por ultrassom A18- Extração por maceração dinâmica Extrato etanólico bruto de culturas controle: A19- Extração por maceração acelerada por ultrassom A20- Extração por maceração dinâmica. I – linha de base; F – frente do solvente

Nas análises de CCD para a detecção de terpenos, não foram visualizadas bandas que indicassem a presença de substâncias dessa classe de metabólitos em todos os extratos avaliados.

4.2.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV)

Considerando as análises realizadas por CLAE-DAD-UV, no presente estudo, os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda de 254 nm e 340 nm.

Para os extratos etanólicos brutos de folha de campo foram observados cerca de 20 sinais com tempos de retenção de 15 min a 33 min, tanto em 254 nm (Figura 21), como em

340 nm (Figura 22), o que sugere que as substâncias do extrato tenham polaridade média. As duas metodologias de extração utilizadas resultaram em perfis cromatográficos semelhantes. Porém, a sobreposição dos cromatogramas gerados em 340 nm (Figura 23) mostrou que os extratos obtidos pela metodologia de extração dinâmica apresentaram sinais com maior intensidade. Desses sinais, quatro se destacaram quanto aos percentuais de área relativa (Apêndice 1A). A maioria dos sinais gerados pelo cromatograma em 340 nm (Figura 22) apresentam espectros de absorção sugestivos de substâncias da classe dos flavonoides (Tabela 3).

A partir do extrato bruto de folhas de plantas de campo foi realizado o particionamento e as partições resultantes (hexano, diclorometano, acetato de etila e o resíduo aquoso) também foram avaliadas por CLAE-DAD-UV.

Os cromatogramas gerados com a partição em hexano mostraram poucos sinais e de baixa intensidade em tempos de retenção na faixa de 38 a 56 min (Figuras 24, 25 e Apêndice 1B), caracterizando a presença de substâncias de baixa polaridade, independentemente do método de extração empregado. Pela sobreposição dos cromatogramas foi possível verificar a semelhança dos perfis cromatográficos para os materiais obtidos a partir das diferentes metodologias de extração (Figura 26).

A partição em diclorometano apresentou substâncias de média e baixa polaridade, uma vez que os cromatogramas mostraram sinais com tempos de retenção na faixa de 17,5 a 57,5 min (Figuras 27, 28 e Apêndice 1C). A metodologia de maceração dinâmica resultou em um maior número e intensidade de sinais. Por esta metodologia o cromatograma gerado a 254 nm (Figura 27A) apresentou o dobro de sinais quando comparado àquele obtido pelo material extraído empregando a metodologia de aceleração por ultrassom (Figura 27B). A maior eficiência da extração dinâmica foi constatada quando utilizado o comprimento de onda de 340 nm (Figura 28) e também pela sobreposição dos cromatogramas em 254 nm (Figura 29).

Quando avaliada a partição em acetato de etila, cromatogramas em 254 nm mostraram sinais com tempos de retenção entre 18 min - 40 min (Figura 30), enquanto em 340 nm os sinais foram detectados entre 30 min - 40 min, o que sugere a presença de substâncias de média polaridade nessa partição. Para o material obtido a partir da extração acelerada por

ultrassom foram detectados 8 sinais em 254 nm (Figura 30B) e 15 sinais em 340nm (Figura 31B). Enquanto que por extração por maceração dinâmica foram detectados 8 sinais nos dois comprimentos de onda selecionados (Figuras 30A e 31A). A sobreposição dos cromatogramas mostrou semelhança dos perfis (Figura 32), embora a extração acelerada por ultrassom tenha se mostrado mais eficiente tanto com relação ao número de sinais obtidos, como para a intensidade dos mesmos. Os espectros de absorção no UV_{340nm} das substâncias representadas pelos sinais que apresentaram as maiores porcentagens de área relativa (Apêndice 1D) foram sugestivos de flavonoides (Tabela 3).

Nos cromatogramas gerados com o resíduo aquoso, foram observados sinais com tempos de retenção na faixa de 5 min - 32 min (Figura 33, 34 e Apêndice 1E), o que indica que as substâncias presentes na amostra se caracterizam por apresentarem de alta a média polaridade. Quando empregada a extração por maceração dinâmica foram detectados 29 sinais em 254 nm (Figura 33A), enquanto que pela extração acelerada por ultrassom foram obtidos 17 sinais (Figura 33B). Já para o comprimento de onda de 340 nm foram observados 26 e 22 sinais, respectivamente (Figura 34A e 34B). A maior parte desses sinais apresentaram espectros de absorção sugestivos de flavonoides (Tabela 3). Pela sobreposição dos cromatogramas (Figura 35) foi possível verificar perfis semelhantes, independentemente da metodologia de extração, embora o processo por maceração dinâmica tenha sido mais eficiente, o que pode ser verificado pela maior intensidade dos sinais nos cromatogramas dessas amostras.

Considerando plantas coletadas a campo, além do extrato bruto de folhas e suas partições, também foram avaliados extratos brutos obtidos a partir de raízes. A avaliação dos extratos de raízes por CLAE-DAD-UV evidenciou sinais com baixa intensidade para os dois comprimentos de onda selecionados (Figura 36 e 37) e independentemente da metodologia de extração utilizada. A exceção de um sinal majoritário no tempo de retenção de 28,1 min observado no cromatograma a 254 nm gerado a partir do material submetido à extração dinâmica e que representou 73,55% da área relativa (Apêndice 1F). Esse sinal apresentou uma intensidade ainda maior quando selecionado o comprimento de onda de 275 nm (Figura 38). Embora em 340 nm os sinais obtidos tenham sido detectados a baixa intensidade, os espectros

de absorção de algumas das substâncias foram sugestivos de flavonoides (Tabela 4). A sobreposição dos cromatogramas mostrou uma maior eficiência de extração quando empregada a maceração dinâmica (Figura 39).

Com relação aos materiais produzidos *in vitro*, para os extratos etanólicos brutos obtidos a partir de partes aéreas de plantas propagadas *in vitro*, os cromatogramas gerados em 254 nm mostraram maior intensidade dos sinais para materiais extraídos por maceração dinâmica (Figura 40A). Entretanto a extração acelerada por ultrassom se mostrou mais adequada para a obtenção de um maior número de substâncias, o que pode ser observado pelo maior número de sinais detectados (Figura 40B). A partir dos cromatogramas em 340 nm foi observada uma faixa de 22 sinais, independentemente da metodologia de extração utilizada (Figura 41). A sobreposição dos cromatogramas em 254 nm mostrou um perfil semelhante dos extratos testados, com maior eficiência na extração por maceração dinâmica, evidenciada pela intensidade dos sinais (Figura 42). A partir dos sinais que apresentaram uma maior porcentagem de área relativa (Apêndice 2A), foram selecionados os espectros de absorção que apresentaram perfil sugestivo de flavonoides (Tabela 4).

Para os extratos etanólicos brutos de raiz de planta *in vitro*, a metodologia de extração mais adequada foi à maceração dinâmica. A partir dos extratos obtidos por esse processo, foi verificado nos cromatogramas gerados tanto em 254 nm (Figura 43A) como em 340 nm (Figura 44A) a ocorrência de uma faixa de 20 sinais com tempos de retenção no intervalo de 20 min - 80 min (Apêndice 2B), o que confere uma característica de media a baixa polaridade para as substâncias presentes. Por outro lado, a extração com o ultrassom, não se mostrou adequada uma vez que não foram observados sinais cromatográficos (Figura 43B e Figura 44B).

Com relação às culturas de raízes, foram gerados cromatogramas com sinais de baixa intensidade, tanto para as culturas mantidas na condição controle quanto para aquelas estabelecidas na condição MC. Entretanto, pela metodologia de extração acelerada por ultrassom foi observado maior número de sinais no comprimento de onda de 254 nm (Figuras 45 e 47). As análises realizadas não permitiram a observação de substâncias da classe dos flavonoides a partir da metodologia empregada, o que pode ser constatado pelas avaliações

realizadas em 340 nm (Figuras 46 e 48) e pelos espectros de UV dos sinais com maiores percentuais de área relativa (Tabela 4). Vale destacar a presença nos extratos dessas culturas de um sinal com tempo de retenção de 76 min nos cromatogramas a 254 nm, que não foi observado em extratos de raízes de campo e de planta *in vitro*. Em função do tempo de retenção, esse sinal demonstra uma característica apolar da substância presente. Independentemente do tipo de extração, esse sinal apresentou valores de área relativa superior, quando comparado aos demais sinais das amostras. Com o objetivo de verificar se o sinal não seria referente ao regulador de crescimento AIB, que é adicionado ao meio de cultura de raízes, foi realizada a injeção da substância empregando a mesma metodologia de avaliação dos extratos. O cromatograma gerado apresentou sinal em 30 min, o que descartou a possibilidade da substância presente nos extratos de raízes multiplicadas *in vitro* ser o AIB (Figura 49).

Figura 21- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} de extrato etanólico bruto de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

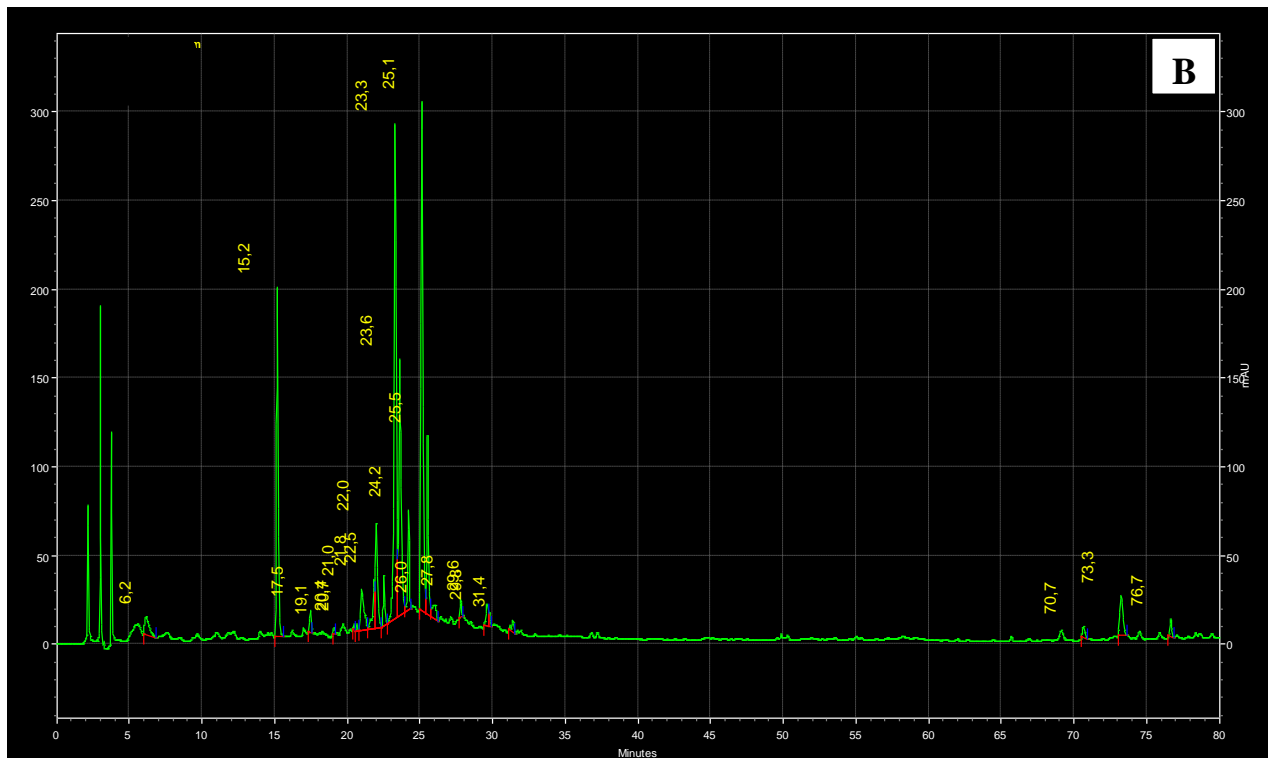
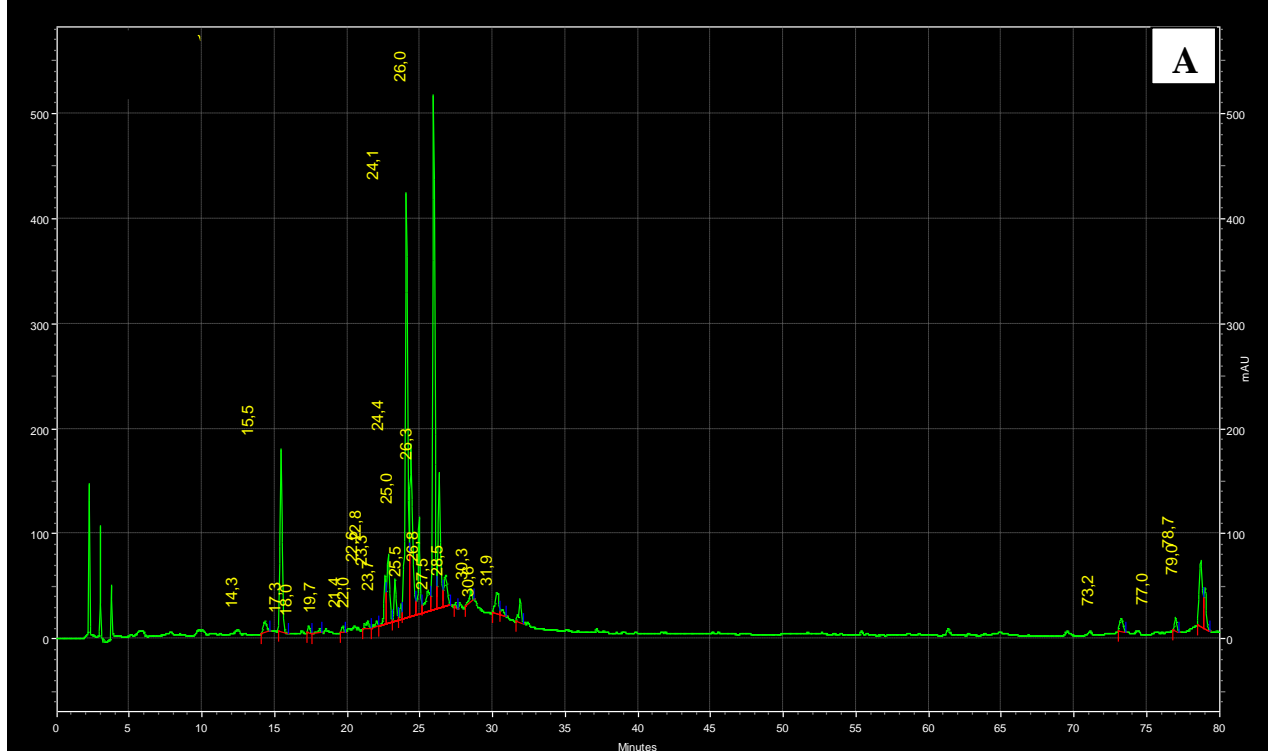


Figura 22- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} de extrato etanólico bruto de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

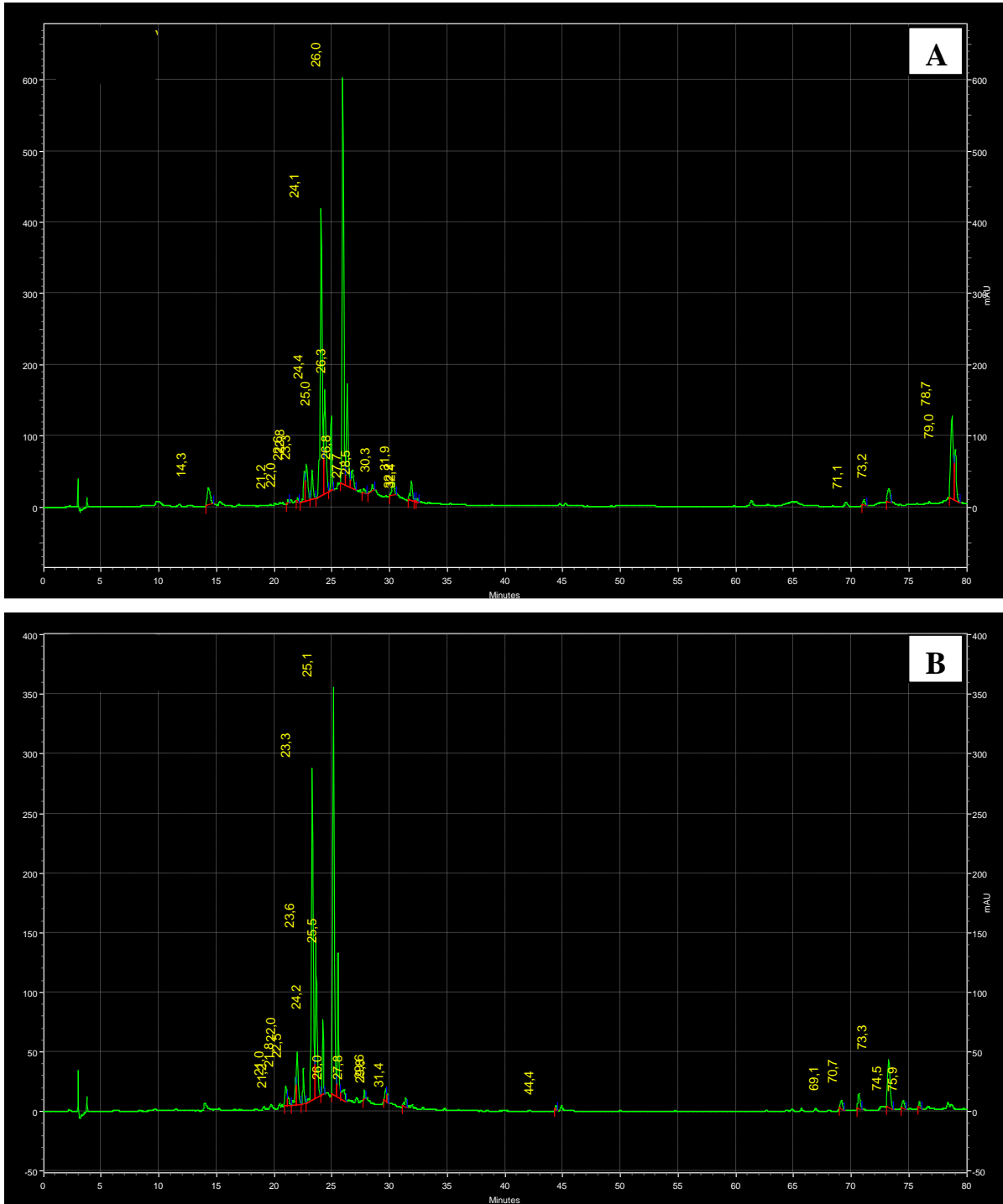
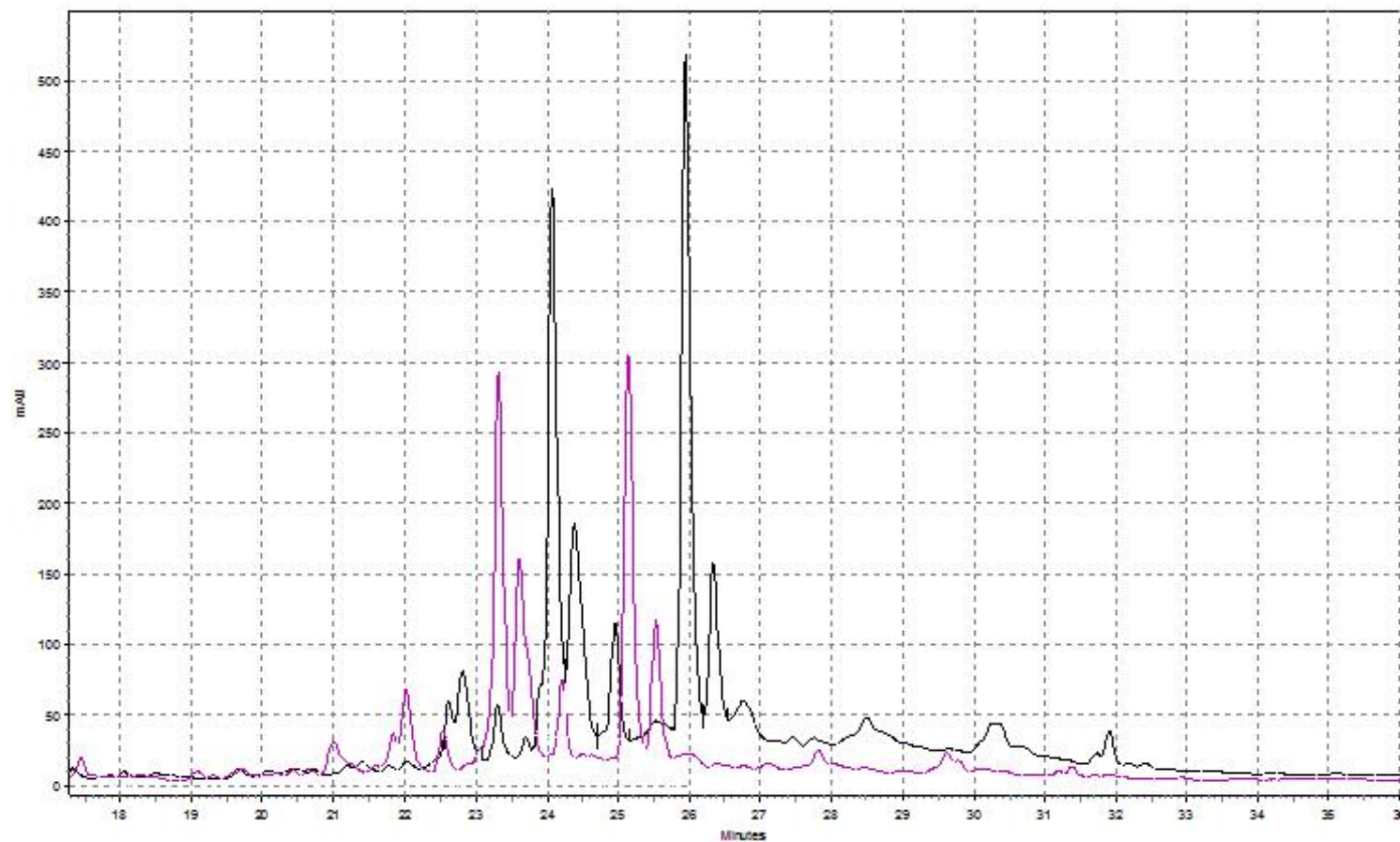


Figura 23- Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} do extrato etanólico bruto de folhas coletadas a campo de *C. dendroides*.



Legenda - Corrida cromatográfica de 18 a 36 min.

- Extração por maceração dinâmica
- Extração acelerada por maceração no ultrassom

Figura 24- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} da partição em hexano de extrato etanólico de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

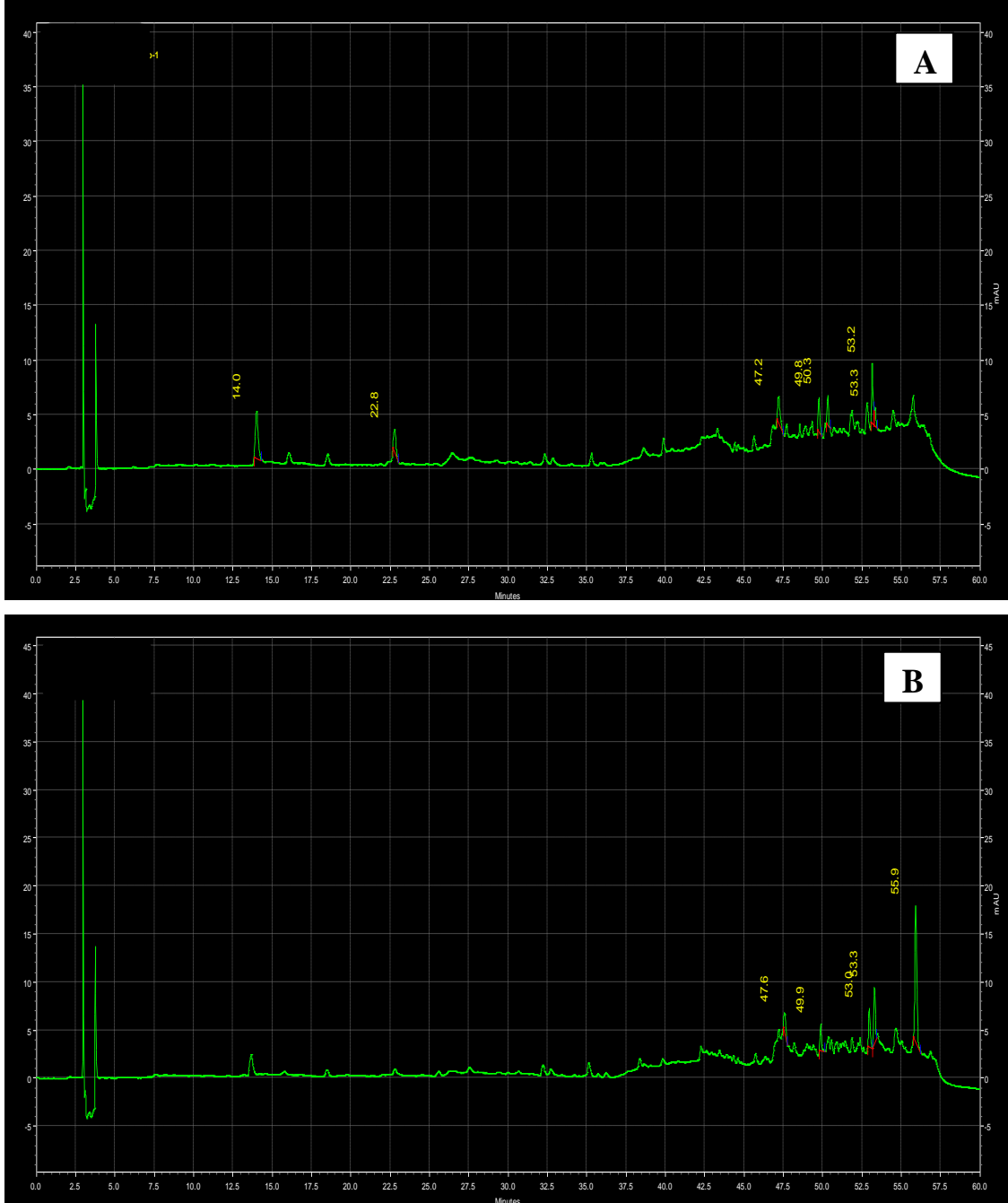


Figura 25- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} da partição em hexano de extrato etanólico de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

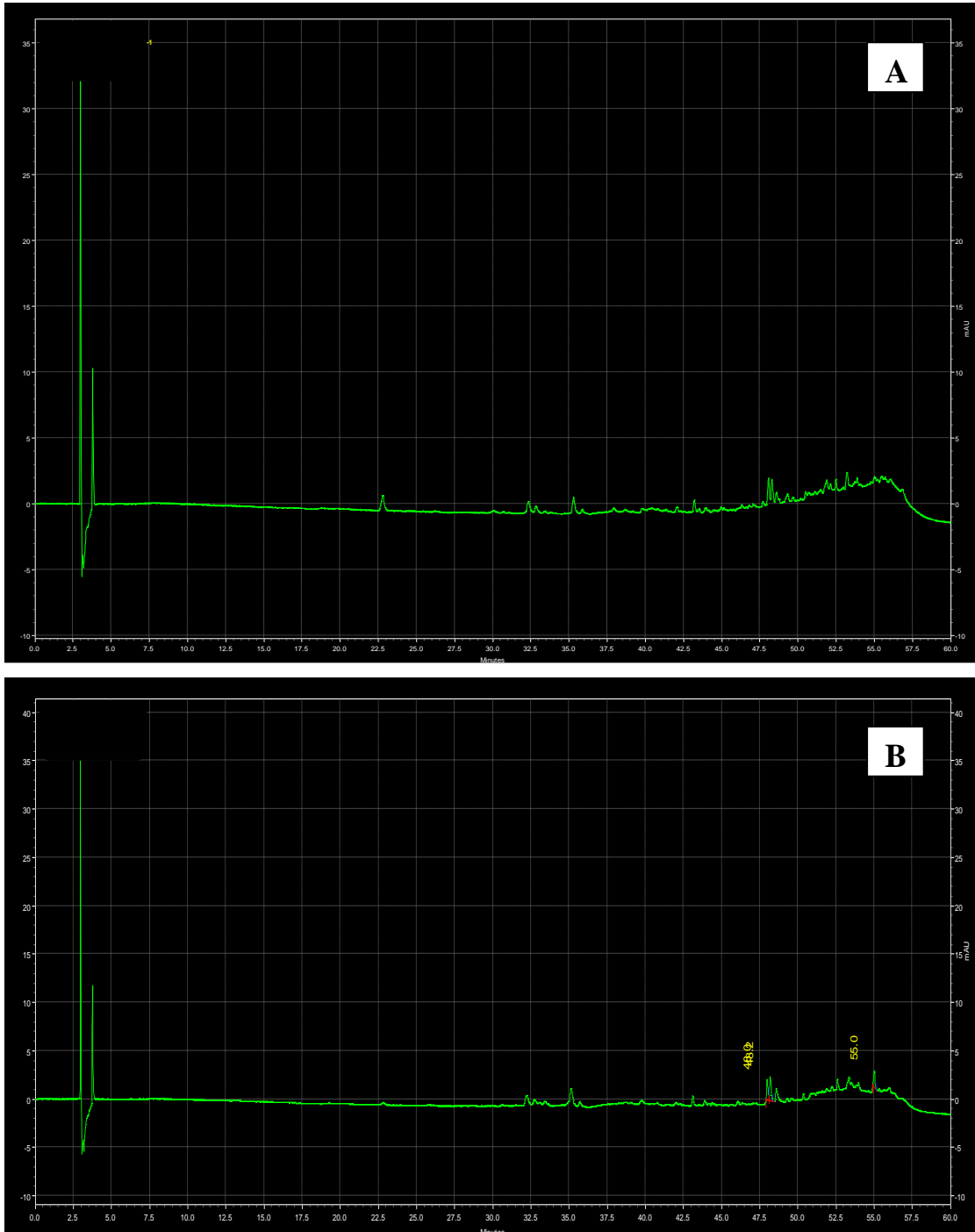
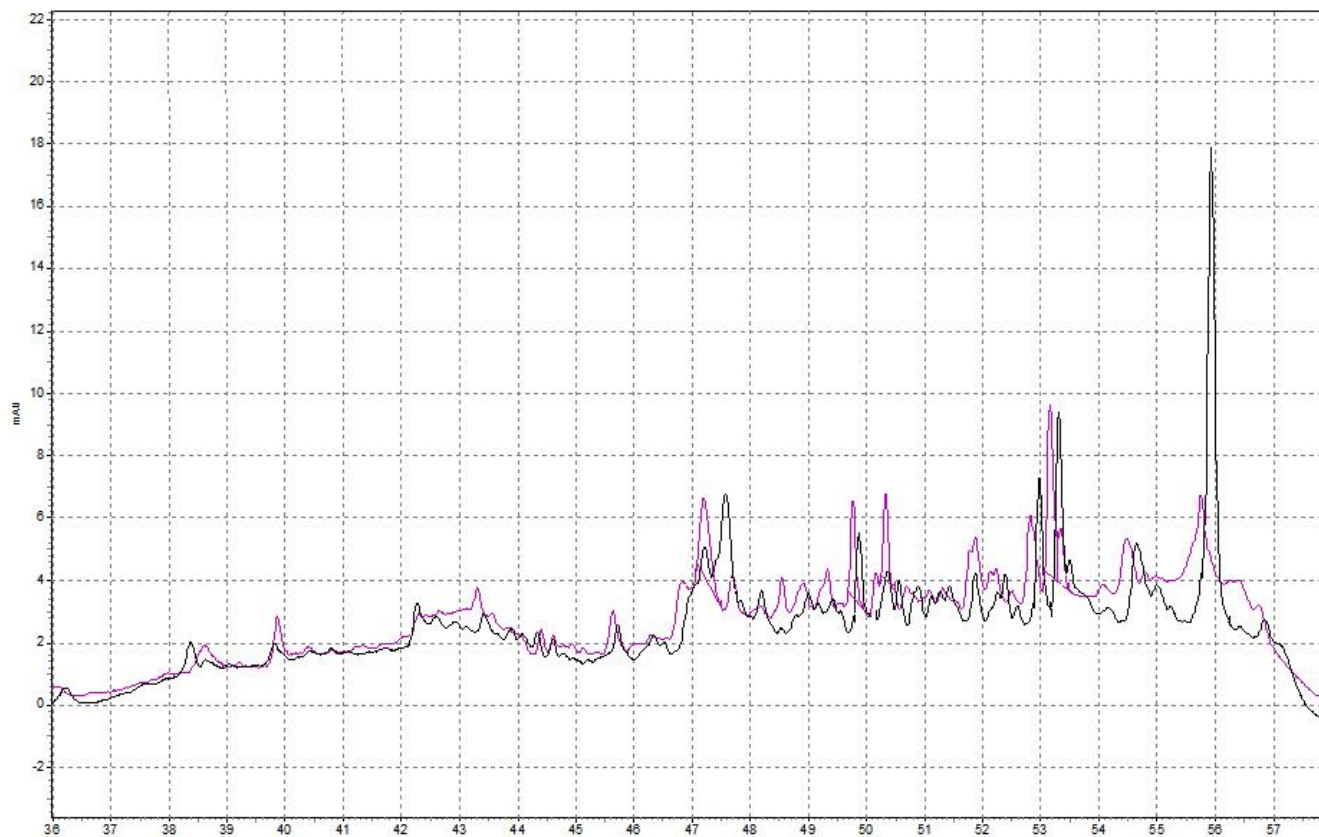


Figura 26- Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE -DAD-UV_{254nm} da partição em hexano de extrato etanólico de folhas coletadas a campo de *C. dendroides*.



Legenda - Corrida cromatográfica de 36 a 57 min.

- Extração por maceração dinâmica
- Extração acelerada por maceração no ultrassom

Figura 27– Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} da partição em diclorometano de extrato etanólico de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

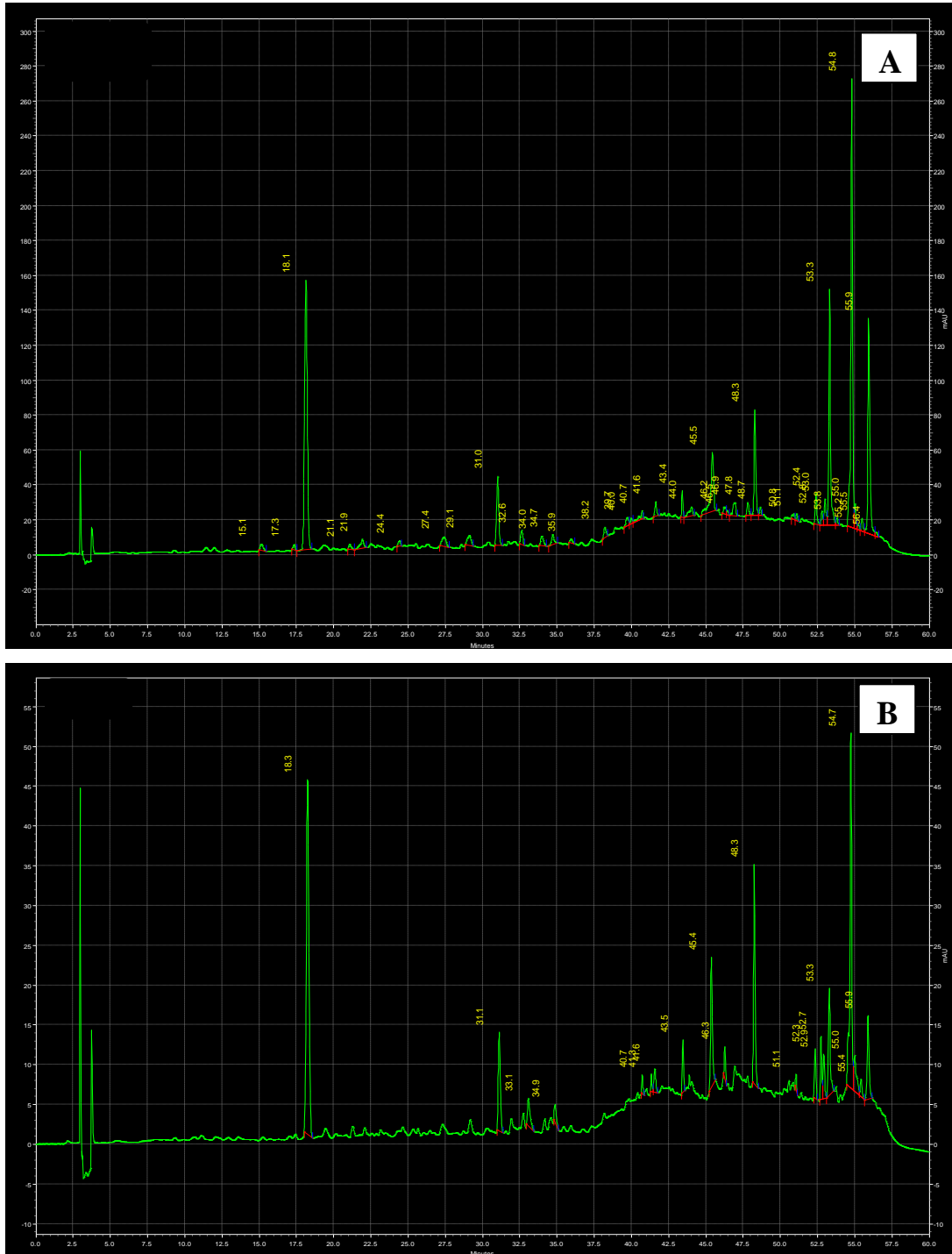


Figura 28- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} da partição em diclorometano de extrato etanólico de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

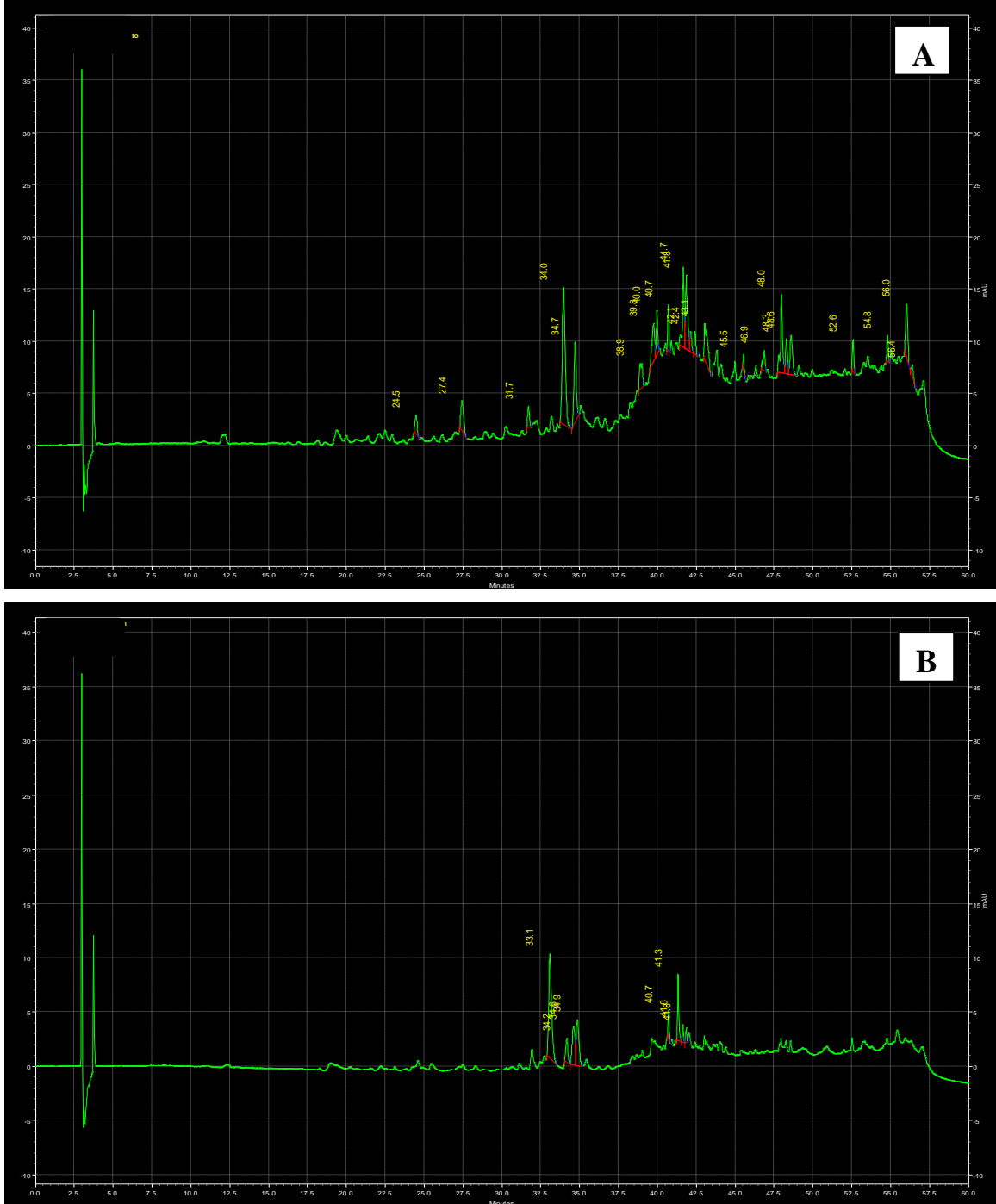
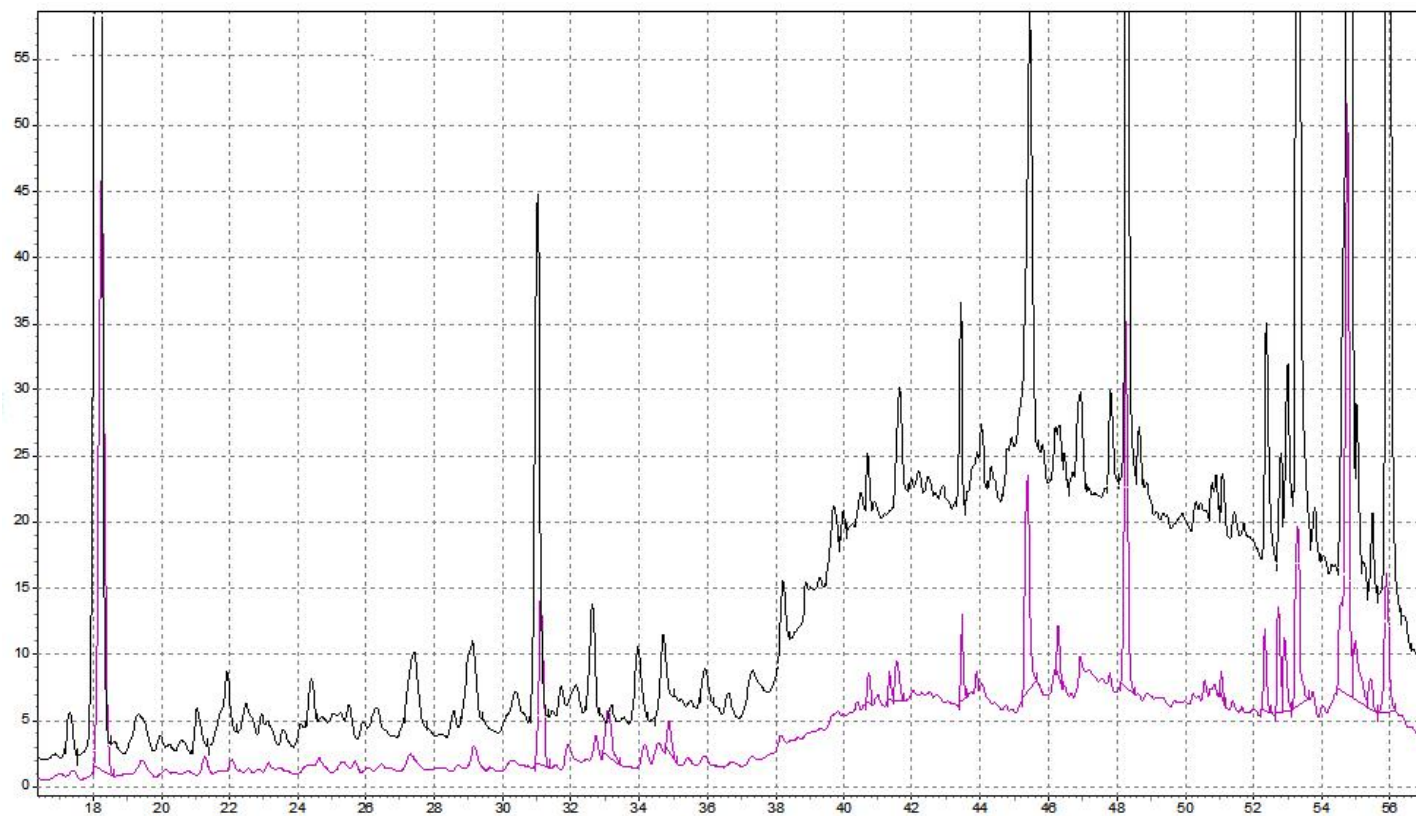


Figura 29- Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD -UV_{254nm} da partição em diclorometano de extrato etanólico de folhas coletadas a campo de *C. dendroides*.



Legenda - Corrida cromatográfica de de 18 a 56 min .
■ Extração por maceração dinâmica
■ Extração acelerada por maceração no ultrassom

Figura 30- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} da partição em acetato de etila de extrato etanólico de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

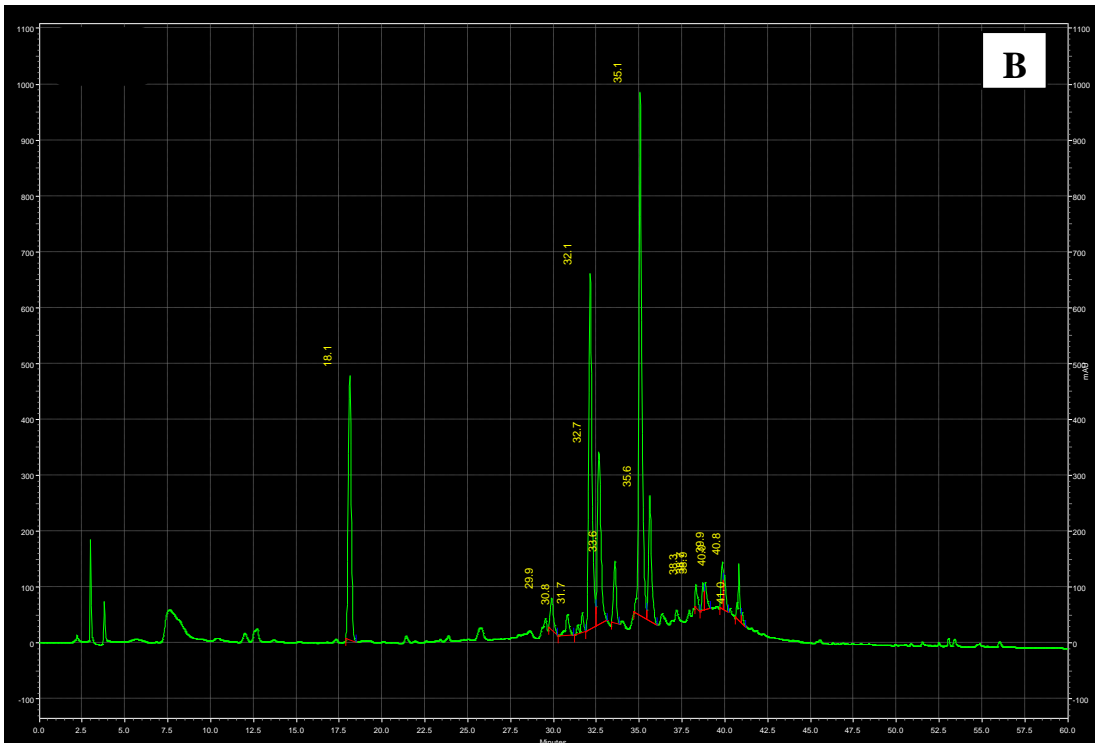
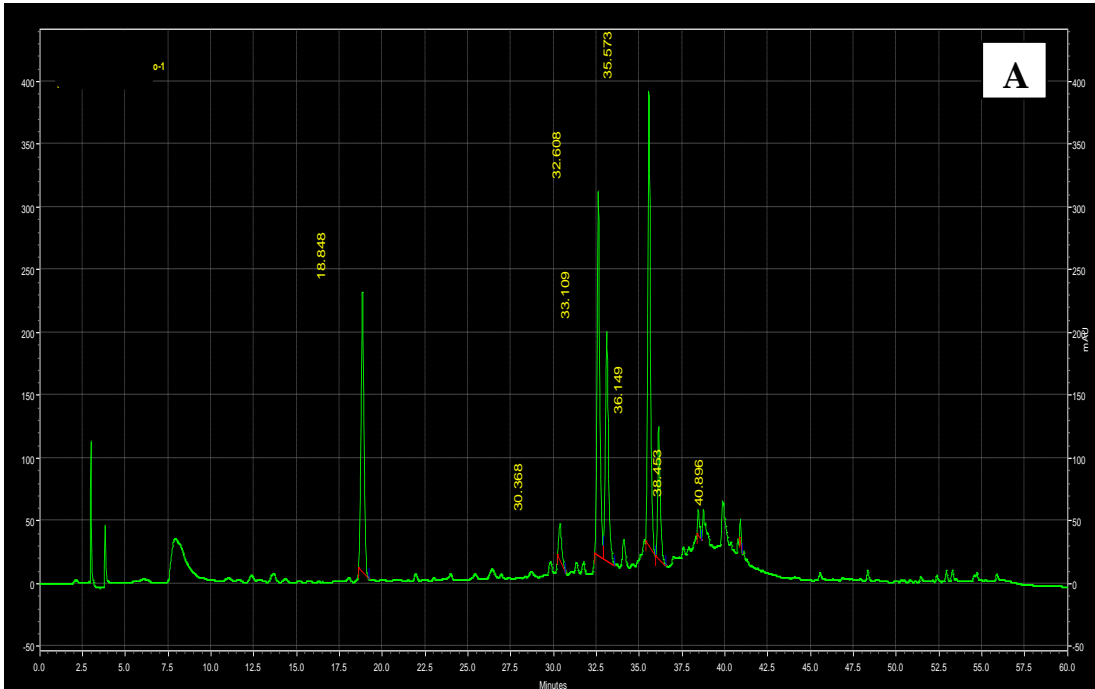


Figura 31- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} da partição em acetato de etila de extrato etanólico de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

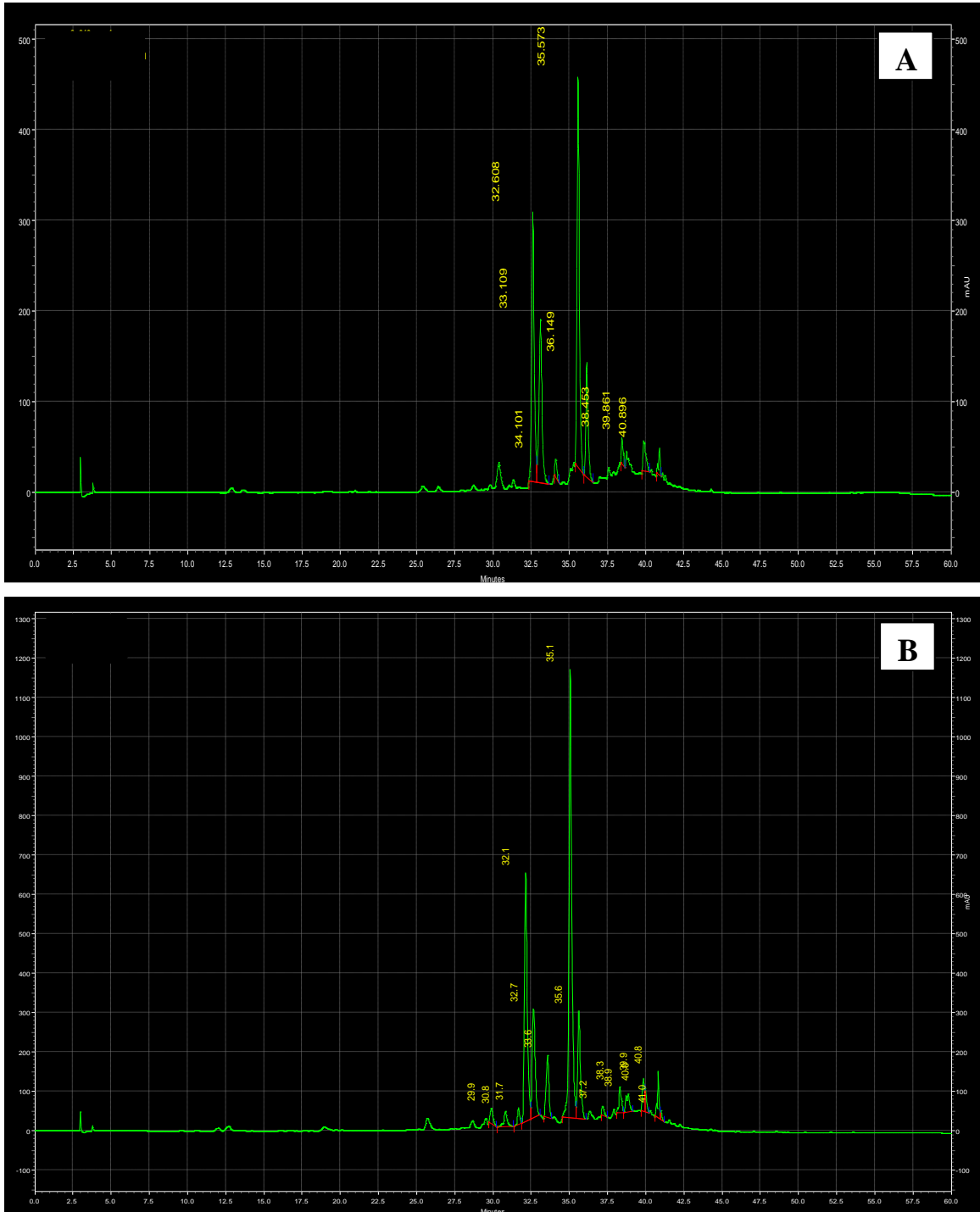
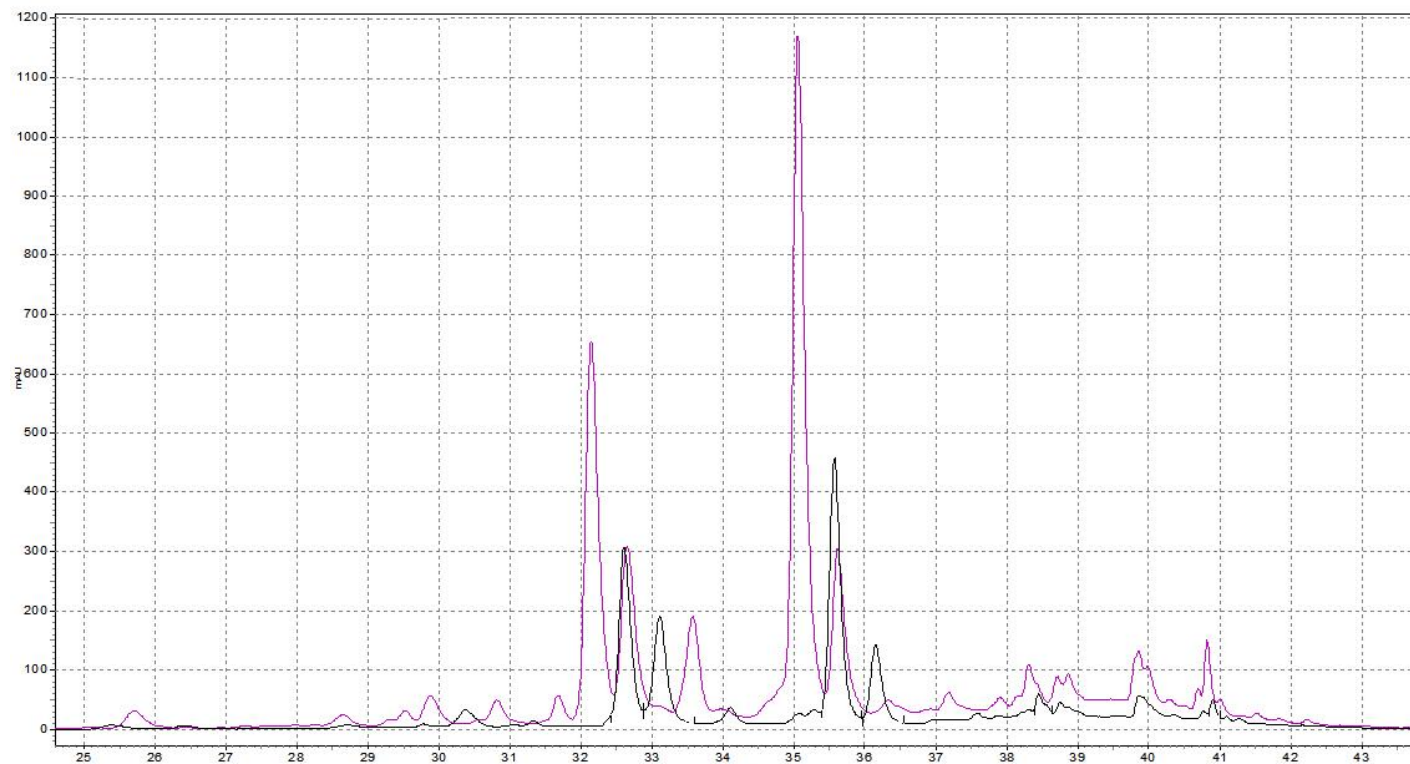


Figura 32- Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} da partição em acetato de etila de extrato etanólico de folhas coletadas a campo de *C. dendroides*.



Legenda - Corrida cromatográfica de 25 a 43 min.
■ Extração por maceração dinâmica
■ Extração acelerada por maceração no ultrassom

Figura 33- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} do resíduo aquoso do extrato etanólico de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

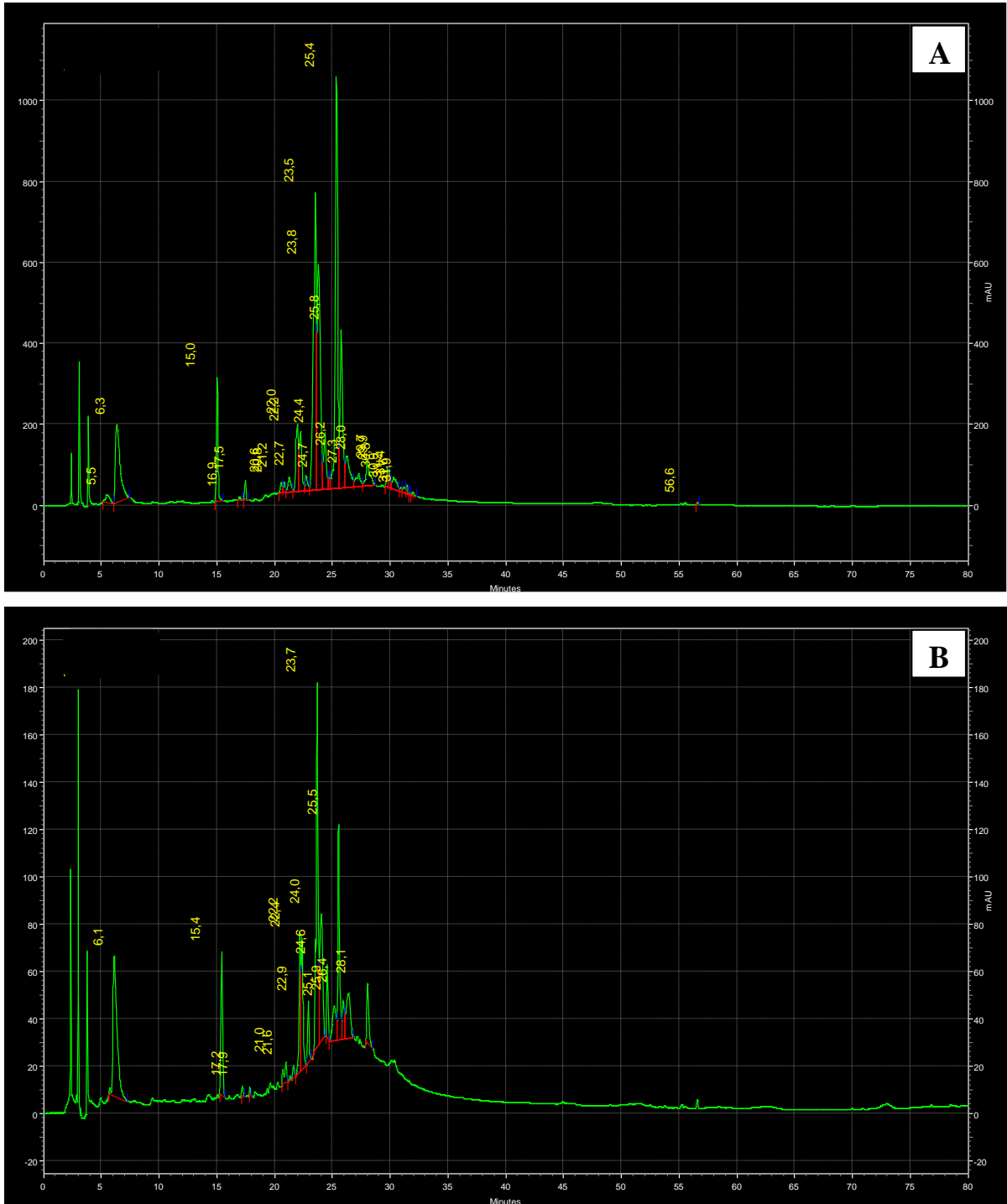


Figura 34- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} do resíduo aquoso do extrato etanólico de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

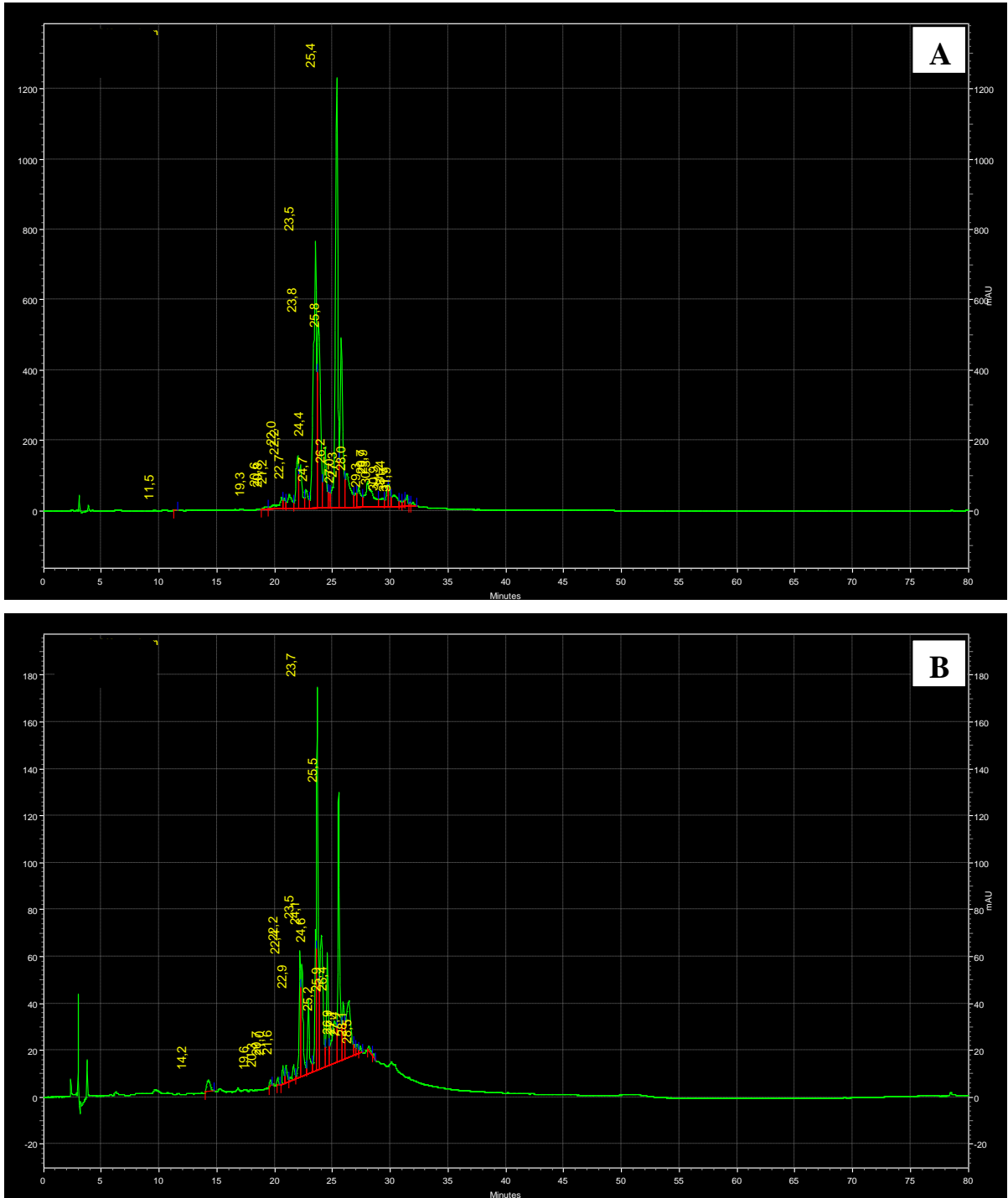
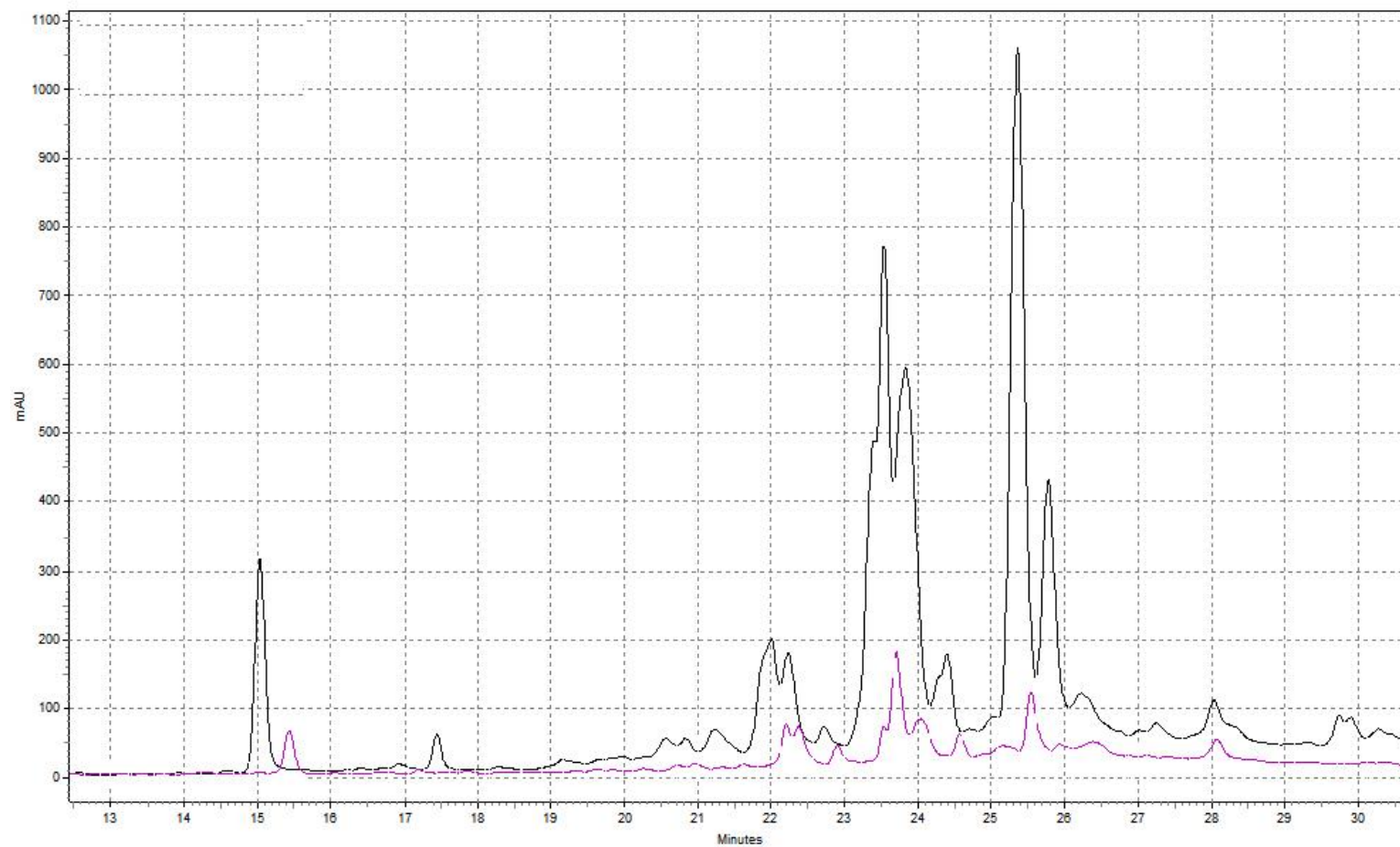


Figura 35- Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} do resíduo aquoso do extrato etanólico de folhas coletadas a campo de *C. dendroides*.



Legenda - Corrida cromatográfica de 13 a 31 min.

- Extração por maceração dinâmica
- Extração acelerada por maceração no ultrassom

Tabela 3- Espectros de absorção no UV dos sinais com maiores porcentagens de área relativa dos cromatogramas de extratos etanólicos brutos de folhas de campo de *C. dendroides* e suas partições em acetato de etila e resíduo aquoso.

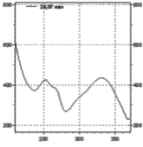
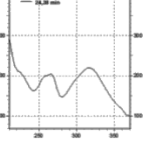
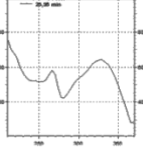
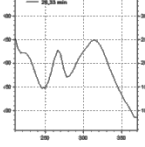
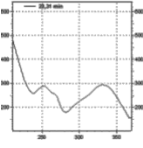
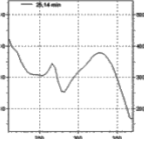
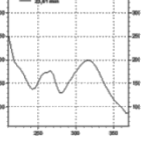
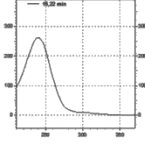
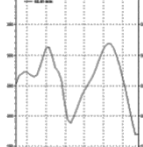
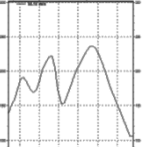
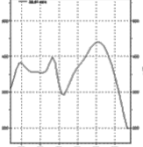
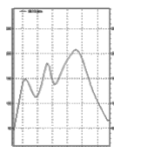
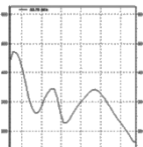
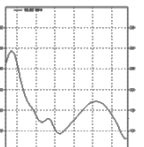
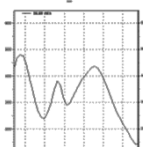
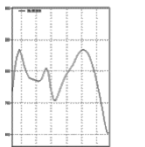
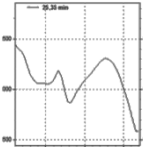
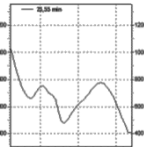
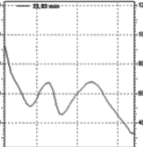
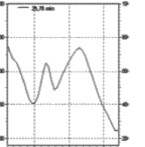
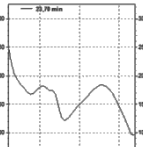
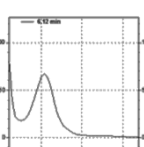
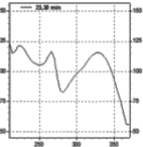
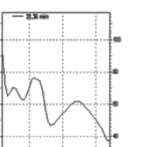
Fração	Métodos de extração	Espectros de absorção no UV			
Bruto	Maceração dinâmica				
	Maceração no ultrassom				
Acetato de etila	Maceração dinâmica				
	Maceração no ultrassom				
Resíduo aquoso	Maceração dinâmica				
	Maceração no ultrassom				

Figura 36- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} de extrato etanólico bruto de raiz de *C. dendroides* coletada a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

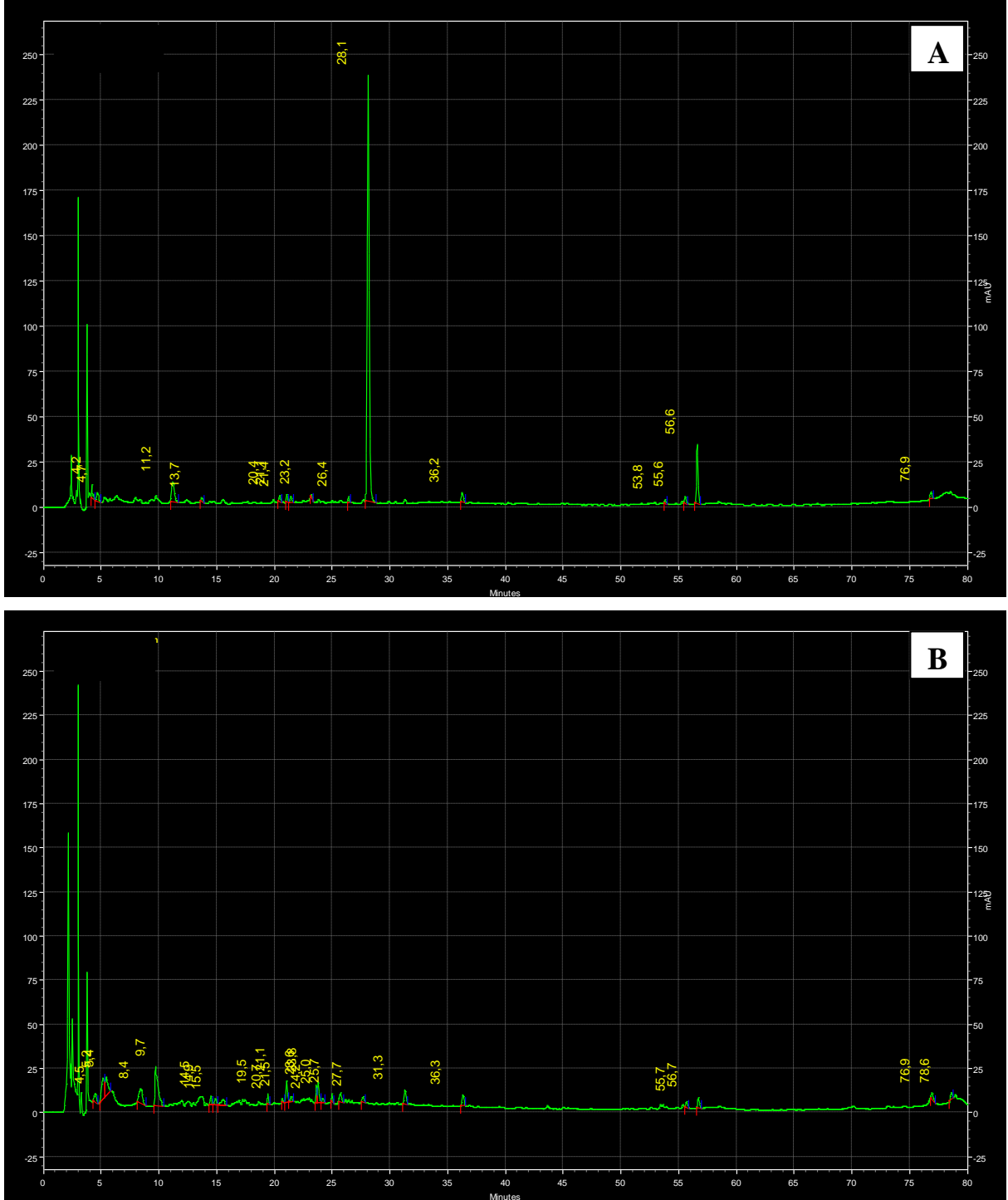


Figura 37- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} de extrato etanólico bruto de raiz de *C. dendroides* coletada a campo: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

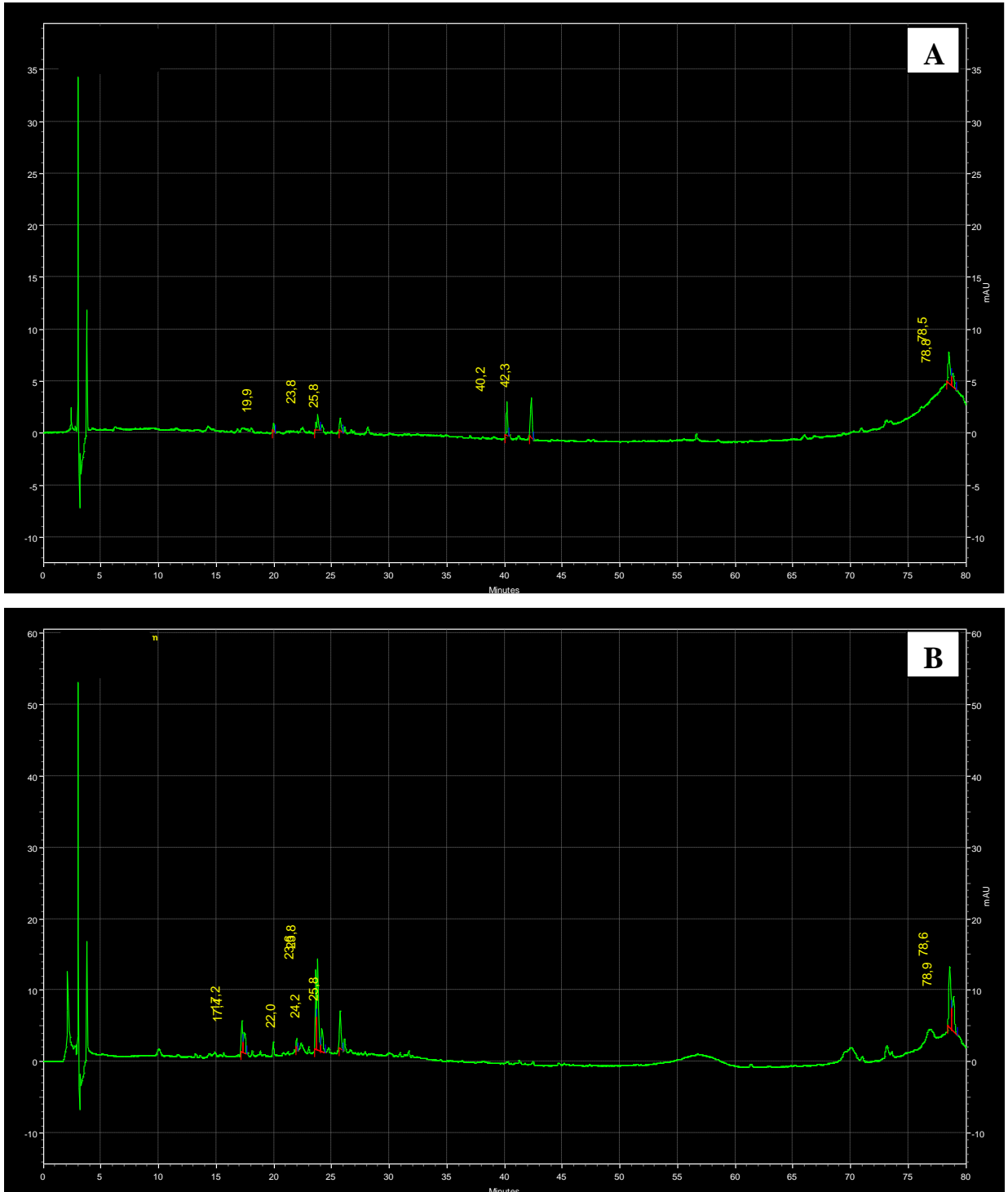


Figura 38 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{275nm} de extrato etanólico bruto de raiz de *C. dendroides* coletada a campo, obtidos por maceração dinâmica.

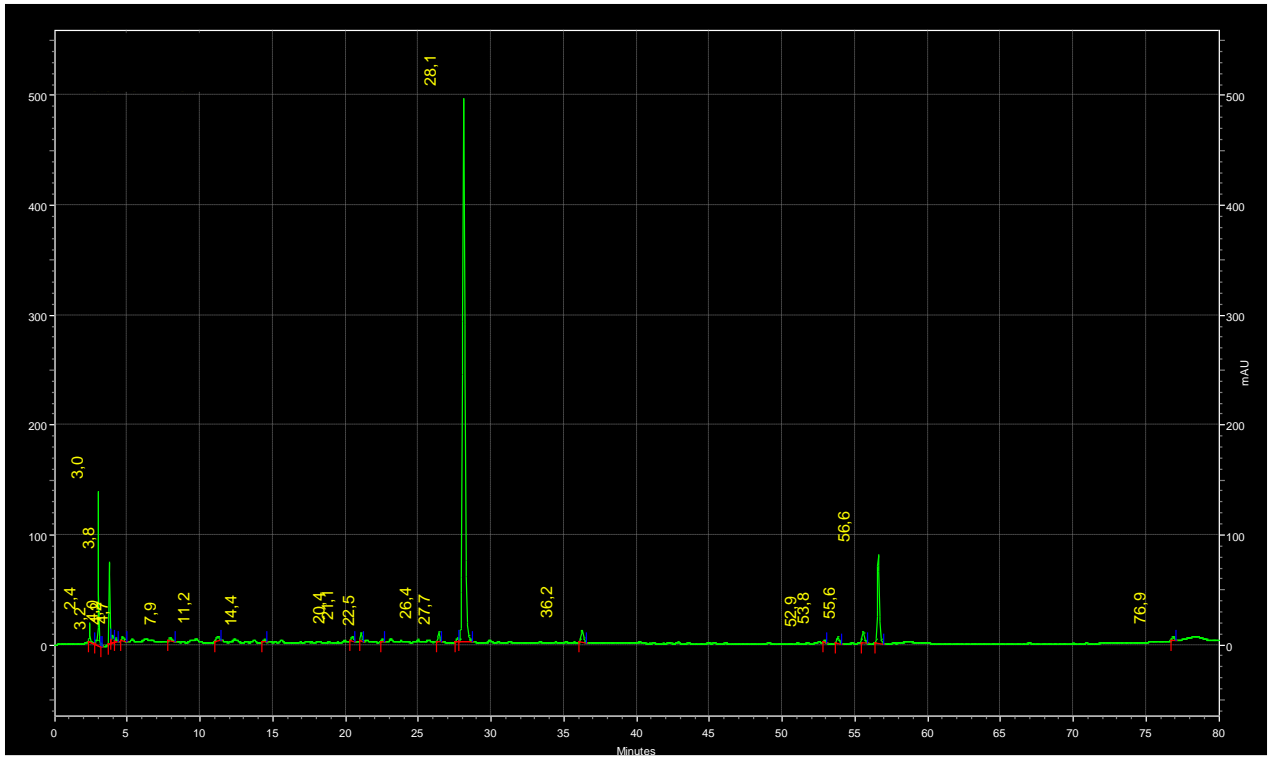
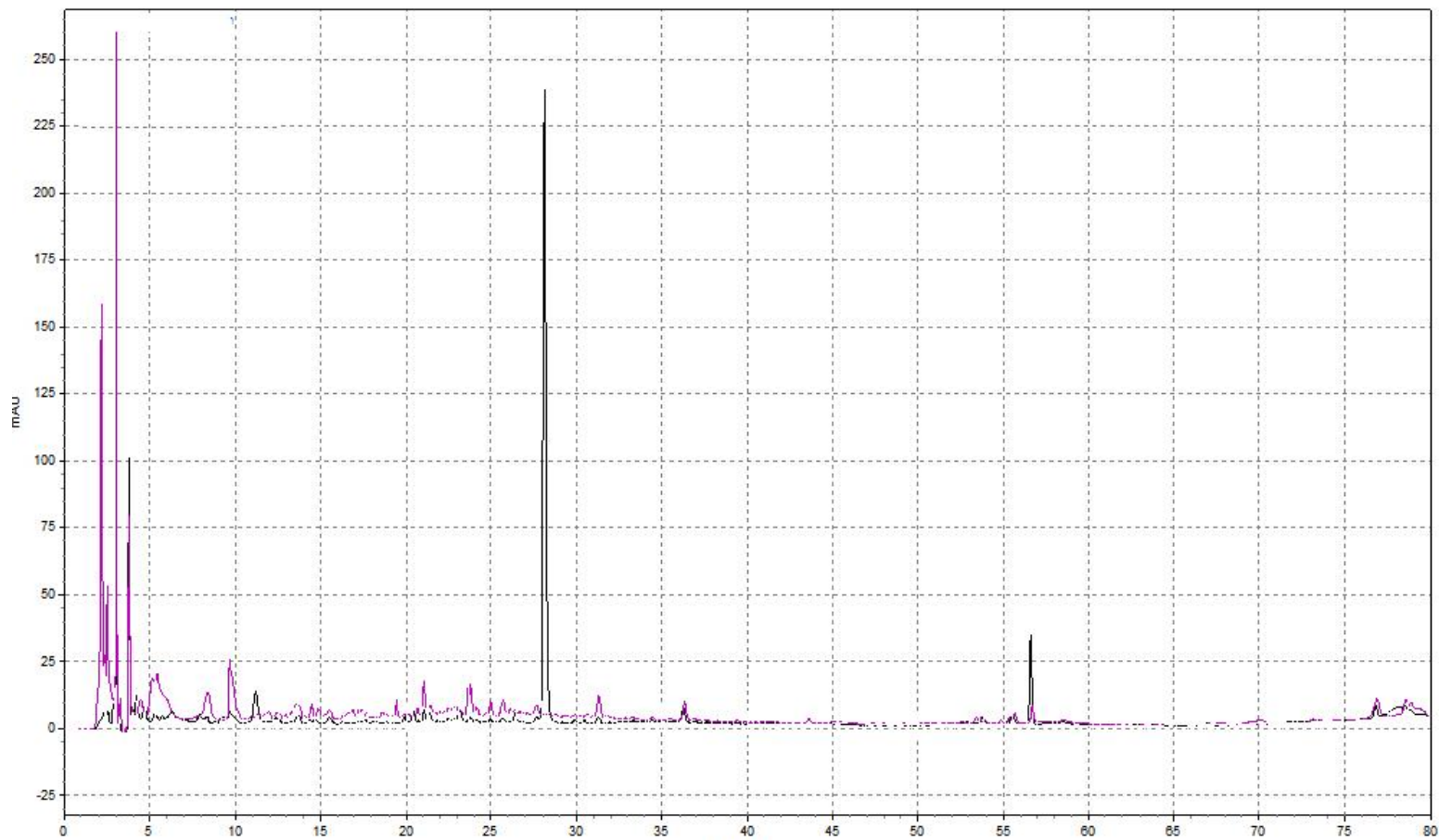


Figura 39- Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} de extrato etanólico bruto de raiz de *C. dendroides* coletadas a campo.



Legenda - Corrida cromatográfica de 0 a 80 min.

- Extração por maceração dinâmica
- Extração acelerada por maceração no ultrassom

Figura 40- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} de extrato etanólico de parte aérea de planta *in vitro* de *C. dendroides*: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

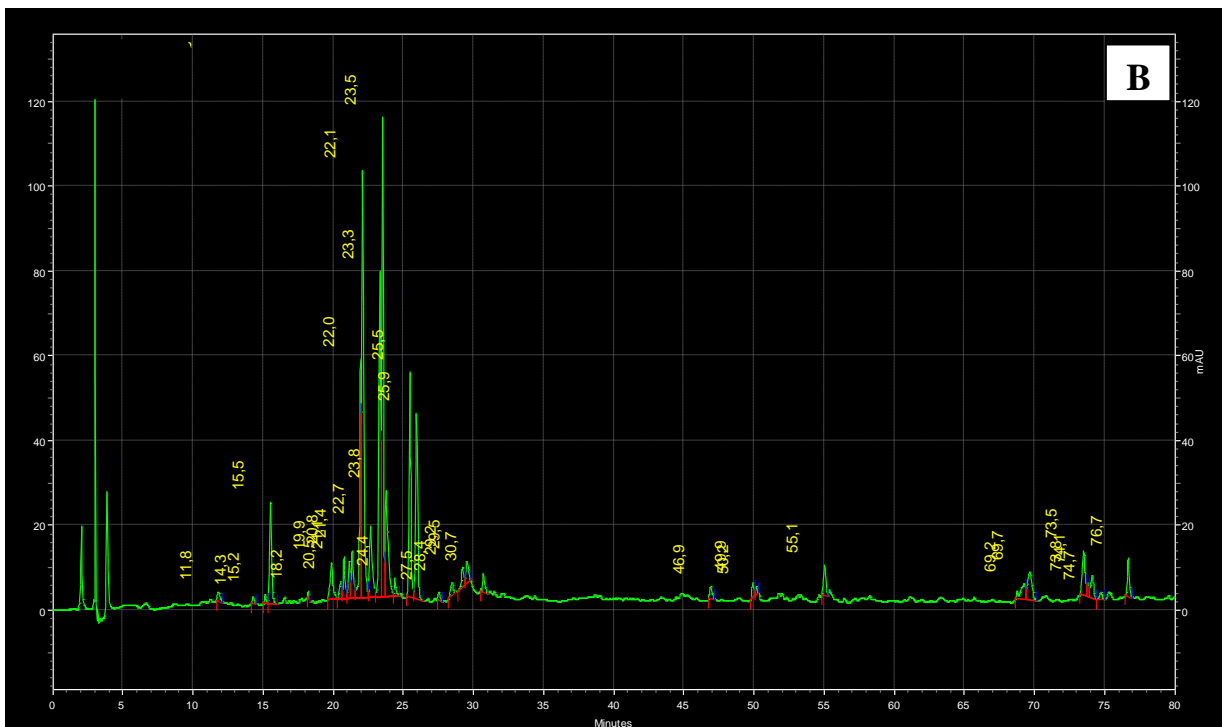
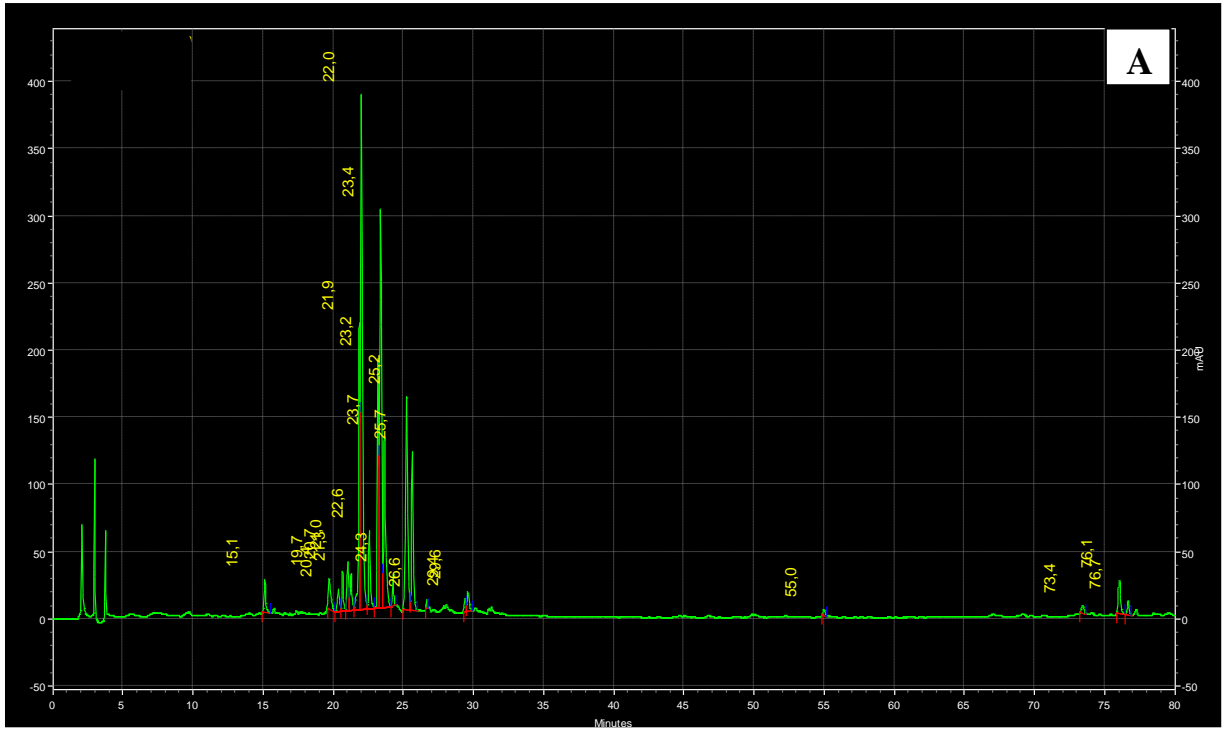


Figura 41- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} de extrato etanólico de parte aérea de planta *in vitro* de *C. dendroides*: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

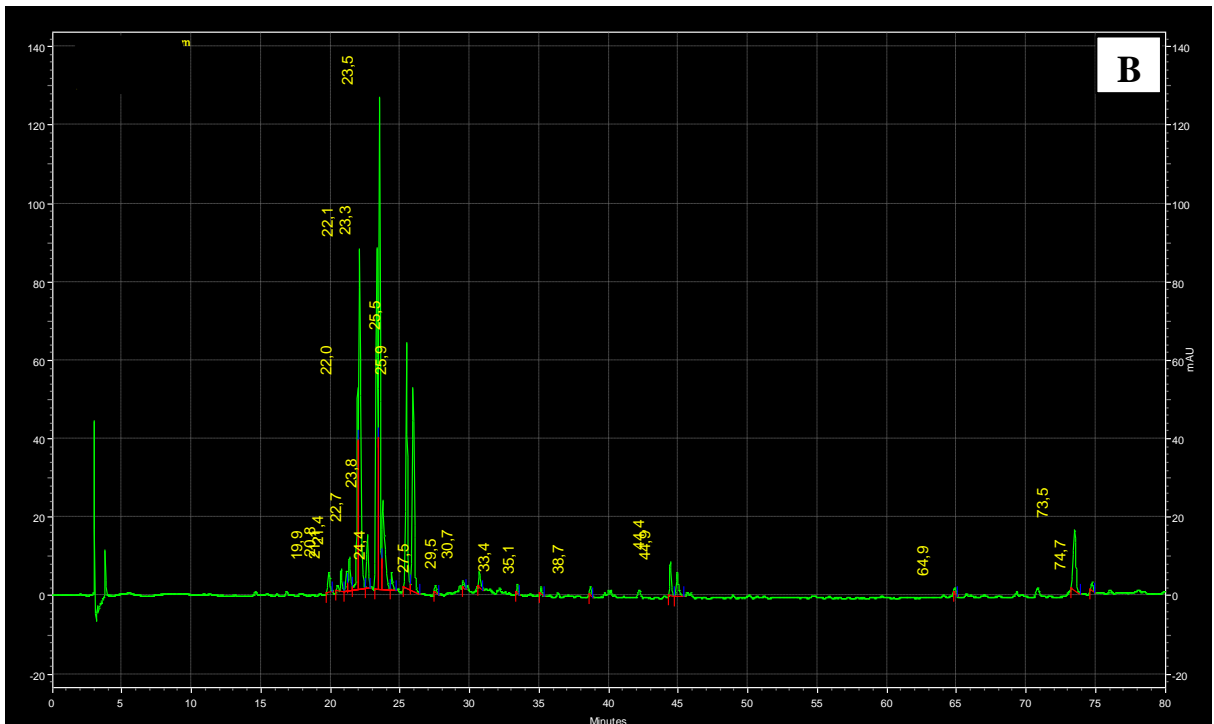
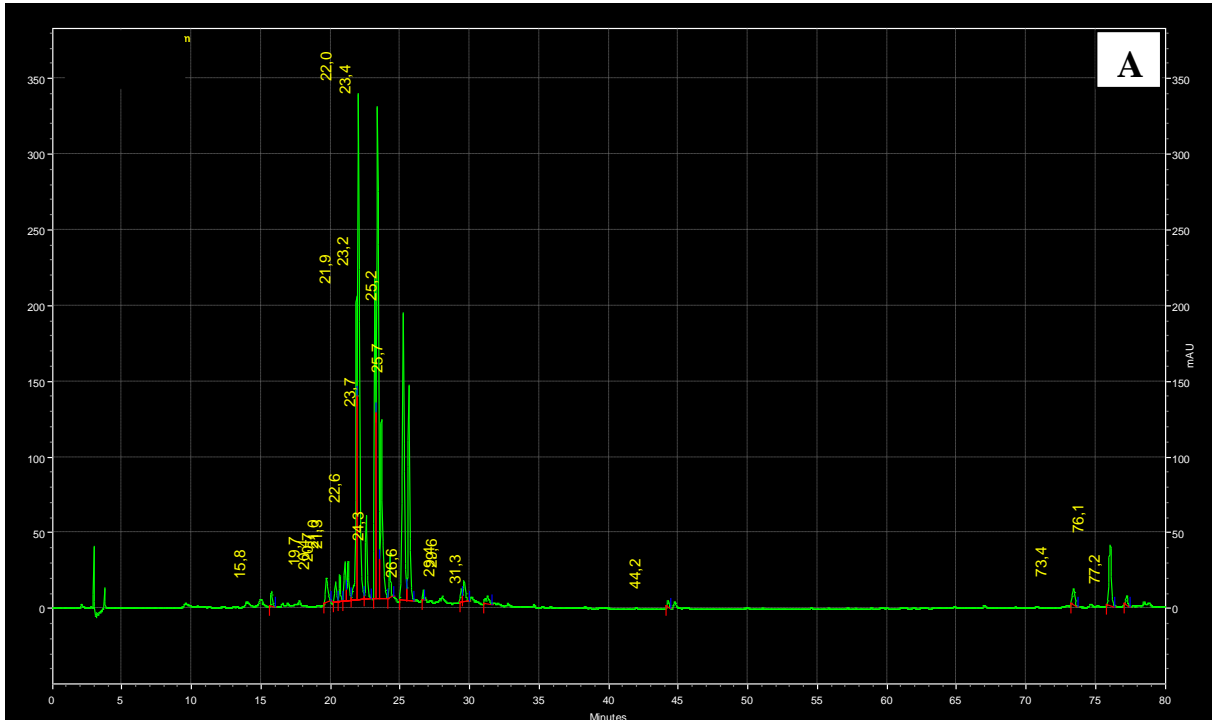
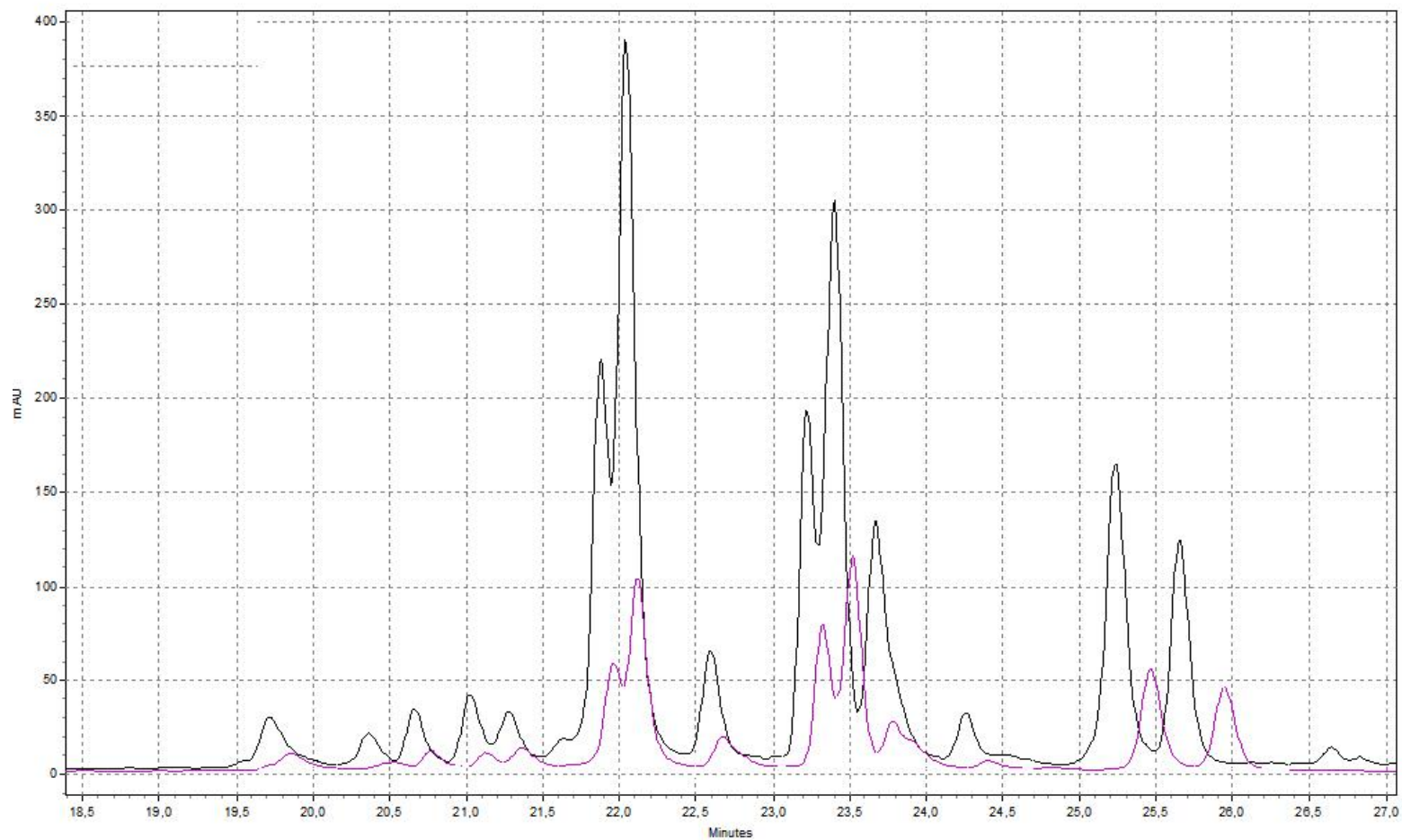


Figura 42- Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} de extrato etanólico de parte aérea de planta *in vitro* de *C. dendroides*, obtidos por (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.



Legenda - Corrida cromatográfica de 18,5 a 27 min.

- Extração por maceração dinâmica
- Extração acelerada por maceração no ultrassom

Figura 43- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} de extrato etanólico de raiz de planta *in vitro* de *C. dendroides*: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

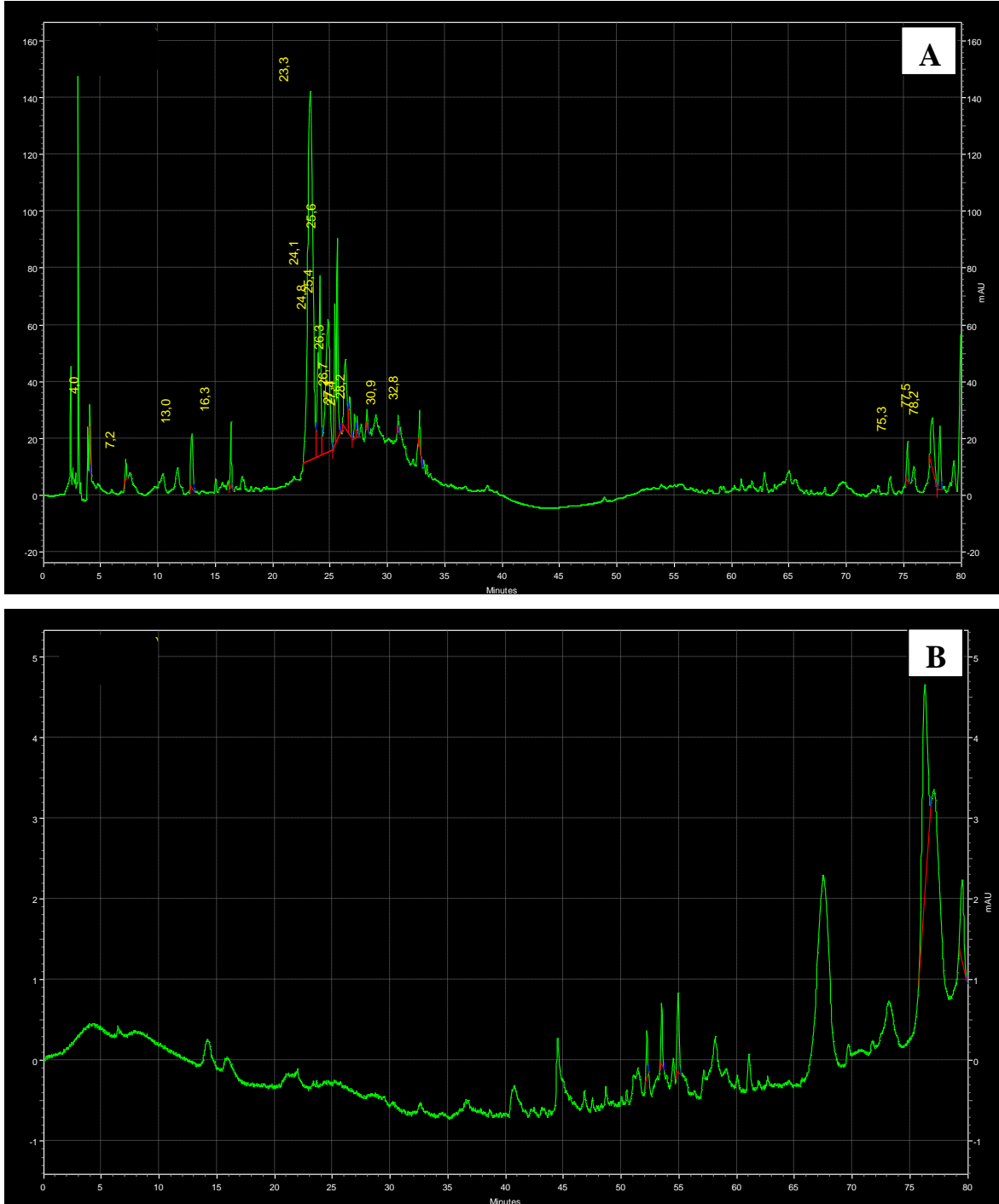


Figura 44- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} de extrato etanólico de raiz de planta *in vitro* de *C. dendroides*: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.

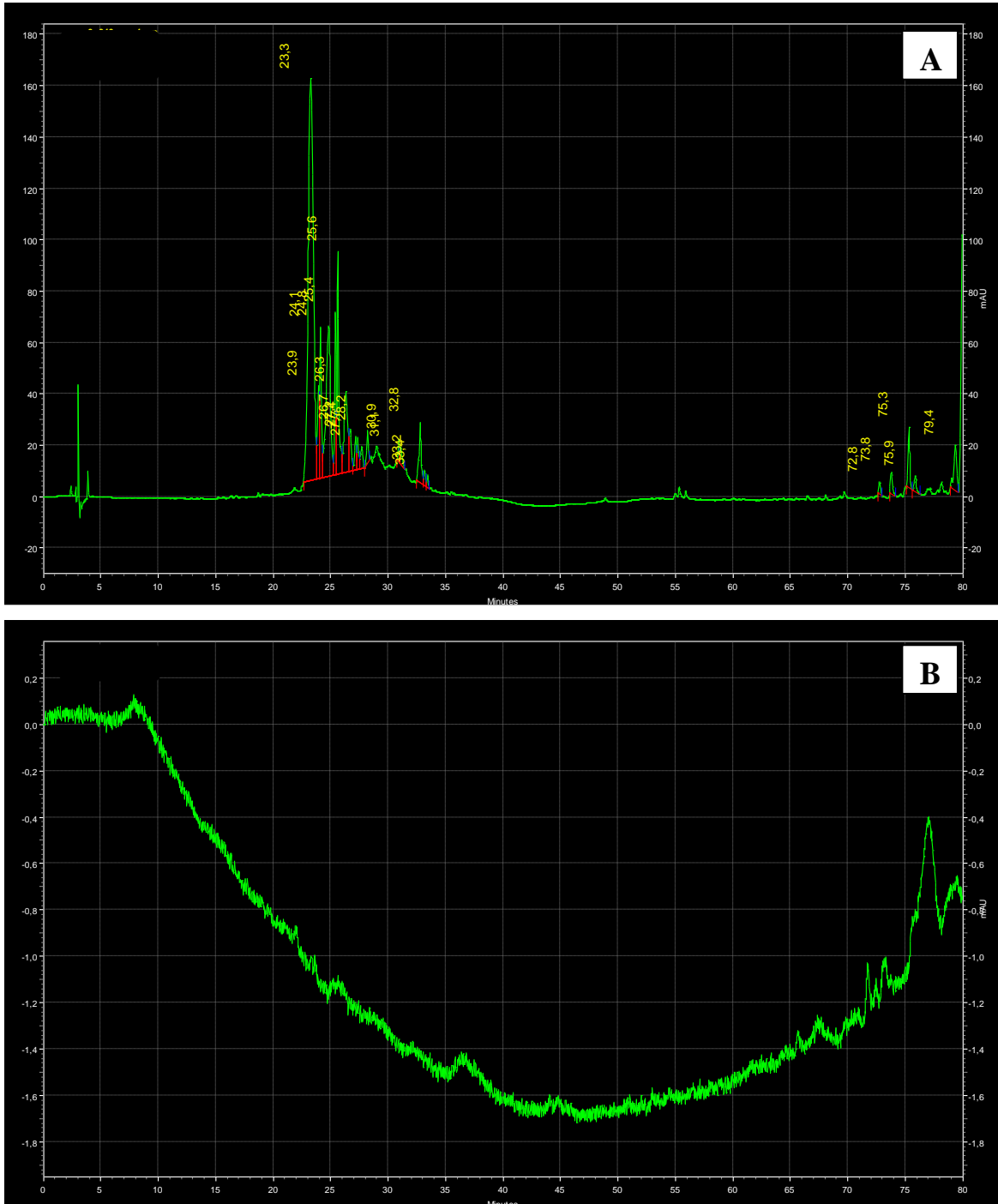
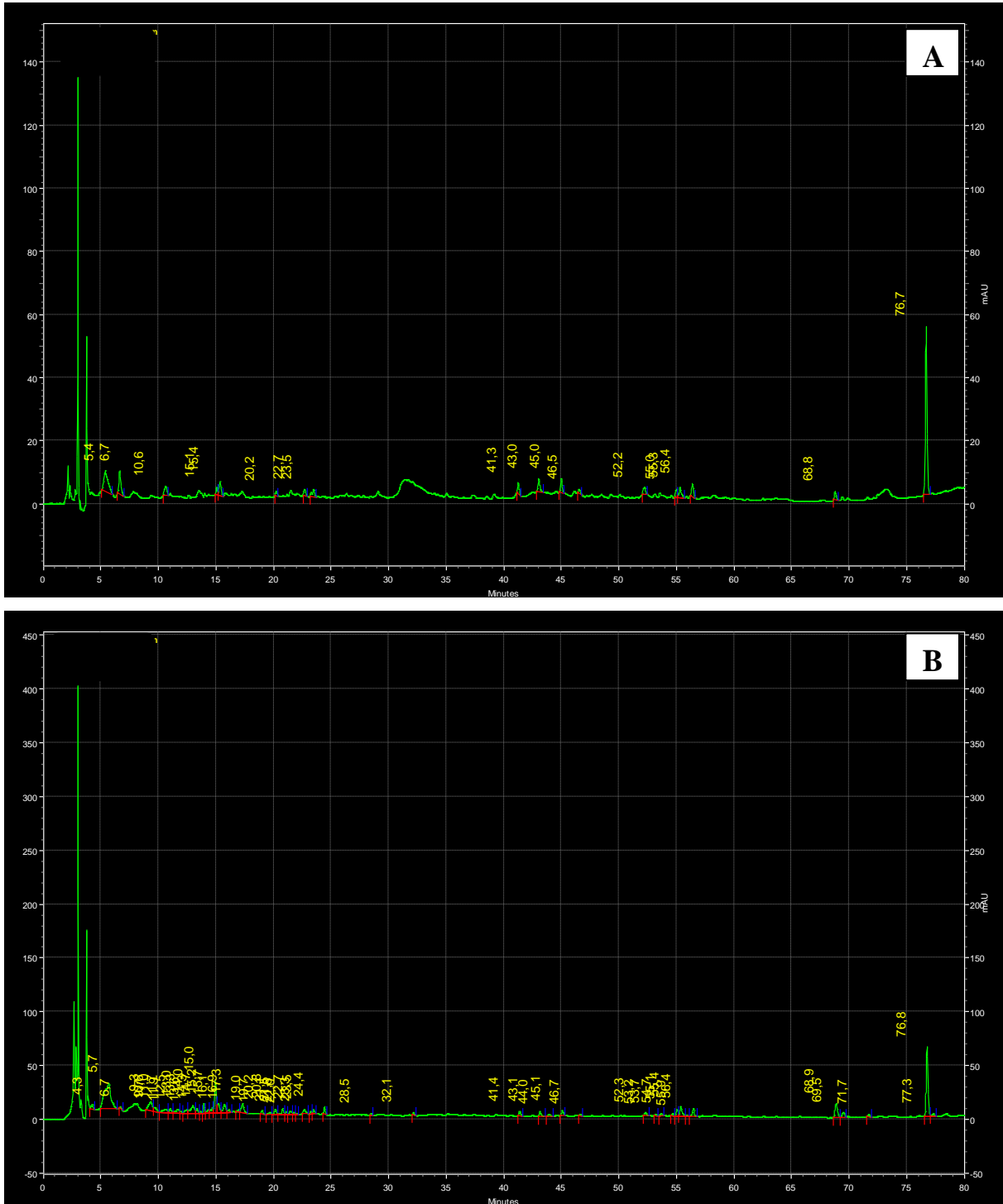
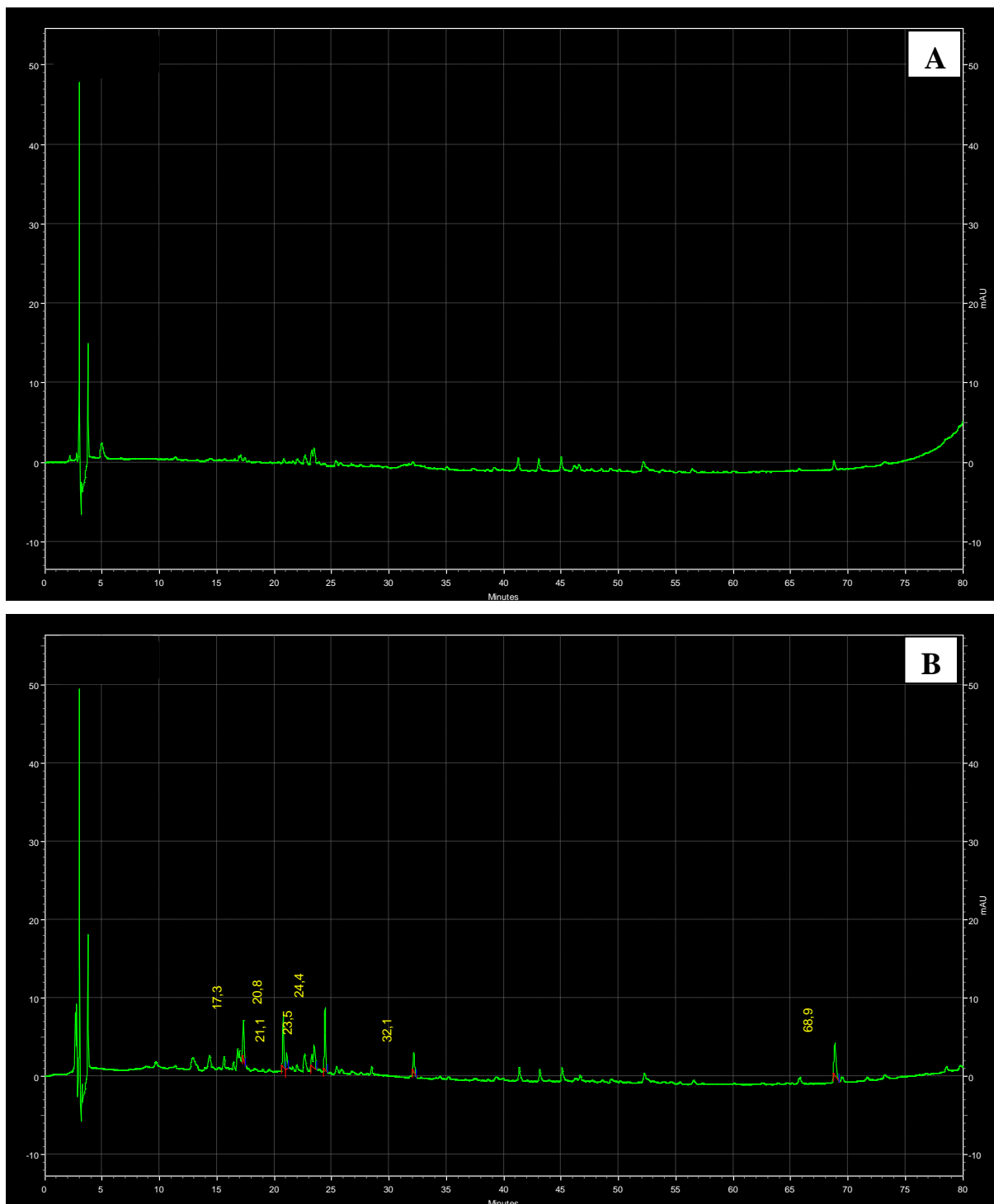


Figura 45- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} de extrato etanólico de cultura *in vitro* de raízes de *C. dendroides* na condição controle: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.



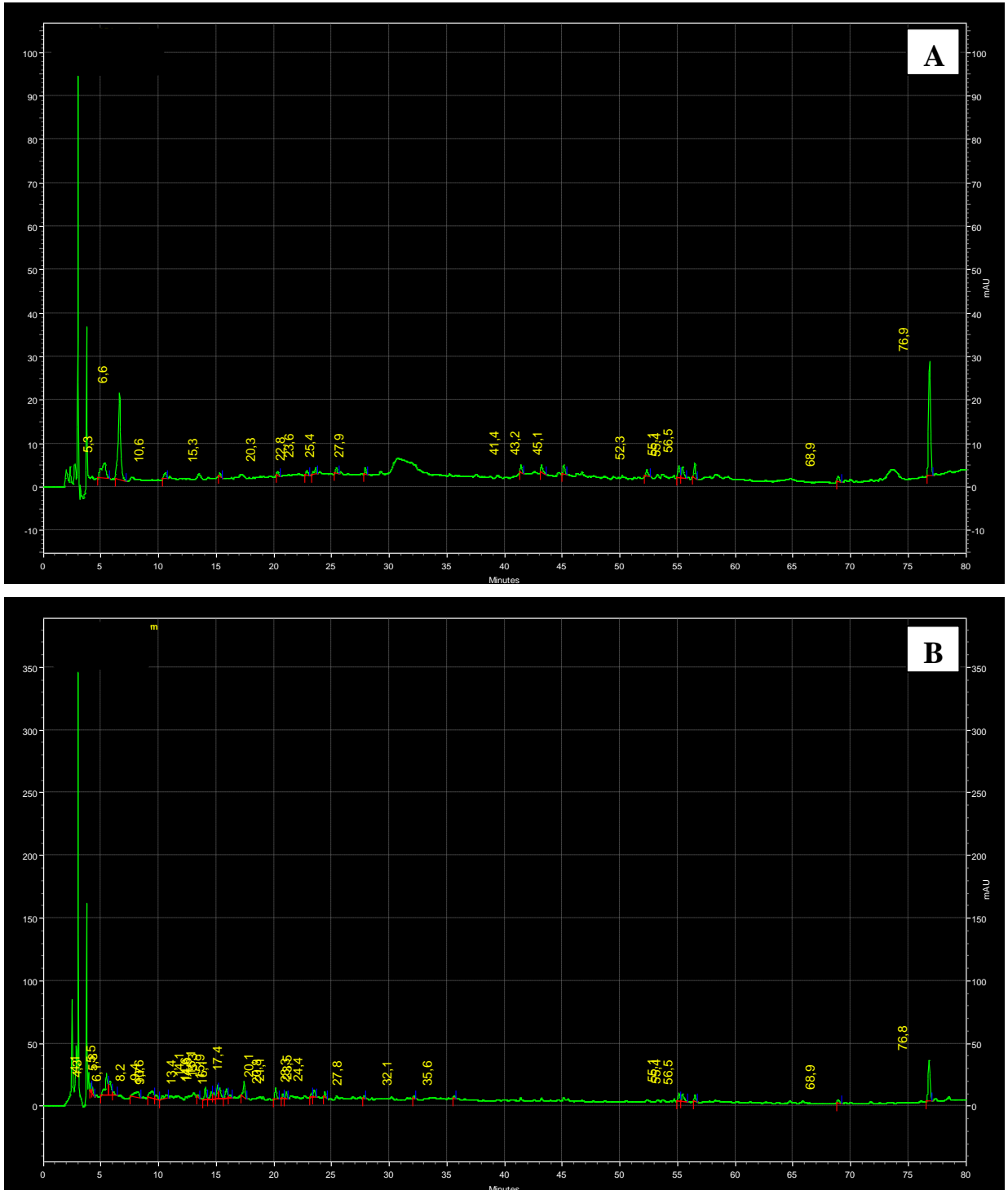
Legenda: Culturas estabelecidas em condição controle: MS + 3 mg.L⁻¹ AIB, 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH 5,8, rotação 110rpm

Figura 46- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} de extrato etanólico de cultura *in vitro* de raízes de *C. dendroides* na condição controle: (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.



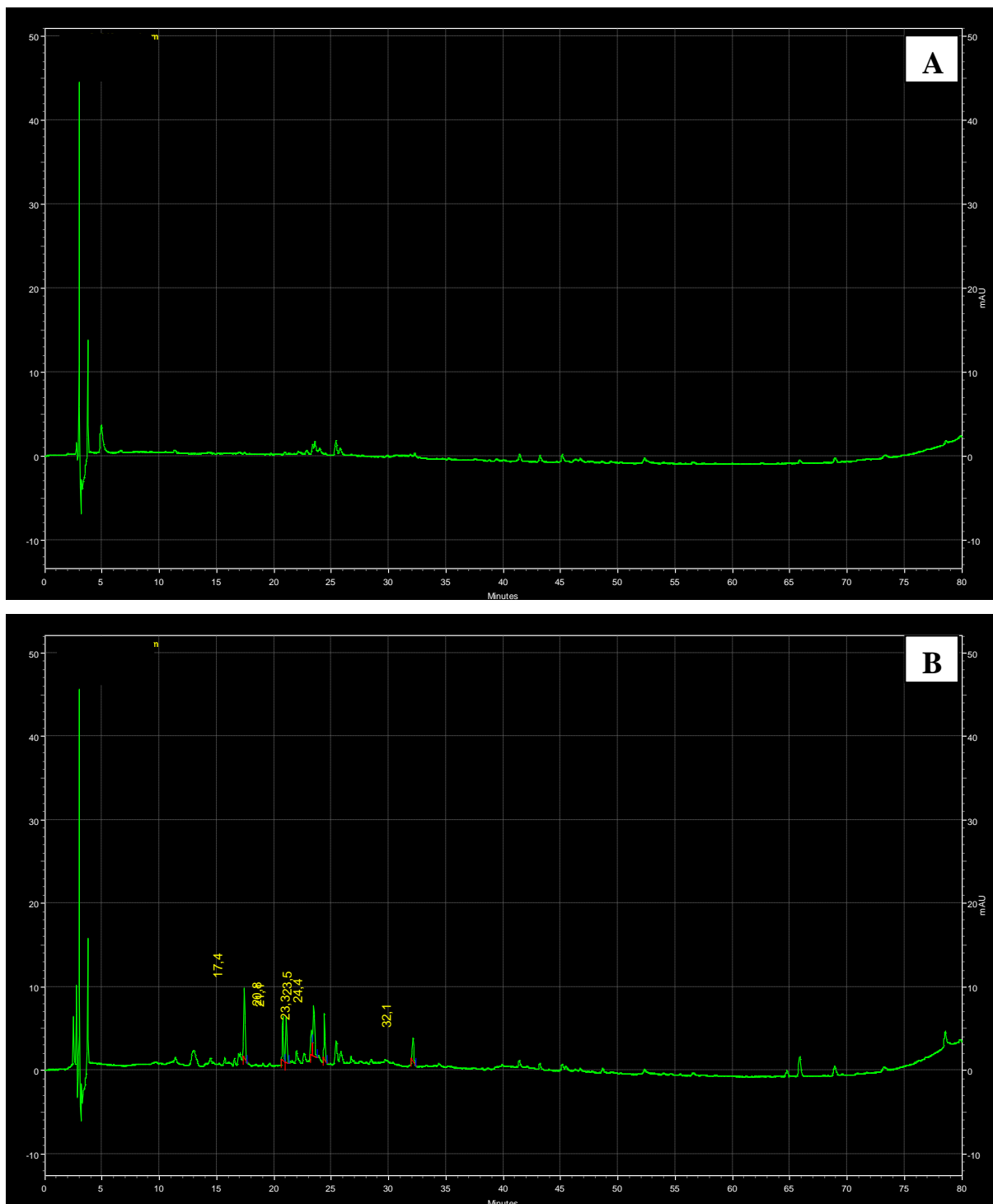
Legenda: Culturas estabelecidas em condição controle: MS + 3 mg.L⁻¹ AIB, 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH 5,8, rotação 110rpm

Figura 47- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{254nm} de extrato etanólico de cultura *in vitro* de raízes de *C. dendroides* estabelecida nas melhores condições (MC): (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.



Legenda: Culturas estabelecidas em condição MC: $MS^{1/4} + 3 \text{ mg.L}^{-1} \text{ AIB}$, 70 g.L^{-1} de sacarose, pH 6,5, rotação 130rpm.

Figura 48- Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV_{340nm} de extrato etanólico de cultura *in vitro* de raízes de *C. dendroides* estabelecida nas melhores condições (MC): (A) maceração dinâmica e (B) extração acelerada por maceração no ultrassom.



Legenda: Culturas estabelecidas em condição MC: $MS^{1/4} + 3 \text{ mg.L}^{-1} \text{ AIB}$, 70 g.L^{-1} de sacarose, pH 6,5, rotação 130rpm.

Tabela 4- Espectros de absorção no UV dos sinais com maiores porcentagens de área relativa dos cromatogramas de extratos etanólicos brutos de raiz de campo e material *in vitro* de *C. dendroides*.

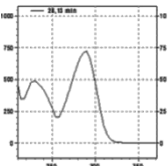
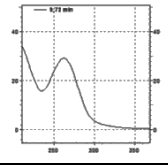
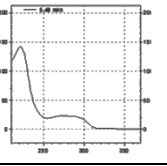
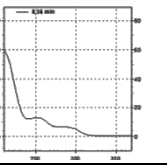
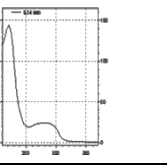
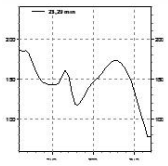
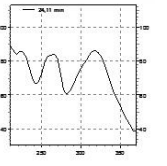
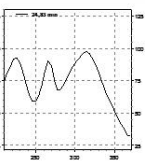
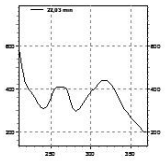
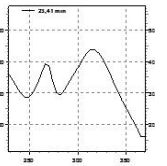
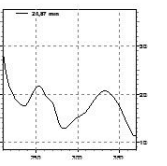
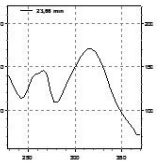
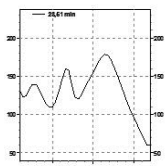
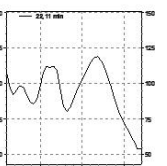
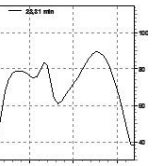
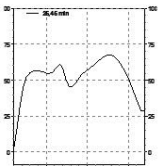
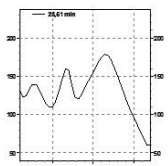
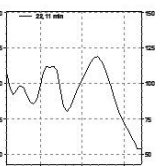
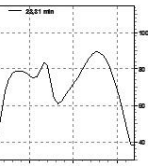
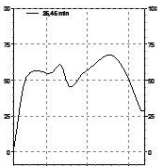
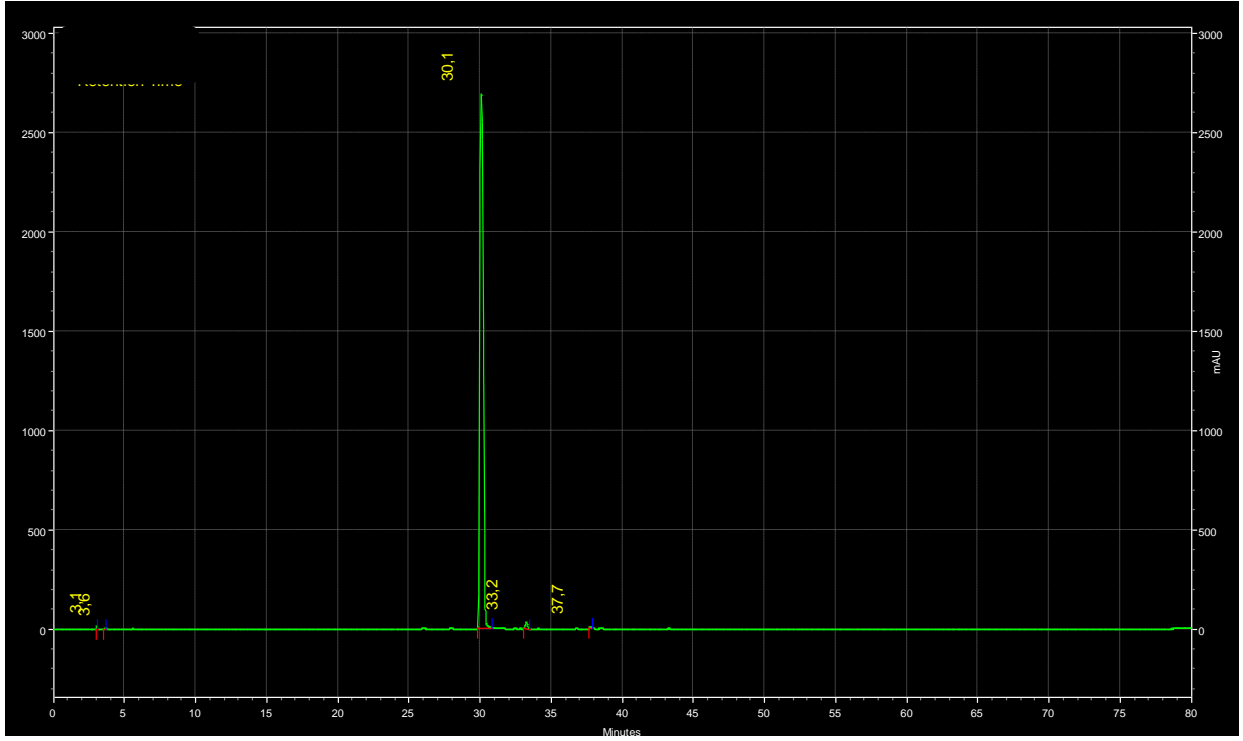
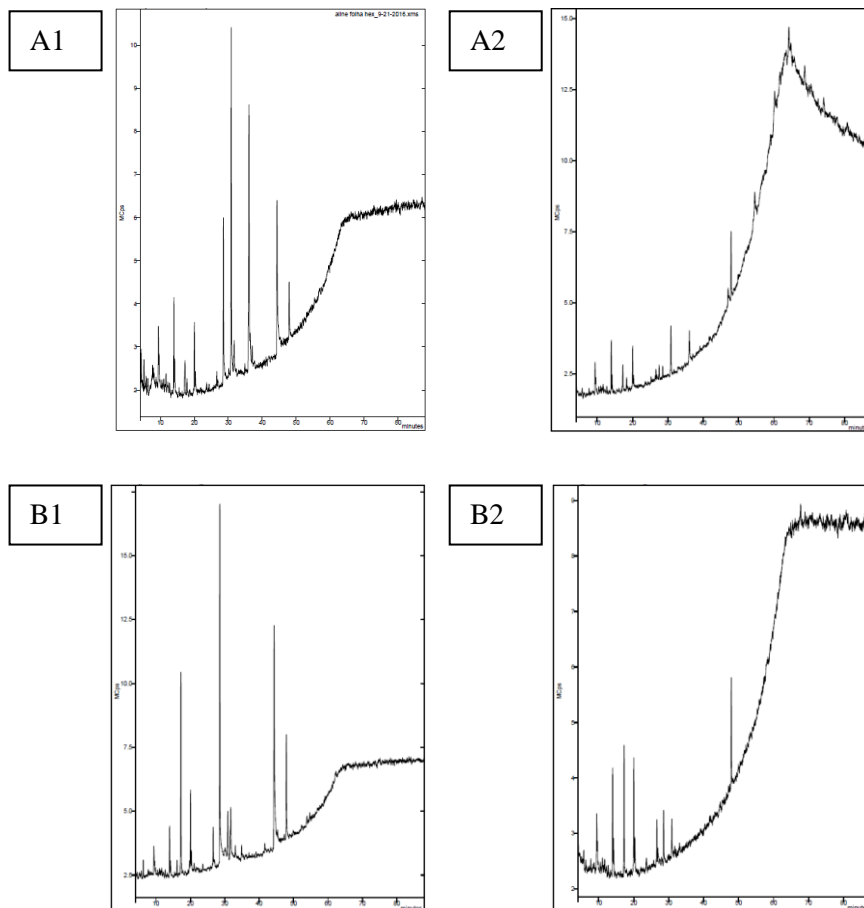
Material vegetal	Métodos de extração	Espectro de UV dos sinais majoritários			
Raiz	Maceração dinâmica		-	-	-
	Maceração no ultrassom				
Raiz <i>in vitro</i>	Maceração dinâmica				-
	Maceração dinâmica				
Parte aérea <i>in vitro</i>	Maceração dinâmica				
	Maceração no ultrassom				

Figura 49- Cromatograma por CLAE-DAD-UV_{275nm} do regulador de crescimento AIB.

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

Análises por CG-EM foram realizadas com as partições em hexano e diclorometano de extrato etanólico bruto de folhas de plantas de campo. Os cromatogramas gerados não apresentaram sinais de intensidades expressivas (Figuras 50, 51, 52 e 53), não permitindo a identificação de substâncias presentes nas amostras.

Figura 50- Cromatograma por CG-EM das partições em hexano (A) e diclorometano (B) do extrato etanólico bruto de folhas de *C. dendroides* coletadas a campo, obtidos por maceração dinâmica (1) e maceração acelerada por ultrassom (2).



5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliada a capacidade de proliferação de raízes a partir de explantes obtidos de plantas propagadas *in vitro* de *C. dendroides*. Em estudos prévios com a espécie foram estabelecidos protocolos eficientes de produção de raízes a partir de explantes obtidos de plantas oriundas de germinação *in vitro* (CASTRO, 2015). Entretanto, o uso de plantas propagadas *in vitro* é vantajoso, pois permite estabelecer um estoque de plantas matrizes, caracterizando uma fonte contínua de explantes radiculares. Por outro lado, a utilização de plantas obtidas por germinação *in vitro* requer a frequente coleta de sementes, desinfestação e inoculação sob condições *in vitro*, limitando o fornecimento de matrizes.

Diferentes tipos de explantes têm sido utilizados para dar início a culturas de raízes. Entre eles, segmentos foliares, como no caso de *Eurycoma longifolia* (HUSSEIN et al., 2012), *Cichorium intybus* (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007) e *Taverniera cuneifolia* (JAMDHADE-VIJAY et al., 2012); caulinares, como em culturas de *Cichorium intybus* (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007) e *Hypericum perforatum* (ZOBAYED; SAXENA, 2003), e mesmo a partir de calos, como em *Centella asiática* (MERCY et al., 2012) e *Hypericum perforatum* (GOEL et al., 2009). Entretanto, o uso de segmentos radiculares, como no presente estudo com *C. dendroides*, permite a constante retirada de explantes de uma mesma planta matriz, uma vez que a parte aérea pode ser subcultivada e desenvolver novas raízes. Desta forma, o estabelecimento de culturas a partir de segmentos radiculares apresenta-se como uma eficiente estratégia de produção *in vitro*.

O estabelecimento de culturas de raízes ganha destaque entre as técnicas de cultura de tecidos por se tratar de uma estratégia que permite um alto acúmulo de biomassa em um sistema de células diferenciadas, característica importante para a síntese de muitas substâncias bioativas (NAGARAJAN et al., 2011). Em outras espécies do gênero *Cleome*, este sistema mostrou resultados distintos com relação à capacidade de proliferação de raízes a partir de explantes oriundos das duas fontes citadas anteriormente. Na espécie *C. spinosa*, a multiplicação foi fortemente influenciada pela origem dos explantes, sendo que apenas

culturas iniciadas por raízes oriundas de plantas obtidas por germinação *in vitro* apresentaram um significativo crescimento, quando comparadas às culturas estabelecidas a partir de explantes radiculares obtidos de plantas propagadas *in vitro* (MORAES, 2015). Por outro lado, culturas com alta produção de biomassa foram estabelecidas para a espécie *C. rosea* utilizando explantes radiculares oriundos de plantas propagadas *in vitro* (CORDEIRO et al., 2015).

As culturas de raízes de *C. dendroides* foram estabelecidas em meio MS líquido. Embora alguns estudos reportem o estabelecimento de culturas de raízes em meios solidificados (GAO et al., 2005; NANDAGOPAL; KUMARI, 2007), mais frequentemente essas culturas são estabelecidas em meio líquido, uma vez que o crescimento em meio sólido ou em suporte sólido pode se apresentar mais lento, possivelmente pelo fato de em meio líquido as culturas serem frequentemente mantidas sob agitação, o que proporciona maior aeração e disponibilidade de nutrientes (GEORGE et al., 2008). O meio líquido também apresenta outras vantagens, como a maior facilidade de preparo e o menor custo, uma vez que não há o uso de agentes solidificantes (ADELBERG, 2004). Além disso, o estabelecimento de protocolos em meio líquido, mesmo que em menor escala, como no caso do uso de frascos de pequeno volume, é mais promissor em permitir a produção em larga escala, empregando biorreatores (TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA; CID, 2010).

Geralmente a multiplicação de raízes adventícias requer a suplementação do meio de cultura com fitorreguladores (GEORGE et al., 2008). Para *C. dendroides*, embora as culturas mantidas em meio sem suplementação hormonal tenham demonstrado capacidade de proliferação, o crescimento foi fortemente influenciado pela presença da auxina AIB. Multiplicação de raízes em meio líquido na ausência de fitorreguladores, ainda que com baixo rendimento, foi observada na espécie *C. rosea* (CORDEIRO et al., 2015), assim como em *Withania coagulans* (ABOUZID et al., 2010) e *Cicer arietinum* (ISLAM et al., 2005). Entretanto, a ausência de suplementação hormonal não promoveu multiplicação em culturas de *Hypericum perforatum* (CUI et al., 2010) e *Plumbago zeylanica* (WANG; HUANG, 2005).

Dentre os reguladores de crescimento mais empregados em culturas de raízes estão as auxinas (GEORGE et al., 2008; LEMOS, 2010). Considerando resultados prévios para o

estabelecimento de culturas de raízes de *C. dendroides* com o uso de diferentes tipos e concentrações de auxinas, foi constatada maior proliferação em meio suplementado com a auxina AIB na concentração de 3,0 mg.L⁻¹ (CASTRO, 2015). A eficiência do AIB na multiplicação de raízes também foi constatada em culturas das espécies *Hypericum perforatum* (ZOBAYED; SAXENA, 2003; CUI et al., 2010), *Podophyllum peltatum* (ANBAZHAGAN et al., 2008), *Arnebia hispidissima* (SHEKHAWAT, 2012), *Costus igneus* (NAGARAJAN et al., 2011) e *Withania coagulans* (ABOUZID et al., 2010). Entretanto, para algumas espécies há a necessidade de combinação de diferentes auxinas, como no caso de *Psammosilene tunicoides*, em que foi testada a associação de AIB e ácido 1-naftalenoacético (ANA) (MARTIN et al., 2013), e de *Cicer arietinum*, onde as melhores respostas foram alcançadas em meio suplementado com AIB em associação ao ácido 3-indolacético (AIA) ou ao ANA (ISLAM et al., 2005).

A influência do tamanho dos explantes na capacidade de multiplicação das raízes de *C. dendroides* foi avaliada pelo uso de explantes com 0,5 cm, 1,0 cm e 1,5 cm. Em culturas mantidas na presença de luz, este fator não acarretou em diferenças significativas no acúmulo de biomassa, enquanto que para as culturas estabelecidas no escuro, o aumento do tamanho dos explantes foi um fator positivo à proliferação das raízes. O tamanho dos explantes radiculares empregados para o estabelecimento de culturas de raízes nas espécies *C. spinosa* (MORAES, 2015) e *C. rosea* (CORDEIRO et al., 2015) também não influenciou a capacidade de proliferação das raízes em culturas iniciadas por explantes oriundos de plantas propagadas *in vitro* e mantidas na presença de luz. Entretanto, em culturas de raízes de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) iniciadas a partir de explantes de tamanhos semelhantes àqueles utilizados para as culturas de *C. dendroides*, a capacidade de proliferação foi mais eficiente nas culturas iniciadas a partir de segmentos radiculares de 1,5 cm (DE SOUZA et al., 2007).

O estabelecimento das culturas de *C. dendroides* na presença de luz promoveu um maior crescimento quando comparado à manutenção no escuro. A influência da luz nas respostas *in vitro* tem se mostrado bastante diversificada. Em culturas de raízes de *C. spinosa*, iniciadas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas propagadas *in vitro*, a presença de luz promoveu uma maior resposta proliferativa. Já para culturas iniciadas a partir de

explantos obtidos de plantas oriundas de germinação *in vitro*, a manutenção no escuro acarretou em maior acúmulo de biomassa (MORAES, 2015). A ausência de luz também foi mais adequada para o estabelecimento de culturas de raízes das espécies *Cichorium intybus* (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007) e *Eleutherococcus koreanum* (PARK et al., 2005). Por outro lado, protocolos eficientes de culturas de raízes foram estabelecidos para a espécie *C. rosea* na presença de luz (CORDEIRO et al., 2015).

No presente estudo, a redução na concentração de sais minerais totais do meio MS se mostrou mais adequada ao acúmulo de biomassa nas culturas de raízes de *C. dendroides*. A redução da composição salina do meio MS também acarretou um efeito positivo na capacidade de multiplicação de raízes em *Hypericum perforatum* (CUI et al., 2010), *Podophyllum peltatum* (ANBAZHAGAN et al., 2008), *Arnebia hispidissima* (SHEKHAWAT, 2012) e *Cicer arietinum* (ISLAM et al., 2005). Entretanto, um maior acúmulo de biomassa em culturas de raízes estabelecidas em meio MS com a concentração de sais minerais padrão foi obtido em *Boerhaavia diffusa* (JENIFER et al., 2012) e *Gynura procumbens* (SAIMAN et al., 2012). Segundo George e colaboradores (2008), o crescimento e a ramificação das raízes são afetados pela concentração de sais minerais presente no meio de cultura, uma vez que micro e macroelementos possuem papel de sinalizadores e podem influenciar os padrões de desenvolvimento, fato ainda mais evidenciado nas raízes, cuja principal função é a captação de íons. Além disso, o balanço de nitrogênio (íons amônio e nitrato), assim como a quantidade de nitrogênio total afeta as atividades enzimáticas, geralmente de forma inibitória quando em altas concentrações. Uma vez que a concentração total de nitrogênio, bem como de outros nutrientes, no meio MS é mais elevada do que na maioria dos demais meios de cultura empregados no estabelecimento das metodologias *in vitro*, muitas vezes, a redução na concentração de sais minerais total deste meio faz-se necessária para aperfeiçoar as respostas *in vitro* (DUCA, 2015).

A avaliação do efeito da concentração de sacarose no crescimento das culturas de raízes de *C. dendroides* evidenciou um efeito positivo do aumento da concentração. Maiores valores de biomassa foram alcançados na presença de 70 g.L⁻¹. Resultados semelhantes foram obtidos em culturas de raízes de *Echinacea angustifolia* (WU et al., 2006). Entretanto, o

estabelecimento das culturas de raízes de *C. dendroides* na presença de 90 g.L⁻¹ acarretou em redução no crescimento das culturas. A sacarose adicionada ao meio de cultura é fonte primária de energia para a biossíntese e o desenvolvimento dos tecidos, porém também pode atuar como agente de estresse osmótico quando utilizada em altas concentrações (SHOHAEL et al., 2006). A alteração nos níveis de sacarose também tem sido utilizada visando à otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de raízes. Em culturas de *Echinacea angustifolia*, a produção de fenóis e flavonoides foi otimizada na presença de 50 g.L⁻¹ de sacarose (WU et al., 2006), enquanto que em *Hypericum perforatum* a presença de elevadas concentrações de sacarose (50 - 90 g.L⁻¹) se mostrou mais eficiente na indução de substâncias bioativas (CUI et al., 2010).

Para avaliar a influência do pH do meio de cultura na capacidade de proliferação de raízes de *C. dendroides*, inicialmente foi realizado um estudo sobre a influência do processo de esterilização sobre o pH. Os resultados mostraram a ocorrência de redução de $0,64 \pm 0,02$ nos valores de pH após o processo de esterilização do meio de cultura. Essa redução pode ser causada pelas altas temperaturas e pressão às quais os meios são submetidos durante o processo de autoclavagem, e que, provavelmente, propicia a liberação de íons H⁺ pela ionização dos íons amônio presentes no nitrato de amônio, favorecendo assim a diminuição do pH do meio (SKIRVIN et al., 1986).

O aumento do valor de pH do meio mostrou um efeito positivo sobre o crescimento das culturas de raízes de *C. dendroides*. Culturas estabelecidas em meio de cultura com pH inicial de 6,5, equivalendo a valores próximos a 5,8 após o processo de esterilização, apresentaram os maiores valores de massa seca. A influência do pH do meio sobre a capacidade de proliferação de raízes *in vitro* tem sido investigada para algumas espécies (ADAMUCHIO, 2015). Em culturas de raízes de *Catharanthus roseus* o estabelecimento do pH em 6,5 resultou em uma maior capacidade de proliferação dessas culturas (HO; SHANKS, 1992). Para a espécie *Gynura procumbens* o pH ideal para início das culturas de raízes foi de 5,5 (SAIMAN et al., 2012), enquanto que em culturas de raízes de tomateiro o valor foi de 4,9 (CALDAS et al., 1990). Em algumas culturas, como em *Panax ginseng*, embora variações nos

valores do pH inicial do meio de cultura não tenham influenciado a produção de biomassa, acarretaram em alterações no conteúdo de metabólitos secundários (KIM et al., 2011).

A avaliação do efeito da velocidade empregada às mesas agitadoras sobre a capacidade de multiplicação das culturas de raízes de *C. dendroides*, mostrou que a manutenção a 130 rpm resultou em aumento de biomassa. Este resultado demonstra a efetividade da alteração da velocidade de agitação mais frequentemente empregada às culturas estabelecidas em meio líquido e mantidas em mesas agitadoras, que se encontra na faixa de 100 - 110 rpm. A variação na velocidade de agitação causa a incorporação do ar no meio de cultura e esse processo pode favorecer o crescimento das culturas de tecidos sob agitação. Apesar do efeito positivo ao acúmulo de biomassa verificado quando houve aumento da agitação para 130 rpm, o aumento para 160 rpm acarretou na redução da capacidade de proliferação das raízes. Um aspecto importante que pode influenciar de forma negativa o crescimento das culturas mantidas sob agitação é o fato de a movimentação acarretar em injúrias que podem ser causadas aos tecidos pelo impacto contra as paredes do frasco de cultura, ou mesmo pelo atrito entre as células. A essas condições de estresse causadas pelo movimento rotacional aplicado às culturas denomina-se *shear stress* (SOWANA et al., 2001; HAN et al., 2013). A formação de calos também é uma resposta que pode ser acarretada pela manutenção do material em altas velocidades de rotação. O fenômeno foi observado nas culturas de raízes de *C. dendroides* mantidas a 160 rpm e é reportado por Verpoorte e Alfermann (2000) como um fenômeno que pode ocorrer culturas de raízes submetidas a altas velocidades de agitação.

Uma vez determinados os melhores parâmetros para o crescimento das culturas de raízes de *C. dendroides*, essas condições foram reunidas em um único protocolo, aqui denominado de MC. O acúmulo de biomassa alcançado pelas culturas mantidas em MC, demonstrou a eficiência na estratégia de manipular os fatores físicos e químicos envolvidos no cultivo *in vitro*. Estabelecimento de condições de cultura envolvendo a manipulação desses fatores também se mostrou eficiente para o acúmulo de biomassa e produção de metabólitos em culturas de calos produtores de antocianinas da espécie *C. rosea* (SIMÕES et al., 2009) e calos produtores de betalainas da espécie *Pereskia aculeata* (LAGE et al., 2015).

A manutenção das culturas por um período de 90 dias, com a realização de subcultura após dos primeiros 45 dias, mostrou que a condição MC favoreceu o aumento da produção de biomassa nas culturas de raízes de *C. dendroides*, enquanto que as culturas mantidas nas condições padrões do meio MS e de fatores físicos, não apresentaram maior crescimento após a subcultura.

A manutenção da capacidade de multiplicação das raízes, como observado no presente estudo para a condição MC, também foi constatada em culturas estabelecidas com outras espécies do gênero *Cleome*, como em *C. rosea* (CORDEIRO et al., 2015) e *C. spinosa* (MORAES, 2015). Além da própria *C. dendroides* para culturas iniciadas a partir de explantes radiculares oriundos de plantas obtidas por germinação *in vitro* (CASTRO, 2015).

Segundo George e colaboradores (2008), as plantas podem ser organizadas em três categorias em função da facilidade pela qual suas raízes podem ser cultivadas *in vitro*. Para algumas espécies, as raízes apresentam a capacidade de se multiplicar por longos períodos e de forma bastante eficiente. Já para a maior parte das espécies lenhosas, as raízes não se mostram eficazes em serem mantidas em cultura. Esta dificuldade de multiplicação de raízes *in vitro* estaria associada ao fato de muitas espécies lenhosas apresentarem baixa capacidade genética e fisiológica de formar raízes adventícias (PIJUT et al., 2011). A terceira categoria se refere às espécies cujas raízes se multiplicam de forma eficiente sob condições *in vitro*, porém o potencial de multiplicação sofre redução ao longo do tempo em cultura. Segundo Rublo e colaboradores (2002) esta perda da capacidade de regeneração dos explantes ao longo do tempo em cultivo poderia estar relacionada à estabilização das culturas induzida pelas próprias condições *in vitro*, tornando os explantes não responsivos aos reguladores de crescimento que controlam as atividades regenerativas.

A avaliação cromatográfica dos extratos da espécie *C. dendroides* foi realizada pela primeira vez, tanto de plantas obtidas em seu ambiente de ocorrência natural, ou seja, coletadas a campo, como para materiais produzidos *in vitro*. Para a obtenção dos extratos foram empregados dois métodos de extração: a extração por maceração dinâmica e a extração por maceração acelerada por ultrassom. O uso do ultrassom no processo de extração tem recebido maior atenção, em função da simplicidade da técnica, da baixa necessidade de

maquinário específico e também pela possibilidade de utilização para uma grande variedade de massa de amostras (MA et al., 2008). A eficiência desta metodologia pode estar associada ao fato de que a propagação das ondas acústicas acarreta o aumento do estresse mecânico dos tecidos e da permeabilidade das paredes celulares, o que torna este método eficiente, tanto em relação ao tempo do processo, como ao consumo de solventes (TOMA et al., 2001; ROSTAGNO et al., 2009). Por outro lado, o uso da extração por maceração dinâmica, apesar de mais lenta quando comparada à metodologia de extração com uso de ultrassom, pode resultar em maior rendimento, uma vez que nesta metodologia o material biológico é extraído à exaustão pela troca constante do solvente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Para os extratos de *C. dendroides*, a exposição prolongada aos solventes mostrou-se mais efetiva para a extração, uma vez que, para a maior parte dos materiais avaliados, a maceração dinâmica resultou em maiores valores de rendimento de massa. Entretanto, como as análises cromatográficas sinalizaram para um perfil químico semelhante para os extratos obtidos pelas duas técnicas de extração, o método por maceração acelerada pode se mostrar vantajoso, uma vez que requer menor tempo e quantidade de solvente.

Quando foram analisadas as culturas de raízes, chamam a atenção os altos percentuais de rendimento obtidos na extração por maceração dinâmica. Esses valores foram cerca de duas vezes maiores do que aqueles alcançados pelos materiais coletados a campo e obtidos com materiais *in vitro* mantidos em meio de cultura sólido. Essa maior eficiência de extração pode estar relacionada ao fato de que raízes mantidas em meio líquido possuem como característica estrutural a presença de mais espaços intercelulares, o que poderia facilitar a penetração do solvente. Segundo Pasqua e colaboradores (2005), culturas de raízes de *Camptotheca acuminata* apresentaram a formação de espaços intercelulares na região do parênquima cortical, se assemelhando aos aerênquimas de plantas aquáticas. A presença de espaços intercelulares também foi verificada em raízes de *C. rosea* multiplicadas em meio líquido, o mesmo não sendo observado nas raízes das plantas propagadas *in vitro* da espécie, mantidas em meio sólido (CORDEIRO, 2016). Em contrapartida, o rendimento em massa das culturas de raízes extraídas pelo processo de maceração acelerado por ultrassom, alcançaram

os valores percentuais menos expressivos em comparação com os resultados obtidos para os demais materiais avaliados. Neste caso, a pequena quantidade de material pode ter sido um fator limitador à eficiência de um processo de extração que se caracteriza justamente pelo pouco tempo de contato do solvente com o material biológico.

As cromatografias realizadas empregando as técnicas de CCD e CLAE-DAD-UV permitiram sugerir a presença nos extratos de *C. dendroides* de substâncias das classes das saponinas e flavonoides.

As análises em CCD sugeriram a presença de saponinas, principalmente em extratos oriundos de raízes, com destaque para as culturas de raízes. Essas substâncias desempenham importantes funções de defesa contra patógenos, apresentando atividades como antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, inseticida (AUGUSTIN et al., 2011) e antineoplásica (RIBEIRO, 2013). Em muitas espécies, as saponinas são sintetizadas e armazenadas em órgãos subterrâneos, como em *Panax ginseng* (PARK; RHEE; LEE, 2005) e *Glycyrrhiza glabra* (SEKI et al., 2008). Estudos sobre a produção de saponinas em raízes demonstraram a ocorrência dessas substâncias em concentrações muito maiores que em outros órgãos das plantas, como em *Medicago truncatulo*, onde o conteúdo total de saponinas nas raízes foi de cinco a duzentas vezes maior do que em folhas, caules e sementes (HUHMAN; BERHOW; SUMMER, 2005).

Substâncias da classe das saponinas já foram isoladas em espécies do gênero *Cleome*, como em *C. spinosa* (LEAL, et al., 2013), *C. gynandra* (BALA et al., 2011), *C. viscosa* (JANE; PATIL, 2012), *C. rutidosperma* (NWAOGU; UDEBUANI, 2010) e *C. burmanni* (PILLAI; NAIR, 2012).

Uma característica que pode ter influenciado a maior produção de saponinas nos extratos obtidos com as culturas de raízes de *C. dendroides* quando comparados aos extratos das demais fontes de raízes, é o fato de que essas culturas foram estabelecidas em meio líquido, o que permite uma maior absorção dos componentes do meio pelas células vegetais. Além disso, a presença da auxina AIB pode ter influenciado na produção dos metabólitos. Alguns estudos têm relacionado a suplementação com AIB à produção de saponinas em culturas *in vitro*, como em culturas de raízes de *Panax ginseng* (KIM et al., 2003) e em raízes

obtidas em estacas de *Rosmarinus officinalis* (ELHAAK et al., 2015). A associação de AIB com elicitores também tem sido avaliada, como em culturas de raízes de *Panax ginseng*, onde a suplementação conjunta de AIB e metil jasmonato resultou no aumento da produção de ginsenosídeos (KIM et al., 2007).

Os resultados obtidos em CCD para a avaliação da presença de flavonoides não foram conclusivos. Embora a exposição das placas cromatográficas à luz UV tenha resultado em fluorescência de coloração amarelada, característica que identifica substâncias deste grupo, a fluorescência foi observada apenas no ponto de aplicação das amostras ou, em alguns casos, pela formação de rastros. Esses resultados podem sugerir a ocorrência de substâncias fenólicas apresentando duas ou mais moléculas de açúcares, o que conferiria uma característica mais polar e, conseqüentemente, acarretaria em uma maior afinidade pela fase estacionária, não permitindo o carregamento das substâncias e a formação de bandas. Os fatos expostos sinalizam a necessidade de se testar outras metodologias para as avaliações em CCD, como por exemplo, a utilização de placas cromatográficas de fase reversa.

As análises em CLAE-DAD-UV permitiram inferir sobre a presença de substâncias dessa classe de metabólitos na maior parte dos extratos de *C. dendroides*. Segundo Stefona e colaboradores (2003), a CLAE-DAD-UV representa o método de separação e identificação mais usualmente empregado para misturas complexas, como os extratos brutos, e que apresentam substâncias não voláteis, como é o caso das substâncias pertencentes à classe dos flavonoides. Esta classe de metabólitos representa uma grande diversidade de substâncias com atividades medicinais (LAMEIRA 2009; KUMAR; PANDEY, 2013) e já foram identificados em outras espécies do gênero *Cleome*, como em *C. droserifolia* (ABDEL-KADER et al., 2009; FUSHIYA et al., 1999) e *C. gynandra* (BALA et al., 2011).

As análises realizadas em CG com as partições em hexano e diclorometano, não mostraram sinais expressivos. O acoplamento de um método eficiente de separação, como a cromatografia em fase gasosa, com a espectrometria de massas, que fornece informações adicionais sobre a estrutura química das substâncias, é uma ferramenta de análise muito utilizada nos estudos de plantas medicinais (RODRIGUES et al., 2006). Desta forma, a fim de realizar uma avaliação mais conclusiva da presença de substâncias voláteis e termoestáveis

nas amostras de *C. dendroides*, novas condições deverão ser empregadas nas análises em CG, como, por exemplo, a utilização de outros métodos de derivatização (BANNON et al., 1982).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a viabilidade para a produção de culturas *in vitro* de raízes da espécie *C. dendroides*, utilizando como fontes de explantes plantas propagadas *in vitro*, o que poderá propiciar a exploração medicinal da espécie de forma independente de material coletado a campo. Além disso, os resultados obtidos através das análises cromatográficas poderão servir de base para estudos fitoquímicos com a espécie, possibilitando a exploração *in vitro* de metabólitos secundários.

CONCLUSÕES

Quanto aos estudos para definição de um protocolo eficaz para a cultura de raízes:

- ❖ A suplementação com a auxina AIB ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$) foi essencial à multiplicação *in vitro* das raízes;
- ❖ O tamanho dos explantes influenciou a proliferação de raízes apenas para as culturas mantidas no escuro;
- ❖ A presença de luz ampliou a capacidade de proliferação das raízes em cultura;
- ❖ A redução na concentração de sais minerais do meio MS influenciou de forma positiva o crescimento das culturas de raízes;
- ❖ O aumento da concentração de sacarose do meio a 70 g.L^{-1} , influenciou de forma positiva o crescimento das culturas de raízes;
- ❖ O estabelecimento do valor de pH inicial do meio em 6,5 antes da autoclavagem, se mostrou um fator positivo para o crescimento das culturas;
- ❖ A manutenção das culturas sob agitação de 130 rpm resultou em maior acúmulo de biomassa;
- ❖ A estratégia de reunir as melhores condições físicas e químicas em um mesmo protocolo de cultivo (MC) se mostrou eficiente para o aumento da produção de biomassa nas culturas de raízes;
- ❖ Culturas em MC apresentaram aumento de biomassa ao longo do tempo em cultivo.

Quanto aos estudos fitoquímicos:

- ❖ A extração por maceração dinâmica resultou em maiores valores de rendimento de massa;
- ❖ A eficiência da metodologia de extração foi relacionada ao tipo de material vegetal e ao solvente utilizado;
- ❖ As análises em CCD evidenciaram a presença de saponinas, principalmente em extratos de raízes;
- ❖ O cultivo das raízes em meio líquido favoreceu a produção de saponinas;
- ❖ Substâncias da classe dos flavonoides foram evidenciadas nos extratos de *C. dendroides* pelas técnicas cromatográficas empregadas;
- ❖ A composição química dos extratos não apresentou variações significativas em função da técnica de extração empregada, sendo mais influenciada pela polaridade do solvente extrator.

PERSPECTIVAS

Em função dos resultados promissores alcançados no presente trabalho quanto ao acúmulo de biomassa nas culturas de raízes, assim como em função das análises de caracterização química, está sendo dada continuidade aos estudos com *C. dendroides*. Desta forma, encontram-se em andamento:

- ❖ Culturas estabelecidas na condição MC estão sendo acompanhadas e subcultivadas a cada 45 dias, para avaliar a capacidade em longo prazo de acúmulo de biomassa.
- ❖ A partir dos resultados obtidos por CLAE-DAD-UV, novas análises estão sendo realizadas aplicando CLAE-EM visando à identificação de substâncias presentes nos extratos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M.S.; ALQASOUMI, S.I.; AL-TAWEEL, A.M. Hepatoprotective constituents from *Cleome droserifolia*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.57, n.6, p.620-624, 2009.
- ABDULLAHIL, B.; SANG-HYUN, M.; EUN-JUNG L.; JIAN-JIANG Z.; KEE-YOEUP P. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v.30 p.1255–1267. 2012.
- ABOUZID, S.F.; EL-BASSUONY, A.A.; NASIB, A.; KHAN, S.; QURESHI, J.; CHOUDHARY, M.I. Withaferin. A production by root cultures of *Withania coagulans*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.3, n.1, p.23-27, 2010.
- ADAMUCHIO, L.G. **pH do meio de cultura e agentes geleificantes na multiplicação *in vitro* de *Lavandula angustifolia* Miller**, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, f:82 2015.
- ADELBERG, J. Plant growth and sugar utilization in an agitated, thin-film liquid system for micropropagation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.40, p.245–250, 2004.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.
- ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill.(Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4 n.1. p.35-46. 2001.
- ALMEIDA, C.F.C.B.; ALBUQUERQUE, U.Q. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciencia**, v.27, n.6, p.276-285, 2002.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Methods for determination of *in vitro* antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- ANASTÁCIOL, H.; FERNANDES P.; MARISTELA R.; CARNEIROI, P.A.P. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v.41, n.7, p.1136-1142, 2011.
- ANBAZHAGAN, V. R.; AHN, C.H.; HARADA, E.; KIM Y.S.; CHOI, Y.E. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllum peltatum*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, n.44, p.494–501, 2008.

- ANDRAWS, R.; CHAWLA, P.; BROWN, D. L. Cardiovascular effects of ephedra alkaloids: a comprehensive review. **Progress in cardiovascular diseases**, n.47, v.4, p.217-225. 2005.
- ANDREATA, R.H.P.; LIMA, H.C.; VAZ, A.S.F.; BAUMGRATZ, J.F.A.; PROFICE, S.R. Diversity and floristic composition of the vascular plants in the forest fragment in southeastern Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v.2, n.1, p.575-592. 2008.
- APARADH, V.T.; MAHAMUNI, R.J.; KARADGE, B.A. Taxonomy and physiological studies in spider flower (*Cleome* species): A critical review. **Plant Sciences Feed**, v.2, n.3, p.25-46, 2012.
- ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, v.6, p.1-6, 2005.
- AUGUSTIN, J.M.; ANDERSEN, S.B.; BAKS, B. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v.76, n.6, p.435-57. 2011.
- BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, D.A. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. **Molecules**, v.19, n.9, p.13541-13563, 2014.
- BALA, A.; HALDAR, P.K.; KAR, B.; NASKAR, S.; SAHA, P.; KUNDUSEN, S.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K. 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.
- BALA, A.; KAR, B.; HALDAR, P.K.; MAZUMDER, U.K.; BERA, S. Evaluation of anticancer activity of *Cleome gynandra* on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, n.1, p.131-134, 2010.
- BANNON, C.D.; BREEN, G.J.; CRASKE, J.D.; HAI, N.T.; HARPER, N.L.; O'ROURKE, K.L. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. Literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanol of fats and oils. **Journal of Chromatography**, v. 247, p. 71-89, 1982.
- BAQUE, M.A.; MOH, S.H.; LEE, E.J.; ZHONG, J.J.; PAEK, K.Y. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology advances**, v.30, p.1255-1267, 2012.
- BERNARDI, W.F.; RODRIGUES, B.I.; NETO, P.C.; ANDO, A.; NETO, A.T.; CERAVOLO, L.C.; MONTES, S.M.N.M. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p.503-506, 2004.
- BOSE, U.; BALA, V.; GHOSH, T.N.; GUNASEKARAN, K.; RAHMAN, A.A. Antinociceptive, cytotoxic and antibacterial activities of *Cleome viscosa* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.1, p.165-169, 2011.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília:ABCTP/Embrapa-CNPH, p.37-70. 1990.

CANHOTO, J.M. **Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 407 p., 2010.

CASTRO, T.C.C. **Produção de plantas e metabólitos de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) utilizando diferentes sistemas de cultivo *in vitro***. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

CASTRO, T.C.C.; SIMÕES-GURGEL, C.; RIBEIRO, I.G.; COELHO, M.G.P.; ALBARELLO, N. Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and *in vivo* and *in vitro* germination of species of the genus *Cleome*. **Journal of Seed Science**, v.36, n.3, p.326-335, 2014.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, A. F. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. *Rev Bras Farmacogn*, v. 19, n. 2B, p. 586-591, 2009

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v.21 n.1, p.99-105. 1998.

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

CORDEIRO, L.S. **Criopreservação de ápices caulinares e raízes produzidos *in vitro* e avaliação fitoquímica de *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae)**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

CORDEIRO, LS.; SIMÕES-GURGEL, C.; ALBARELLO, N. Multiplication and cryopreservation of adventitious roots of *Cleome rosea* Vahl. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, p. 249-257, 2015.

COSTA E SILVA, M.B. **O gênero *Cleome* L. (Capparaceae Juss.) para o Brasil**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Botânica - Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Pernambuco. p.153, 2000.

CUI, X.; CHAKRABARTY, D.; LEE, E.; PAEK, K. 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.; PATRA, A.; MANDAL, S.; MALLICK, B.; DAS, A.; CHATTERJEE, A. Cleogynol, a novel dammarane triterpenoid from *Cleome gynandra*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p.616-618, 1999.

- DAXENBICHLER, M.E.; SPENCER, G.F.; CARLSON, D.G.; ROSE, G.B.; BRINKER, A.M.; POWELL, R.G. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.2623-2638, 1991.
- DE OLIVEIRA, A.R.M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v.32 n.5, 2009.
- DE SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; DA SILVA, L.C.; FERRI, J.; SOARES, G.C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugeniauniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociencia**, v.13 n.1 p.115-118, 2007.
- DE UGAZ, O. L. Productos naturales: importancia y perspectivas. **Revista de Química**, v.1 n.1 p.49-54, 2017.
- DI STASI, L.C. Plantas medicinais da medicina popular no município de Botucatu-SP. **XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Fortaleza, p.320, 1994.
- DUCA, M. **Plant Physiology**. University of Academy of Sciences of Moldova: Springer. v1-315. 2015.
- ELHAAK, M.A.; MATTER, M.Z.; ZAYED M.A.; GAD, D.A. Propagation Principles in Using Indole-3-Butyric Acid for Rooting Rosemary Stem Cuttings. **Journal of Horticulture**. v.2, n.1, p.2-13, 2015.
- FAHEY, J.W.; ZALCMANN, A.T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v.56, p.5-51, 2001.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Beasil. 5ª edição. Brasília: Anvisa, 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, n.6, p.2086-2095, 2014.
- FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (eds). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. p.101-122, 2002.
- FRANKLIN, G.; SHEEBA, C.J.; LAKSHMI SITA, G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.40, p.188-191, 2004.

- FUSHIYA, S.; KISHI, Y.; HATTORI, K.; BATKHUU, J.; TAKANO, F.; SINGAB, A.N.B.; OKUYAMA, T. Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress no production in activated macrophages *in vitro*. **Planta Medica**, n.65, p.404-407, 1999.
- GANDHI, S. G., MAHAJAN, V., BEDI, Y. S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 303-317, 2015.
- GAO, X.; ZHU, C.; JIA, W.; GAO, W.; QIU, M.; ZHANG, Y.; XIAO, P. Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of *Panax ginseng*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1771-1775, 2005.
- GAO, Y.; GAO, H.; CHAN, E. Antitumor activity and underlying mechanisms of ganopoly, the refined polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*, in mice. **Immunological investigations**, v.34 p.171–98. 2005.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE CLERK, G.J. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition. Vol. 1. Springer, The Netherlands, 2008.
- GOEL, M.K.; 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**, v.96, p.1-9, 2009.
- GONZÁLEZ-TEUBER M.; HEIL M. Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. **Plant Signaling and Behavior**, v.4, p.809–813, 2009.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; ALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa - SPI / Embrapa CNPH, v. 1, p. 183-260. 1998.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia** – LFDGV/CCA/UFSC. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 41p. 2006.
- GUPTA, N.K.; DIXIT, V.K. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cleome viscosa* Linn. extract. **Indian Journal of Pharmacology**, v.41, n.1, p.36-40, 2009.
- HALKIER, B.A.; GERSHENZON, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. **Annual Review Plant Biology**, v.57, p.303-333, 2006.
- HAN, P.-P.; YE T.-X.; QUIAO B.; YUAN Y.-J. Taxoids profiling of suspension *Taxus chinensis* var. *mairei* cells in response to shear stress. **Biochemical Engineering Journal**. n.77, p.66– 73, 2013
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. Ed. 6. Prentice-Hall, 1997.
- HEBBAR, S.S.; HARSHA, V.H.; SHRIPATHI, V.; HEDGE, G.R. Ethnomedicine of Dharwad district in Karnataka, India - Plants used in oral health care. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.261-266, 2004.

- HENKES, J. A. Ética ambiental e tecnologias aplicáveis ao desenvolvimento sustentável. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v.5, n.1, p.1-4, 2016.
- HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.
- HO, C.H.; SHANKS, J.V. Effects of initial medium pH on growth and metabolism of *Catharanthus roseus* hairy root cultures - A study with ³¹P and ¹³C NMR spectroscopy. **Biotechnology letters**, v.14, n.10, p.959-964, 1992.
- HOOKER, W.J. *Cleome dendroides*. In: Curtis, S. (Ed.) **Botanical Magazine**. T. 3296. 1834.
- HUHMANN, D. V.; BERHOW, M. A.; SUMNER, L. W. Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of *Medicago truncatula*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.53 n.6, p.1914-1920 2005.
- HUSSAIN, A.; QARSHI, I.A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A., RINALDI, L.M.R. **Recent advances in plant in vitro culture**. 1st edition. InTech, Croatia, 210p. 2012.
- ILTIS, H.H.; HALL, J.C.; COCHRANE, T.S.; SYTSMA, K.J. Studies in the Cleomaceae I. On the separate recognition of Capparaceae, Cleomaceae, and Brassicaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.98, p.28–36, 2011.
- ISLAM, M.A.; ZUBAIR, H.; IMTIAZ, N.; CHAUDHA, M.F. Effect of different plant growth regulators for the economical production of *in vitro* root cultures of *Cicer arietinum* L. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.7, n.4, 2005.
- JAMDHADE-VIJAY, C.; BALKHANDE-SHRIVARDHAN, C.; SURWASE-BABASAHEB, S. Establishment and analysis of *in vitro* fast-growing normal root culture of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn: a substitute for commercial liquorice. **Research Journal of Biotechnology**, v.7, n.4, 2012.
- JANE, R.R.; PATIL, S.D. *Cleome viscosa*: an effective medicinal herb for otitis media. **Intentional Journal Natural Science**, v.3, n.1, p.153-158, 2012.
- JENIFER, U.; FRANCINA-CECILIA, K.; RAVINDHRAN, R. *In vitro* adventitious root and hairy root cultures in *Boerhaavia diffusa* L. **International Journal of Current Research**, v.4, n.1, p.65-67, 2012.
- JIMENEZ-GARCIA, S.N.; VAZQUEZ-CRUZ, M.A.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; TORRES-PACHECO, I.; CRUZ-HERNANDEZ, A.; FEREGRINO-PEREZ, A.A. Current Approaches for Enhanced Expression of Secondary Metabolites as Bioactive Compounds in Plants for Agronomic and Human Health Purposes – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.63, n.2, p.67-78, 2013.
- JUNIOR-VEIGA, F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

- KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.3, n.13, p.1222-1239, 2009.
- KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**, v.29, n.6, p.267–275, 2011.
- KIM, Y.; YEUNG, E.C.; HAHN, E.; PAEK, K. Combined effects of phytohormone, Indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. **Biotechnology Letters** v.29 p.1789-1792, 2007.
- KIM, Y.S.; HAHN, E.J.; YEUNG, E.C.; PAEK, K.Y. Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant** v. 39, p.245–249, 2003.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. ‘Grande Naine’). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.141-145, 1999.
- KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation**. Springer, Netherlands, p.447-469, 1991.
- KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**. (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>), 2013.
- KYOSHABIRE, M.; KATUURA, E.; CUNNINGHAM, A.B.; HOEFT, R. Medicinal plants and herbalist preferences around Bwindi Impenetrable National Park. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.11, n.8, p.161-170, 2017.
- LAGE, D.A.; TIRADO, M.S.; VANICORE, S.R.; SABINO, K.C.C.; ALBARELLO, N. Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.122, n.2, p.341-350, 2015.
- LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.7-11, 2009.
- LEAL, R.D.S.; MACIEL, M.A.M.; DANTAS, T.N.C.; MELO, M.D.; PISSINATE, K., ECHEVARRIA, A. Perfil etnobotânico e atividade antioxidante de *Cleome spinosa* (Brassicaceae) e *Pavonia varians* (Malvaceae). **Revista Fitos Eletrônica**, v.3, n.3, p.25-31, 2013.
- LEMOS, E.E.P. Organogênese. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa. p.303, 2010.
- LUDWIG-MÜLLER, J.; VERTOCNIK, A.; TOWN, C.D. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis stem* segments. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.418, p.2095-2105, 2005.

- MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of *Sastsuma mandarin* (*Citrus unshiu* Marc.) peels. **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.5682-90, 2008.
- MACIEL, J. R.; CORNEJO, X.; MARQUES, J. S. Cleomaceae in Lista de Espécies da Flora da Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB121872>).
- MARTIN, K. P.; ZHANG, C. L.; HEMBROM, M. E.; SLATER, A.; MADASSERY, J. Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an anticancer drug) and rapid propagation. **Plant Biotechnology Reports**, v.2, p.163-169, 2008.
- MARTIN, S. M.; ROSE, D. Growth of plant cell (Ipomoea) suspension cultures at controlled pH levels. **Canadian Journal of Botany**, v.54, n.11, p.1264-1270, 1976.
- MARTINS, E. R. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Imprensa Universitária. MG, 220p. 1994.
- MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort.(Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, v.22, n.2, p.323-332. 2008.
- MERCY, S.; SANGEETHA, N.; GANESH, D. *In vitro* production of adventitious roots containing asiaticoside from leaf tissues of *Centella asiatica* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.48, p.200-207, 2012.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> Acesso em: 03 de Agosto de 2017.
- MORAES, B.A. Estabelecimento de cultura de raízes *in vitro* e avaliação da produção de metabólitos secundários de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae), **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Rio de Janeiro 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURTHY, H. N.; HAHN, E. J.; PAEK K.Y. Adventitious roots and secondary metabolism. **China Journal Biotechnology**, v.24, p.711-716, 2008.
- MURTHY, H.N.; DANDIN, V.S.; PAEK, K.Y. Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. **Phytochemistry Reviews**, v.15, p.129-145, 2016.
- NAGARAJAN, A.; ARIVALAGAN, U.; RAJAGURU, P. *In vitro* root induction and studies on antibacterial activity of root extract of *Costus igneus* on clinically important human pathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.1, n.4, p.67-76, 2011.
- 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.

- NARENDHIRAKANNAN, R.T.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cleome gynandra* L. leaf extract on acute and chronic inflammatory arthritis studied in rats. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.2, n.1, p.44-53, 2007.
- NARENDHIRAKANNAN, R.T.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. Free radical scavenging activity of *Cleome gynandra* L. leaves on adjuvant induced arthritis in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.276, p.71-80, 2005.
- NEGI, J.S.; NEGI, P.S.; PANT, G.J.; RAWAT, M.S.M.; NEGI, S.K. Naturally occurring saponins: Chemistry and Biology. **Journal of Poisonous and Medicinal Plant**, v.1, p.006-011. 2013.
- NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L.(alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, 26(3), 331-334. 2003
- NWAOGU, L.A.; UDEBUANI, A.C. Effect of processing on the nutritional and toxicological components of *Cleome rutidosperma* seed. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.2, 2010.
- PARK, S. Y.; AHN, J. K.; LEE, W. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant science**, v. 168, n. 5, p. 1221-1225, 2005.
- PARK, J.D.; RHEE, D.K.; LEE, Y. H. Biological activities and chemistry of saponins from *Panax ginseng* CA Meyer. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, n. 2, p. 159-175, 2005.
- PASQUA, G.; MONACELLI, B.; VALLETTA, A.; SANTAMARIA, A.R.; FIORILLO, F. Synthesis and/or accumulation of bioactive molecules in the *in vivo* and *in vitro* root. **Plant Biosystems**, v.139, n.2, p.180-188, 2005.
- PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, v.1, 74 p, 2001.
- PEDROSO, K.; WATZLAWICK, L.F.; OLIVEIRA, N.K.; VALERIO A.F.; GOMES, G.S.; SILVESTRE, R. Levantamento de plantas medicinais arbóreas e ocorrência em Floresta Ombrófila Mista. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.3 n.1, 2007.
- PIJUT, P.M.; WOESTE, K.E.; MICHLER, C.H. Promotion of Adventitious Root Formation of Difficult-to-Root Hardwood Tree Species. **Horticultural Reviews**, n.38, p.213, 2011.
- PILLAI, L.S.; NAIR, B.R. Pharmacognostical standardization and phytochemical studies in *Cleome viscosa* L. and *Cleome burmanni* W. & A.(Cleomaceae). **Journal of Pharmacy Research**, v.5, n.2, p.1231-1235, 2012.
- RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, p.101-153, 2002.

RAVEN, P., EVERT, R., EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. 8ª edição, Editora Guanabara Koogan, 2014.

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, R.V.; PATRÃO, A. P.; BORGES, L.; CHIERRITO, T.P.C.; SOUTO, E.R.; SOUZA, L.M.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, A.J.B.; GONÇALVES, R.A.C. Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.106, p.329-335, 2011.

RIBEIRO, I.G. **Produção *in vitro*, análise fitoquímica e avaliação da atividade antineoplásica de metabólitos de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) obtidos por diferentes estratégias biotecnológicas**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013

RODRIGUES, M.V.N.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; JÚNIOR, S.B.; SANTOS A.S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiência**. (www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_07_7.pdf), 2006.

RON, M.; KAJALA, K.; PAULUZZI, G.; WANG, D.; REYNOSO, M. A.; ZUMSTEIN, K.; FEDERICI, F. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. **Plant physiology**, v.166, n.2, p.455-469, 2014.

ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J.A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.2-29, 2009.

RUBLUO, A.; MARÍN-HERNÁNDEZ, T.; DUVAL, K.; VARGAS, A.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J. 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.; MUSTAFA, N.R.; SCHULTE, A.E.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H. 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, n.3, p.465-475, 2012.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.

SANTOS, R.L.; SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.486-91, 2011.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.

Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2004.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M.R.; SUZUKI, R.M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Ceres**, v.59, 2015.

SEKI, H.; OHYAMA, K.; SAWAI, S.; MIZUTANI, M.; OHNISHI, T.; SUDO, H.; MURANAKA, T. Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105 n.37, p.14204-14209, 2008.

SHEKHAWAT, M. S. Root cultures and *in vitro* production of alkanin in *Arnebia hispidissima* (lehm).dc. **International Journal of Recent Scientific Research**, v.3, n.5, p.374-377, 2012.

SHOHAEL, A.M.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; YU, K.W.; HAHN, E.J.; LEE, H.L.; PAEK, K.Y. Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. **Process Biochemical**, v.41, p.512-518, 2006.

SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; CASTRO, T.C.; MANSUR, E. 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, 2009.

SIMÕES, C.; BIZARRI, C.H.B.; CASTRO, T.C.; COUTADA, L.C.M.; SILVA, A.J.R.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiology Biochemical**, v.47, p.895-903, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.

SINGH, B.; SHARMA, R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v.5 n.2, p.129-151, 2015

SINGH, V.K.; ALI, Z.A. Folk medicine in primary health care: common plants used for the treatment of fevers in India. **Fitoterapia**, v.65, n.1, p.68-74, 1994.

SINGH, Y.N. Tradicional medicine in Fiji: some herbal folk cures used by Fiji indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.15, p.57-60, 1986.

SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v.5, n.4, p.292-294, 1986.

SOWANA, D.D.; WILLIAMS, D.R.G.; DUNLOP, E.H.; DALLY, B.B.; O'NEILL, B.K.; FLETCHER, D.F. Turbulent shear stress effects on plant cell suspension cultures. **Chemical Engineering Research and Design**, v.79, n.8, p.867-875, 2001.

- STEFONA, M.; STAFILOV, T.; KULEVANOVA, S. HPLC analysis of flavonoids. In: **Encyclopedia of Chromatography**. Marcell Dekker Inc., New York. p. 1-7, 2003.
- STREET, H.E.; SHEAT, D.E.G. The absorption and availability of nitrate and ammonia. In: **Der Stickstoffumsatz/Nitrogen Metabolism**. Springer Berlin Heidelberg, p.150-165, 1958.
- SURH, Y.J.; KIM, H.J. Neurotoxic effects of tetrahydroisoquinolines and underlying mechanisms. **Experimental Neurobiology**, v.19 n.2, p.63-70, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TEIXEIRA, J.B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. **Biociência**, n.24, janeiro/fevereiro, 2002.
- TEIXEIRA, J.B.; CID, L.P.B. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. In: CID, L.P.B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embapa. 303p. 2010.
- TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.
- THORPE, T.A. History of Plant Cell Culture. In: SMITH, R.H. **Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments**. Academic Press, Third Edition. p.188, 2012.
- TIWARI, V.J.; PADHYE, M.D. Ethnobotanical study of fond tribe of Chandrapur and Gadchiroli districts of Maharashtra State, India. **Fitoterapia**, v.64, n.1, p.60, 1993.
- TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNKY, L.; MASON, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v.8, n.2, p.137-142, 2001.
- VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A.W. **Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- VILELLA, T.; ANDRADE, B.S.B.; UACY, M.; NORD, N.; SILVA, C.A.F. Plantas medicinais e tóxicas. **III Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, os desafios do novo milênio**. 2000.
- VIÑA, G.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLLB, S.P.; MITCHELLB, V.J.; PARRYB, M.A.; LAWLORB, D.W. Effect of CO₂, and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, n.7/8, p.587-595, 1999.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2.ed. Germany: Springer, 2001.
- WANG, Y.C.; HUANG, T.L. Anti-Helicobacter pylori activity of *Plumbago zeylanica*. **Immunology and Medical Microbiology**, v.43, p.407-412, 2005.
- WU, C.H.; DEWIR, Y.H.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. 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.
- YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, v.19, n.4, p.691- 699, 1978.

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.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.

APÊNDICE A - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir dos materiais coletados a campo

Extração por maceração dinâmica.

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	14,315	167905	0,80
2	15,456	1647495	7,89
3	17,333	54156	0,26
4	18,048	44303	0,21
5	19,669	44772	0,21
6	21,408	109854	0,53
7	22,027	73723	0,35
8	22,624	425434	2,04
9	22,816	769195	3,68
10	23,307	368383	1,76
11	23,701	118334	0,57
12	24,075	4159861	19,92
13	24,384	2251709	10,78
14	24,960	967731	4,63
15	25,536	505732	2,42
16	25,952	4705809	22,53
17	26,336	1336259	6,40
18	26,752	530496	2,54
19	27,456	25129	0,12
20	28,491	159568	0,76
21	30,261	407779	1,95
22	30,645	77949	0,37
23	31,904	237181	1,14
24	73,248	186292	0,89
25	76,992	117069	0,56
26	78,731	871811	4,17
27	79,008	520655	2,49
Total		20884584	100,00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	6,155	198801	1,52
2	15,211	1841667	14,10
3	17,451	88443	0,68
4	19,083	29249	0,22
5	20,427	18654	0,14
6	20,661	30265	0,23
7	20,992	350923	2,69
8	21,835	279726	2,14
9	22,016	619232	4,74
10	22,539	234612	1,80
11	23,317	2754227	21,08
12	23,616	1753791	13,42
13	24,213	446166	3,42
14	25,141	2533295	19,39
15	25,536	925793	7,09
16	26,005	160030	1,22
17	27,808	76740	0,59
18	29,611	131121	1,00
19	29,781	58351	0,45
20	31,381	67603	0,52
21	70,677	68507	0,52
22	73,269	296900	2,27
23	76,661	99927	0,76
Total		13064023	100,00

APÊNDICE B - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir da partição em hexano de folhas de plantas coletadas a campo.

Extração por maceração dinâmica.

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	14.005	53413	28.24
2	22.784	21573	11.40
3	47.189	27842	14.72
4	49.771	18756	9.92
5	50.325	15525	8.21
6	53.152	40530	21.43
7	53.344	11522	6.09
Total		189161	100.00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	47.573	19216	8.61
2	49.867	18074	8.10
3	52.971	27432	12.29
4	53.301	39216	17.57
5	55.925	119305	53.44
Total		223243	100.00

APÊNDICE C - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir da partição em diclorometano de folhas de plantas coletadas a campo.

Extração por maceração dinâmica.

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	15.125	49185	0.51
2	17.323	30590	0.31
3	18.133	1963523	20.20
4	21.056	32476	0.33
5	21.931	87221	0.90
6	24.405	28488	0.29
7	27.403	96602	0.99
8	29.120	98915	1.02
9	31.019	403650	4.15
10	32.619	78134	0.80
11	33.973	64934	0.67
12	34.709	63560	0.65
13	35.925	27047	0.28
14	38.208	59785	0.61
15	39.701	58904	0.61
16	39.979	25933	0.27
17	40.693	75811	0.78
18	41.632	78849	0.81
19	43.413	83051	0.85
20	44.021	89233	0.92
21	45.451	476426	4.90
22	46.197	50439	0.52
23	46.464	14322	0.15
24	46.944	96616	0.99
25	47.808	58969	0.61
26	48.288	463660	4.77
27	48.651	31504	0.32
28	50.784	35250	0.36
29	51.104	28004	0.29
30	52.384	131773	1.36
31	52.800	58303	0.60
32	52.992	130497	1.34
33	53.301	1133165	11.65
34	53.792	32879	0.34
35	54.805	2117968	21.78
36	55.029	107589	1.11
37	55.232	20253	0.21
38	55.488	58703	0.60
39	55.936	1159479	11.93
40	56.405	20917	0.22
Total		9722607	100.00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	18.251	547256	27.18
2	31.125	121391	6.03
3	33.077	41500	2.06
4	34.869	20028	0.99
5	40.715	12875	0.64
6	41.333	13041	0.65
7	41.557	27389	1.36
8	43.456	35667	1.77
9	45.376	144627	7.18
10	46.283	22682	1.13
11	48.256	194609	9.66
12	51.051	9564	0.47
13	52.341	38915	1.93
14	52.736	50390	2.50
15	52.917	40899	2.03
16	53.291	123860	6.15
17	54.741	389314	19.33
18	54.987	59786	2.97
19	55.424	18668	0.93
20	55.893	101086	5.02
Total		2013547	100.00

APÊNDICE D - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir da partição em acetato de etila de folhas de plantas coletadas a campo.

Extração por maceração dinâmica

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	18.848	2774181	19.91
2	30.368	342002	2.45
3	32.608	3272221	23.48
4	33.109	2249523	16.14
5	35.573	3909918	28.06
6	36.149	1163841	8.35
7	38.453	140273	1.01
8	40.896	81649	0.59
Total		13933608	100.00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	18.848	2774181	19.91
2	30.368	342002	2.45
3	32.608	3272221	23.48
4	33.109	2249523	16.14
5	35.573	3909918	28.06
6	36.149	1163841	8.35
7	38.453	140273	1.01
8	40.896	81649	0.59
Total		13933608	100.00

APÊNDICE E - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir do resíduo aquoso de folhas de plantas coletadas a campo.

Extração por maceração dinâmica.

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	5,493	503011	0,73
2	6,336	5271770	7,66
3	15,029	3045533	4,43
4	16,928	55789	0,08
5	17,451	412714	0,60
6	20,565	327541	0,48
7	20,832	275462	0,40
8	21,237	697343	1,01
9	22,005	2804228	4,08
10	22,240	2018285	2,93
11	22,720	522844	0,76
12	23,531	12180892	17,71
13	23,829	10692341	15,54
14	24,395	2327415	3,38
15	24,715	358260	0,52
16	25,355	14732682	21,42
17	25,781	5414286	7,87
18	26,219	2268816	3,30
19	27,253	887915	1,29
20	28,032	1510015	2,19
21	29,739	437579	0,64
22	29,899	518908	0,75
23	30,272	826797	1,20
24	30,901	134575	0,20
25	31,221	211794	0,31
26	31,424	206883	0,30
27	31,712	41133	0,06
28	31,947	74431	0,11
29	56,555	34515	0,05
Total		68793757	100,00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	6,133	1504304	16,85
2	15,435	561627	6,29
3	17,195	27855	0,31
4	17,867	18599	0,21
5	20,960	138909	1,56
6	21,621	62563	0,70
7	22,208	521188	5,84
8	22,368	641242	7,18
9	22,901	211747	2,37
10	23,701	1908521	21,38
11	24,043	822388	9,21
12	24,565	241178	2,70
13	25,141	309611	3,47
14	25,547	1002144	11,23
15	25,931	228843	2,56
16	26,389	446133	5,00
17	28,075	280221	3,14
Total		13933608	100.00

APÊNDICE F - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir de partes aéreas de plantas *in vitro* de *C. dendroides*

Extração por maceração dinâmica.

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	15,115	224184	1,43
2	19,723	255700	1,63
3	20,363	146290	0,93
4	20,661	244259	1,55
5	21,024	312580	1,99
6	21,280	268027	1,71
7	21,877	1668514	10,62
8	22,037	3401187	21,65
9	22,592	525309	3,34
10	23,221	1291029	8,22
11	23,403	2532031	16,11
12	23,669	1345851	8,57
13	24,256	172693	1,10
14	25,237	1511928	9,62
15	25,653	1043877	6,64
16	26,645	38168	0,24
17	29,408	75530	0,48
18	29,611	143077	0,91
19	54,976	39810	0,25
20	73,408	57635	0,37
21	76,053	301802	1,92
22	76,672	113155	0,72
Total		15712636	100,00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	11,808	25798	0,41
2	14,293	12671	0,20
3	15,157	21960	0,35
4	15,531	223693	3,59
5	18,229	11499	0,18
6	19,861	126904	2,04
7	20,533	54573	0,88
8	20,768	96601	1,55
9	21,131	76853	1,23
10	21,365	133250	2,14
11	21,963	471228	7,57
12	22,112	900138	14,46
13	22,667	209767	3,37
14	23,328	581409	9,34
15	23,520	934339	15,01
16	23,787	344334	5,53
17	24,405	38419	0,62
18	25,461	516096	8,29
19	25,941	436877	7,02
20	27,541	17580	0,28
21	28,448	41871	0,67
22	29,227	59660	0,96
23	29,525	55403	0,89
24	30,709	39385	0,63
25	46,923	32943	0,53
26	49,920	35854	0,58
27	50,155	17098	0,27
28	55,051	75097	1,21
29	69,248	101730	1,63
30	69,653	139398	2,24
31	73,493	156582	2,51
32	73,792	31725	0,51
33	74,112	82889	1,33
34	74,731	23633	0,38
35	76,693	99217	1,59
Total		6226474	100,00

APÊNDICE G - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir de etanólicos brutos raízes de plantas *in vitro* de *C. dendroides*.

Extração por maceração dinâmica.

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	4,043	54590	0,59
2	7,189	55976	0,61
3	12,971	228671	2,48
4	16,341	168914	1,83
5	23,285	3984533	43,24
6	24,107	893657	9,70
7	24,821	1228650	13,33
8	25,408	396712	4,31
9	25,632	601469	6,53
10	26,336	394147	4,28
11	26,688	200030	2,17
12	27,147	67373	0,73
13	27,371	65478	0,71
14	28,235	32929	0,36
15	30,933	30428	0,33
16	32,789	94883	1,03
17	75,328	146172	1,59
18	77,483	345565	3,75
19	78,155	224892	2,44
Total		9215069	100,00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	4,043	54590	0,59
2	7,189	55976	0,61
3	12,971	228671	2,48
4	16,341	168914	1,83
5	23,285	3984533	43,24
6	24,107	893657	9,70
7	24,821	1228650	13,33
8	25,408	396712	4,31
9	25,632	601469	6,53
10	26,336	394147	4,28
11	26,688	200030	2,17
12	27,147	67373	0,73
13	27,371	65478	0,71
14	28,235	32929	0,36
15	30,933	30428	0,33
16	32,789	94883	1,03
17	75,328	146172	1,59
18	77,483	345565	3,75
19	78,155	224892	2,44
Total		9215069	100,00

APÊNDICE H - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir de cultura de raízes de *C. Dendroides* mantidas em condição controle.

Extração por maceração dinâmica.

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	5,365	160717	11,86
2	6,656	101331	7,48
3	10,635	40529	2,99
4	15,061	19914	1,47
5	15,371	47304	3,49
6	20,235	14416	1,06
7	22,699	20447	1,51
8	23,477	28619	2,11
9	41,259	34697	2,56
10	43,040	45743	3,38
11	44,992	46694	3,45
12	46,539	10681	0,79
13	52,181	32795	2,42
14	54,997	26871	1,98
15	55,317	44820	3,31
16	56,373	37913	2,80
17	68,789	31174	2,30
18	76,715	610030	45,03
Total		1354695	100,00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	4,267	48869	1,02
2	5,696	887830	18,47
3	6,667	13039	0,27
4	9,323	199835	4,16
5	9,653	67582	1,41
6	10,571	88690	1,85
7	11,008	58840	1,22
8	11,691	73464	1,53
9	11,883	22413	0,47
10	12,469	59332	1,23
11	13,003	156609	3,26
12	13,344	63259	1,32
13	13,621	15326	0,32
14	13,963	84960	1,77
15	14,304	42410	0,88
16	14,709	83919	1,75
17	14,955	302877	6,30
18	15,221	122643	2,55
19	15,669	143022	2,98
20	16,085	29690	0,62
21	16,949	23417	0,49
22	17,312	121949	2,54
23	19,008	25943	0,54
24	19,680	26841	0,56
25	20,160	58910	1,23
26	20,789	58063	1,21
27	21,077	20286	0,42
28	21,461	42681	0,89
29	21,760	13122	0,27
30	21,973	11202	0,23
31	22,667	44379	0,92
32	23,253	21834	0,45
33	23,488	35432	0,74
34	24,427	52650	1,10
35	28,469	16525	0,34
36	32,149	19437	0,40
37	41,365	46636	0,97
38	43,147	46280	0,96
39	43,957	18954	0,39
40	45,088	45620	0,95
41	46,656	12357	0,26
42	52,267	39200	0,82
43	53,205	15153	0,32
44	53,664	26817	0,56
45	54,656	20430	0,43
46	55,061	72774	1,51
47	55,392	130687	2,72
48	55,925	11013	0,23
49	56,448	99005	2,06
50	68,875	187132	3,89
51	69,504	63425	1,32
52	71,680	30107	0,63
53	76,789	746155	15,52
54	77,312	37309	0,78
Total		4806334	100,00

APÊNDICE I - Tabelas referentes às áreas relativas dos sinais gerados nos cromatogramas obtidos a partir de cultura de raízes de *C. Dendroides* submetidas a condição MC.

Extração por maceração dinâmica.

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	5,291	100864	9,99
2	6,603	335554	33,24
3	10,581	17511	1,73
4	15,317	7222	0,72
5	20,299	8748	0,87
6	22,837	8041	0,80
7	23,605	19048	1,89
8	25,365	11918	1,18
9	27,936	11832	1,17
10	41,440	16166	1,60
11	43,221	20012	1,98
12	45,141	21145	2,09
13	52,309	17940	1,78
14	55,104	29438	2,92
15	55,424	34740	3,44
16	56,469	34380	3,41
17	68,928	14115	1,40
18	76,864	300845	29,80
Total		1009519	100,00

Extração por maceração acelerada por ultrassom

	Tempo de retenção	Área	Área relativa (%)
1	4,117	38785	1,52
2	4,277	35057	1,37
3	5,483	268019	10,50
4	5,771	165785	6,49
5	6,069	30994	1,21
6	8,160	138732	5,43
7	9,397	134043	5,25
8	9,739	52477	2,06
9	10,635	76406	2,99
10	13,408	16579	0,65
11	14,059	91896	3,60
12	14,571	84947	3,33
13	14,773	58374	2,29
14	15,093	117780	4,61
15	15,296	102650	4,02
16	15,893	99301	3,89
17	16,149	27621	1,08
18	17,408	110659	4,33
19	20,139	92166	3,61
20	20,779	28766	1,13
21	21,067	43714	1,71
22	23,253	21297	0,83
23	23,467	49810	1,95
24	24,416	31623	1,24
25	27,808	13899	0,54
26	32,107	12145	0,48
27	35,605	15160	0,59
28	55,104	65885	2,58
29	55,435	80101	3,14
30	56,491	54415	2,13
31	68,928	25740	1,01
32	76,832	367933	14,41
Total		2552759	100,00