

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA - PPGAq

**PRODUÇÃO DE SOLASODINA ATRAVÉS DO CULTIVO
IN VITRO DE PLÂNTULAS E CALOS DE *Solanum*
aculeatissimum Jacq. (JUÁ BRAVO)**

Autora: Luciana Arantes Dantas
Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Dr. Lucas Anjos de Souza

Rio Verde – GO
Fevereiro– 2016

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA - PPGAq

**PRODUÇÃO DE SOLASODINA ATRAVÉS DO CULTIVO
IN VITRO DE PLÂNTULAS E CALOS DE *Solanum*
aculeatissimum Jacq. (JUÁ BRAVO)**

Autora: Luciana Arantes Dantas
Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde - Área de concentração “Agroquímica Orgânica”.

Rio Verde – GO
Fevereiro– 2016

D192p Dantas, Luciana Arantes
Produção de solasodina através do cultivo *in vitro* de plântulas e calos de *Solanum aculeatissimum* Jacq. (Juá Bravo) / Luciana Arantes Dantas.
– Rio Verde. – 2016.
79f : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano –
Câmpus Rio Verde, 2016.
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

Bibliografia

1. Cinetina. 2. Elicitação. 3. Alcalóide esteróide. I. Título.
2. II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

CCD-631.962

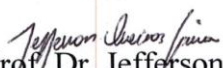
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

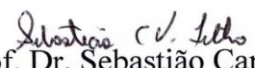
**PRODUÇÃO DE SOLASODINA ATRAVÉS DO
CULTIVO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS E CALOS DE
Solanum aculeatissimum Jacq. (JUÁ BRAVO)**

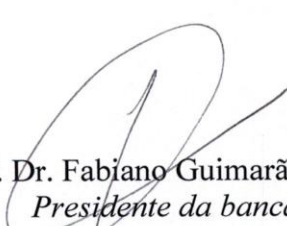
Autora: Luciana Arantes Dantas
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2016.


Prof. Dr. Jefferson Queiroz
Lima
Avaliador externo
IFCE


Prof. Dr. Sebastião Carvalho
Vasconcelos Filho
Avaliador interno
IF Goiano/RV


Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
Presidente da banca
IF Goiano/RV

“Tenho a impressão de ter sido uma criança à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

Por tudo que fiz, dedico a vocês:
Guilherme, Gabriela e Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar a oportunidade de viver e pelas pessoas que Ele colocou em meu caminho. Algumas delas me inspiraram, ajudaram, desafiaram e me encorajaram a ser uma pessoa melhor.

Gostaria de agradecer meu orientador Fabiano Guimarães Silva, por me aceitar e colaborar para que esta pesquisa se tornasse realidade, aos meus coorientadores Paulo Sérgio Pereira e Lucas Anjos de Souza, por ajudar imensamente nesse projeto. Ao Sebastião C. Vasconcelos Filho, Flávia Dionísio Pereira e Aurélio Rúbio Neto, pelo apoio, muito obrigada professores pelas correções, conselhos, verdades e por colaborar para meu crescimento profissional.

A esta instituição de ensino, a todos os servidores, professores e diretores pela dedicação e responsabilidades em prol do discente.

Agradeço a minha família que me deu apoio incondicional em todos os momentos que mais precisei, sem vocês com certeza não conseguiria ter condições psicológicas, financeiras, emocionais para executar qualquer atividade. Obrigada mãe, essa conquista também é sua, você sempre acreditou em mim, serei eternamente agradecida por seu apoio. A minha tia Diva, por ser amiga, verdadeira, sempre estando do meu lado dando uma palavra de esperança e superação, obrigada. Ao meu esposo Fernando, que esteve me dando suporte para poder dedicar e lutar por mais essa etapa da minha vida. Aos meus filhos Guilherme, Gabriela e Gustavo, nada teria sentido sem vocês.

A todos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e agora amigos, por cada contribuição e socorro: Paula, Mariluz, Elisvane, Anielly, Juliana, Rejaine, Rafael, Letícia, Márcio, Jefte, Jéssica, Ana Cláudia, Luan, Douglas, Vinícius, Germana, Thainá, Érica, Daniele, Paulo, Gregório e Maíza. Como diz o velho ditado, a amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para realização desta Dissertação de Mestrado.

BIOGRAFIA DA AUTORA

LUCIANA ARANTES DANTAS, filha de Givaldo Vitorino Dantas e Áurea Arantes Dantas, nasceu no dia 22 de setembro de 1978, na cidade de Rio Verde – Goiás.

No ano de 2000, concluiu o curso de Graduação em Licenciatura Plena com Habilitação em Biologia pela Universidade de Rio Verde (UniRV).

Em 2002, concluiu o curso *Lato sensu* (Aprimoramento) em Fertilidade do solo e nutrição mineral de plantas no agronegócio oferecido pela Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Casada com Fernando Carlos Silva, com quem possui três filhos, Guilherme F. Arantes Silva, Gabriela F. Arantes Silva e Gustavo F. Arantes Silva.

Concluiu em 2008, o curso de Graduação em Farmácia – Bioquímica na Universidade de Rio Verde (UniRV).

Em 2010, concluiu o curso *Lato sensu* em Farmácia Clínica oferecido pela Associação dos Farmacêuticos de Ribeirão Preto – SP (AFARP).

Em março de 2014, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pelo Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, sob a orientação do professor Dr. Fabiano Guimarães Silva.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Plantas daninhas com potencial farmacológico	18
1.2 Perfil farmacológico da família Solanaceae	19
1.3 Caracterização botânica de <i>Solanum aculeatissimum</i> Jacq	20
1.4 Caracterização química <i>Solanum aculeatissimum</i> Jacq (Solanaceae)	24
1.5 Síntese química dos Fitoesteróis	25
1.5.1 Saponinas Esteroidais	28
1.5.2 Alcaloides Esteroidais.....	29
1.6 Solasodina	29
1.7 Cultivo <i>in vitro</i> e elicitação.....	32
1.8 Meios nutritivos de cultivo	33
1.9 Reguladores de crescimento.....	33
1.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
OBJETIVO GERAL	38
CAPÍTULO 1 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SOLASODINA EM CALOS E PLÂNTULAS DE <i>Solanum aculeatissimum</i> JACQ. CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> SOB DIFERENTES QUALIDADES DE LUZ	41
RESUMO	41
CAPTHER 1 – SOLASODINE PRODUCTION OPTIMIZATION IN CALOS AND SEEDLING <i>Solanum aculeatissimum</i> JACQ. CULTIVATED IN VITRO UNDER DIFFERENT LIGHT QUALITIES	42
ABSTRACT	42
2.1 INTRODUÇÃO	43
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.2.1 Material vegetal	45
2.2.2 Indução de calos em <i>Solanum aculeatissimum</i> Jacq	47

2.2.3 Manutenção e multiplicação dos calos	48
2.2.4 Histoquímica	49
2.2.5 Crescimento de plântulas e calos cultivados em diferentes comprimentos de onda.....	50
2.2.6 Quantificação de solasodina por HPLC.....	51
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
2.3.1 Indução e crescimento de calos	53
2.3.2 Crescimento de plântulas e calos cultivados em diferentes comprimentos de onda	54
2.3.3 Histoquímica.....	57
2.3.4 Detecção e quantificação de solasodina em plântulas e calos.....	68
2.4 CONCLUSÕES	75
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Descrição botânica de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq.....	20
---	----

Capítulo 1

Tabela 1: Resultado dos testes histoquímicos de folhas coletadas <i>in vivo</i> , folhas estabelecidas <i>in vitro</i> , e calos de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq.....	66
---	----

Tabela 2: Resultado para detecção de solasodina em folhas e frutos de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq.....	73
---	----

Tabela 3: Variação da concentração de solasodina em diferentes espécies do gênero <i>Solanum</i> após elicitación.....	73
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Sementes seccionadas de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. mostrando a posição do embrião e cotilédones.....	21
Figura 2: Frutos de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. coletados em diferentes estágios de maturação.....	22
Figura 3: Plântula e folha cotiledonar de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq.....	22
Figura 4: Arbusto de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. adulta <i>in situ</i> , planta com 80 dias de crescimento e frutos em diferentes estágios de maturação.....	23
Figura 5: Estrutura do pregnano.....	24
Figura 6: Estruturas de glicosídeos esteroides de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq.....	25
Figura 7: Formação de esteroides a partir do esqualeno.....	26
Figura 8: Esquema resumido da biossíntese dos fitoesteróis.....	27
Figura 9: Estrutura molecular do grupo espirosolano e solanidano.....	28
Figura 10: Biossíntese da solasodina a partir da molécula de colesterol.....	30
Figura 11: Conversão de solasodina e diosgenina em acetato de 16-deshidropregnenolona.....	31
 Capítulo 1	
Figura 1: Frutos recém-coletados, cortados e distribuídos em bandeja na estufa para secagem.....	45
Figura 2: Sementes inoculadas, plântulas e segmentos nodais utilizados para multiplicação.....	47
Figura 3: Segmento de 1 cm ² de folhas de <i>S. aculeatissimum</i> utilizados na indução de calos e calo friável induzido.....	48

Figura 4: Indução dos calos durante 4 semanas em meio MS 50% suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e KIN cultivados no claro e no escuro	49
Figura 5: Plântulas de <i>S. aculeatissimum</i> após 15 dias de subcultivo.....	50
Figura 6: Armário de luz contendo diferentes comprimentos de onda.....	51
Figura 7: Massa seca de calos de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivados no claro e no escuro com diferentes doses de KIN.....	53
Figura 8: Massa seca de calos de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. em resposta a diferentes doses de KIN cultivados no claro e no escuro	54
Figura 9: Massa fresca e seca de plântulas de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivadas em diferentes comprimentos de onda.....	55
Figura 10: Massa fresca de calos de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivados em diferentes comprimentos de onda.....	56
Figura 11: Massa seca de calos de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivados em diferentes comprimentos de onda.....	56
Figura 12: Secções transversais de folhas coletadas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e calos cultivados no claro no escuro para detecção de carboidratos.....	58
Figura 13: Secções transversais de folhas coletadas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e calos cultivados no claro no escuro para detecção de lipídeos.....	59
Figura 14: Secções transversais de folhas coletadas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e calos cultivados no claro no escuro para detecção de proteínas.....	61
Figura 15: Secções transversais de folhas coletadas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e calos cultivados no claro no escuro para detecção de terpenoides.....	62
Figura 16: Secções transversais de folhas coletadas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e calos cultivados no claro no escuro para detecção de compostos fenólicos.....	64
Figura 17: Secções transversais de folhas coletadas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> calos cultivados no claro no escuro para detecção de flavonoides.....	65
Figura 18: Secções transversais de folhas coletadas <i>in vivo</i> da espécie <i>S.</i> <i>aculeatissimum</i> Jacq. evidenciando a presença de tricomas estrelados.....	66
Figura 19: Secções transversais de folhas coletadas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e calos cultivados no claro no escuro para detecção de compostos nitrogenados.....	67
Figura 20: Cromatograma de calo de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivado em meio MS 50% dos sais com suplementação de KIN 2,5 mg mL ⁻¹ e sob fotoperíodo.....	68

Figura 21: Cromatograma de calo de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivado em meio MS 50% dos sais com suplementação de KIN 5,0 mg L ⁻¹ na ausência de luz.....	68
Figura 22: Cromatograma de calo de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivado em meio MS 50% dos sais com suplementação de KIN 2,5 mg L ⁻¹ sob fotoperíodo de 16 horas em luz vermelha.....	69
Figura 23: Cromatograma de plântulas de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivadas em meio MS 50% dos sais sob fotoperíodo de 16 horas em luz azul.....	69
Figura 24: Cromatograma do extrato metanólico obtido das folhas colhidas em campo de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq.....	69
Figura 25: Cromatograma do extrato metanólico dos frutos colhidos em campo de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq.....	70
Figura 26: Teor de solasodina em calos de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivados no claro e no escuro com diferentes doses de KIN.....	70
Figura 27: Teor de solasodina em plântulas cultivadas em meio MS 50% dos sais de <i>S. aculeatissimum</i> Jacq. cultivadas em diferentes comprimentos de onda.....	71
Figura 28: Concentração de solasodina em calos cultivados em diferentes comprimentos de onda.....	72

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

μ W – microwatts

MS – Murashige e Skoog
(meio de cultivo)

nm– nanômetro

S – Sul

W – Oeste

cm – centímetro

R – radical

% - porcentagem

β – beta

mg – miligramas

g – gramas

L⁻¹ – por litro

HPLC – High performance liquid chromatography

XP – Xilidine Ponceau

PAS – Reagente de Schiff

° - graus

' – minutos

'' – segundos

m – metros

pH – potencial hidrogeniônico

Kg – quilogramas

°C – grau Celsius

μ L – microlitro

μ mol – micromol

mL – mililitro

(v/v) – volume por volume

UV – ultravioleta

min – minutos

MF – Matéria fresca

MS – Matéria seca

RESUMO

DANTAS, Luciana Arantes, M.Sc., Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, fevereiro de 2016. **Produção de solasodina através do cultivo *in vitro* de plântulas e calos de *Solanum aculeatissimum* Jacq. (Juá bravo)**. Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva. Coorientadores: Dr. Paulo Sérgio Pereira, Dr. Lucas Anjos de Souza.

Pertencendo a família Solanaceae a espécie *Solanum aculeatissimum* Jacq. possui grupos de alcalóides severos entre várias plantas que acumulam alcalóides esteroidais. O metabólito solasodina presente em folhas, caules e frutos dessa espécie tem sido relatado como esteroide precursor valioso como fonte complementar da síntese comercial de vários medicamentos esteroides, podendo ser obtido principalmente a partir de várias plantas de gênero *Solanum*. O presente trabalho teve como objetivo produzir solasodina em cultivo *in vitro* de calos e plântulas de *S. aculeatissimum* como fonte de matéria-prima na produção de medicamentos esteroides, avaliando o efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento, seu metabolismo e a histologia dos calos obtidos. A influência dos diferentes espectros de luz [branca (300-750 nm), azul (400-490 nm), verde (490-560 nm), amarelo (560-590 nm) e vermelho (600-700 nm)] sobre o crescimento e na produção de solasodina em plântulas e calos foi avaliada. Conclui-se que o processo de produção do metabólito solasodina por meio do cultivo *in vitro* de calos e plântulas de *S. aculeatissimum* Jacq., pode ser influenciado por exposição a diferentes luminosidade e doses de cinetina. Na avaliação foi possível otimizar a produção do metabólito e sua influência no crescimento e resposta histoquímica *in vitro*, comparada com as quantidades obtidas nos tecidos das folhas e frutos em campo. Demonstrando que as técnicas biotecnológicas voltadas a esta espécie podem contribuir como, uma fonte de dados futuros e consequentemente ser uma fonte de matéria-prima na produção de medicamentos esteroides.

PALAVRAS-CHAVES: Cinetina, elicitação, alcaloide esteroide.

ABSTRACT

DANTAS, Luciana Arantes, M.Sc., Federal Institute - *Campus* Rio Verde - GO, february, 2016. **Solasodine production by *in vitro* cultivation of seedlings and callus of *Solanum aculeatissimum* Jacq. (Juá bravo).** Advisor: Dr. Fabiano Guimarães Silva. Coadvisors: Paulo Sergio Pereira, Lucas Anjos Souza.

Belonging to the family Solanaceae species the *Solanum aculeatissimum* Jacq. has severe groups of alkaloids among several plants that accumulate steroidal alkaloids. The metabolite solasodine present in leaves, stems and fruits of this species has been reported as a valuable precursor steroid as a complementary source of commercial synthesis of various steroid medications, it may be obtained mainly from several plants of *Solanum* genus. This study aimed to produce solasodine by *in vitro* cultivation of callus and seedlings of *S. aculeatissimum* as a source of raw material in the production of steroid medicines, assessing the effect of different conditions on growth, metabolism and histology of callus obtained. The influence of different light spectra [White (300-750 nm), blue (400-490 nm), green (490-560 nm), yellow (560-590 nm) and red (600-700 nm)] on the growth and production of solasodine in seedlings and callus was evaluated. It follows that the production process of solasodine metabolite by cultivation *in vitro* of callus and seedlings *S. aculeatissimum* Jacq., can be influenced by light exposure and different kinetin doses. In the assessment it was possible to optimize the metabolite production and its influence on growth and immuno histochemistry *in vitro*, compared to the amounts obtained in the tissues of leaves and fruits field. This demonstrates that the biotechnological techniques directed to this species could serve as a source of future data and thus be a source of raw material in the production of steroid drugs.

KEY WORDS: Kinetin, elicitation, alkaloid steroidal.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

O homem explora a natureza há muitos anos, principalmente plantas e animais para se alimentar, medicar, construir abrigos, roupas etc. As plantas têm sido utilizadas pela humanidade para fins medicinais desde a antiguidade. Supõe-se que mais de 70% dos medicamentos derivados de plantas foram desenvolvidos tendo como base o conhecimento popular (SANTOS et al., 2012).

Espécies vegetais nativas possuem grande potencialidade no desenvolvimento de fármacos e matérias-primas farmacêuticas, despertando assim, grande interesse para o mercado econômico mundial. Baseado nesses dados, o Brasil é destaque por possuir enorme variedade genética vegetal. Estima-se que o país possui cerca de 350.000 a 550.000 espécies vegetais, dentre estas, somente 55.000 já foram catalogadas. Desproporcionalmente, somente 8% dessas espécies foram estudadas na busca por compostos que possuam atividade medicinal (ROSSATO et al., 2012; SIMÕES et al., 2003).

Mesmo que uma pequena parcela das espécies vegetais esteja sendo estudada, tanto no Brasil quanto no mundo, são notáveis as possibilidades do desenvolvimento de bioativos existentes na imensa variedade vegetal constituinte em todo o planeta Terra.

Na realização de pesquisas para a produção de medicamentos, primeiramente é feita a seleção da espécie com a ajuda do levantamento bibliográfico, da etnobotânica, etnofarmacologia e estudos farmacológicos prévios. Em um segundo momento, a identificação botânica e extração dos compostos químicos constituintes das plantas, subsidiam a fase que testa a atividade biológica e a toxicidade que apresenta esse material. Para a obtenção desses fitomedicamentos é de grande importância a determinação da estrutura química dos possíveis compostos ativos através de métodos espectroscópicos, conseqüentemente isso permitirá o estudo para a síntese total ou parcial do bioativo, avaliando sua relação estrutura atividade e a potencial produção em larga escala. Os aspectos legais, farmacotécnicos e testes clínicos completam o ciclo para o desenvolvimento de fitomedicamentos (RATES, 2001).

Com a evolução da biotecnologia o fornecimento de informações úteis sobre a aplicação de metabólitos ativos presentes em espécies vegetais, caracteriza-se como uma ferramenta que se destaca mundialmente em várias áreas do conhecimento científico e tecnológico. A aplicação biotecnológica voltada ao estudo de plantas nos permite extrair compostos de ampla aplicação industrial. Atualmente, inúmeros experimentos evidenciam a presença dos metabólitos secundários nas plantas, como os terpenos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, saponinas, taninos, antraquinonas. Estes metabólitos possuem características adaptativas a fim de proteger as plantas contra vírus, bactérias, fungos, plantas concorrentes e contra os herbívoros (ANSELMO & LIMA, 2014).

Niemeyer (2014) descreve que os metabólitos secundários desempenham importante papel na interação das plantas com o meio ambiente. Hussain et al. (2012) ressalta que os mesmos metabólitos atuam na competição entre plantas e na atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbiotes. Contudo, também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a luz ultravioleta e deficiência de nutrientes minerais.

A utilização de células e tecidos vegetais para a produção de compostos naturais de interesse comercial ganha cada vez mais atenção nas últimas décadas, entretanto, a viabilidade econômica da produção de metabólitos secundários a partir de culturas de células e de órgãos varia conforme a espécie vegetal, tipo de cultura empregada, tipo de biorreator utilizado, a produção de biomassa e valor do produto final (HUSSAIN et al., 2012).

Uma das finalidades da cultura de tecidos vegetais é a síntese e extração de metabólitos secundários, estes geralmente ocorrem em baixa concentração e não participam diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas. Sua produção e acumulação são frequentemente estimuladas em resposta a alterações ambientais. Como já foi descrito anteriormente um dos papéis mais importantes destes metabólitos em plantas é a proteção contra herbívoros e patógenos, garantindo sua sobrevivência. Por isso, algumas estratégias para a produção de metabólitos em culturas baseiam-se neste princípio a fim de aumentar o rendimento do metabólito de interesse (YENDO et al., 2010).

Diante disso, a utilização de dessa técnica biotecnológica é importante recurso para o cultivo de espécies, atuando como fonte biológica contínua para a produção de

fármacos. Atualmente, técnicas variadas vêm sendo utilizadas com o intuito de aperfeiçoar as condições de cultivo de tecidos vegetais, visando superar a produção dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas matrizes (KARUPPUSAMY, 2009).

Dentre vários compostos com interesse biotecnológico, Manosroi et al. (2005) cita a solasodina, descreve que este metabólito tem sido mencionado como um esteroide precursor valioso para a fonte complementar da síntese comercial de vários medicamentos esteroides, podendo ser obtido principalmente a partir de várias plantas do gênero *Solanum*.

Atribuindo o aprimoramento do conhecimento voltado à espécie citada anteriormente, faz-se indispensável aplicação de técnicas biotecnológicas na busca de compostos bioativos, investigando, aperfeiçoando e detectando informações de suas propriedades químicas e biológicas, para futuramente constituir numa fonte de dados científicos para produção industrial farmacêutica.

1.1 Plantas daninhas com potencial farmacológico

Conceituar uma planta como “daninha” é uma questão de ponto de vista, pois estas são plantas com capacidade genética de resistência a condições adversas, além de apresentar rusticidade, resistência a pragas e diversas doenças. Devido sua alta capacidade de produzir sementes de fácil adaptação ao ambiente, sua dispersão também é favorável. Estas plantas possuem características indesejáveis dependendo do meio em que elas se desenvolvem, porém, podem apresentar muitas utilidades como a proteção e a capacidade de retenção de umidade do solo, ornamentação, extração de óleos essenciais, propriedades apícolas, alimentação e aplicações curativas (GAHUKAR, 2012).

No que tange a aplicação curativa destas ervas, a flora do cerrado brasileiro é riquíssima em espécies medicinais. Entre a vasta variedade destacam-se: *Cassia occidentalis* L.(fedegoso), *Bidens pilosa* L. (picão, picão-roxo), *Scoparia dulcis* L. (vassourinha), *Rudgea viburnoides* (congonha-de-bugre), *Operculina hamiltonii* Austin & Staples (batata-amaroleite), a maioria delas usadas em grande escala na medicina popular (GUARIM NETO et al., 2003).

É na agricultura que essas plantas causam mais prejuízos (Lorenzi, 1991), o Juá-bravo (*S. aculeatissimum*), por exemplo, é considerado excepcionalmente

prejudicial nas pastagens, ferindo animais, além de transmitir sabor desagradável ao leite quando ingeridos por estes em período de lactação e, em altas quantidades pode levar a morte por sua toxicidade. Sua presença juntamente com outras culturas, pode gerar competição prejudicando a produtividade. Porém, do ponto de vista farmacológico com uma demanda cada vez mais crescente pela utilização de plantas com potencial medicinal, o extrativismo se torna cada vez mais importante. A busca por alternativas biotecnológicas proporciona cada dia mais a produção de elevado número de novas drogas baseadas em produtos naturais, ainda que estas sejam consideradas por muitos ervas daninhas (CUNHA, 2005).

1.2 Perfil farmacológico da família Solanaceae

Além da grande importância alimentícia que esta família possui como as espécies de grande atribuição comercial como a batata (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), jurubeba (*Solanum palinacantum*) e berinjela (*Solanum melongena* L.) diversos gêneros e espécies pertencentes a esta família possuem diversos compostos bioativos de interesse farmacêutico. Alguns gêneros de destaque como *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Datura*, *Brugmansia* e *Solanum* fornecem alcaloides para várias utilizações farmacológicas, cujos compostos englobam atropina, escopolamina, hiosciamina e solasodina (GIACOMINI, 2010).

É importante salientar que as solanáceas contêm saponinas esteroidais com grande aplicação farmacológica, as cadeias de açúcares ligadas à porção aglicona desempenham e dão propriedades da atividade biológica (KOHARA et al., 2007).

Corrêa (2015) cita que as plantas que pertencem a essa família possui grandes quantidade de compostos bioativos como por exemplo: alcaloides tropânicos, alcaloides piridínicos, vitanolídeos, sesquiterpenos e diterpenos, glicoalcaloides, flavonoides entre vários. Muitos desses compostos possuem atividades medicinais apresentando propriedades anti-inflamatórias, anti-helmínticas, antimicrobiana, citotóxica, antiasmática entre outros.

O gênero *Solanum* é o maior e mais complexo gênero da família Solanaceae, com cerca de 1500 espécies habitando sistemas ecológicos estabelecidos em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo a América do Sul, o centro de diversidade e distribuição. Dentre algumas espécies desse gênero, o uso popular apresentou efeitos

midriáticos, mióticos, anti-hepatotóxico, estimulantes centrais, anti-inflamatórios, hipotensores e hipertensores (MARTINS, 2013).

Pertencendo a este gênero a espécie *aculeatissimum* possui grupos de alcaloides severos entre várias plantas que acumulam alcaloides esteroidais. O esteroide solasodina tem sido apontado como metabólito que contém concentração relativamente elevada em grande número de espécies do gênero *Solanum*. O metabólico pode ser convertido em composto de partida de 16-deshidropregmolona para a produção semi-sintética de esteroides farmacêuticos e contraceptivos em várias partes do mundo (SILVA et al., 2003).

1.3 Caracterização botânica de *Solanum aculeatissimum* Jacq.

A espécie *S. aculeatissimum* possui elevado número de acúleos existentes em toda a planta, sua descrição botânica citada na Tabela 1, explora de forma mais detalhada. É popularmente conhecido como arrebenta-cavalo e arrebenta-boi (RS, SP, RJ, MG), babá e bobá (BA), gogoia (PE), joá-bravo (MG, RJ), joá-de-espinho e Joá-rajado (MG), joati e melancia-vermelha-da praia (CE); joá-vermelho e juá-vermelho (RJ), mata-cavalo (RS), juá-bravo, juá, joá (GO) (GROTH, 1989).

O nome vulgar arrebenta-cavalo, refere-se ao fato das sementes serem tóxicas aos equinos, podendo causar-lhes a morte. Planta daninha encontrada facilmente em pastagens e beira de estradas, em regiões tropicais e subtropicais do Brasil.

Segundo Groth (1989) a descrição das sementes de plântulas de *S. aculeatissimum* obedece à seguinte classificação botânica como demonstra a tabela 1.

Tabela 1: Descrição botânica de *S. aculeatissimum* Jacq. segundo Groth (1989)

Semente	Elipsoide; em secção longitudinal largo-obovada; bordo dorsal convexo, arredondado, levemente facetado, hilo em depressão forma de fechadura, de 1-1,2 mm de comprimento e da mesma cor do tegumento castanho amarelado, textura coriácea, com superfície microscopicamente pontuada (30x); cotilédones lanceolados e de ápice agudo (Figura 1).
Plântulas	Hipocótilo glabro, esverdeado ou avermelhado; folhas cotiledonares lanceoladas, de ápice agudo e base atenuada, pecíolos glabros, faces verde-escuras e com pilosidade glandular; epicótilo pouco evidente,

verde-claro, com curtos e esparsos pelos glandulares; folhas definitivas largo-ovadas e pinatipartidas, de base subcortada, pecíolos longos e com pelos glandulares, bordos sinuado-dentados, face abaxial verde-escura, com esparsos pelos simples e com acúleos na nervura central, face abaxial mais clara e com pilosidade estrelada (Figura 3).

Segundo Stehman et al., (2010):

Floração / Frutificação:

Começa a florescer em setembro, permanecendo com frutos até maio.

Dispersão: Zoocórica.

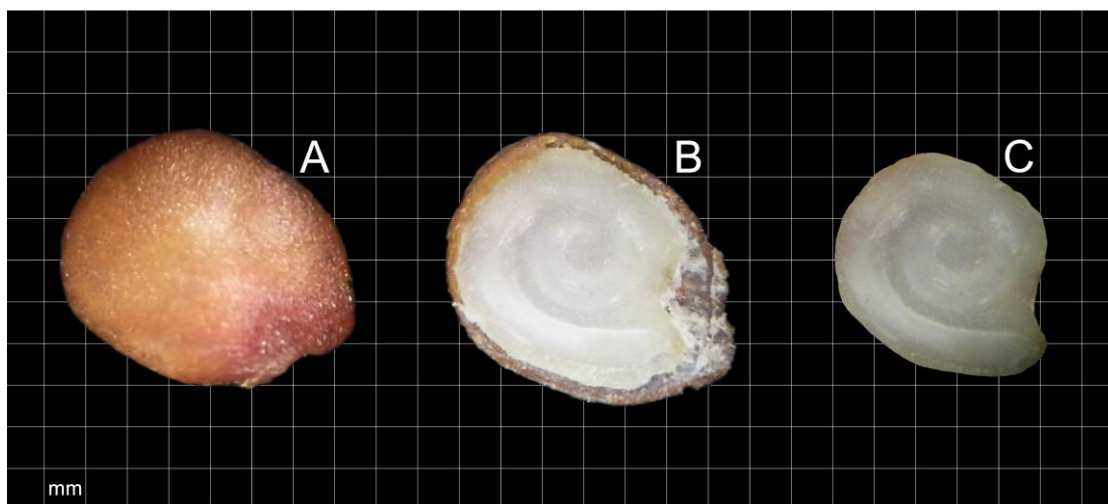


Figura 1: *Solanum aculeatissimum* Jacq.: A: semente; B: secção longitudinal da semente, mostrando a posição do embrião; C: embrião. Escala: 0,5 mm Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015.

Conforme Mentz (2004):

Frutos: fruto subgloboso, com até 3 cm de diâmetro, esverdeado e com manchas esbranquiçadas irregulares quando imaturo (Figura 2-A), amarelo quando maduro (Figura 2-C), geralmente 1 por inflorescência, raro 2.



Figura 2: Frutos de *S. aculeatissimum* Jacq. coletados em diferentes estágios de maturação: imaturo (A), imaturo seccionado (B), maduro (C) e maduro seccionado (D). (Barra igual a 1,5 cm de comprimento). Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015.

Distribuição geográfica: No Brasil: Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco, Ceará, Goiás e Mato Grosso (GROTH, 1989); Ásia tropical e África (IKENAGA et al., 2000).



Figura 3: Plântula de *Solanum aculeatissimum* Jacq. Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015.

Arbusto muito ramificado (Figura 4-A), de 0,3 a 1,2 m de altura, caule com até 3,5 cm de diâmetro na base, ramos estendidos lateralmente cobertos com tricomas simples, de diferentes comprimentos e tricomas glandulares de dois tipos. Acúleos numerosos, de diferentes tamanhos, folhas solitárias ou geminadas, e então a maior com o dobro da menor. Face adaxial da lâmina foliar com aspecto viloso, coberta de tricomas hialinos, simples e glandulares, de tamanho desigual e com acúleos iguais aos dos

ramos. Face abaxial com as nervuras cobertas de tricomas simples, de 2-4 células e glandulares, aréolas densamente cobertas de tricomas porreto-estrelados, além de tricomas simples de 2-3 células e glandulares, curtos e longos; acúleos ligeiramente menores que os da face adaxial, igualmente com tricomas simples e glandulares. Inflorescência com até 7 flores, pedicelo de até 2 cm de comprimento, com tricomas iguais aos dos ramos, e acúleos, quando presentes, aciculares (STEHMAN et al., 2010).



Figura 4: Arbusto de *S. aculeatissimum* Jacq. adulta *in situ* (A), planta com 80 dias de crescimento (B) e frutos em diferentes estágios de maturação: imaturo (C) e maduro (D). (Barra igual a 1,5 cm de comprimento). Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015

1.4 Caracterização química de *Solanum aculeatissimum* Jacq. (Solanaceae)

Ghimire et al. (2011) descreve que *S. aculeatissimum* é considerado um arbusto com potencial medicinal valioso, muito utilizado na tradicional medicina da Índia e Nepal, com o uso dos extratos de seus frutos para dor de dente, sarna, dor de cabeça, caspa e piolhos. Nabeta (1993) afirma que esta espécie é originária da América tropical sendo muito utilizada na China, para o tratamento de bronquite e reumatismo. Considerando então, o valor medicinal atribuído de *S. aculeatissimum*, foram isolados compostos bioativos de caule, folhas, raízes e frutos como alcaloides e saponinas esteroidais, considerados fonte útil de derivados do pregnano (Figura 5).

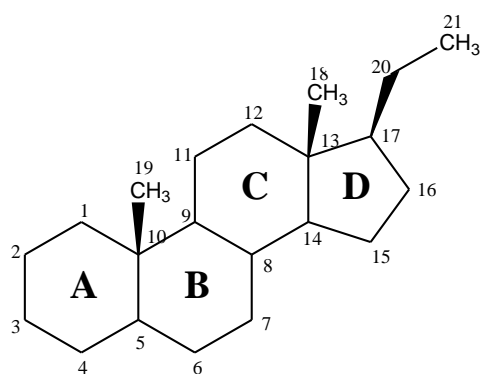
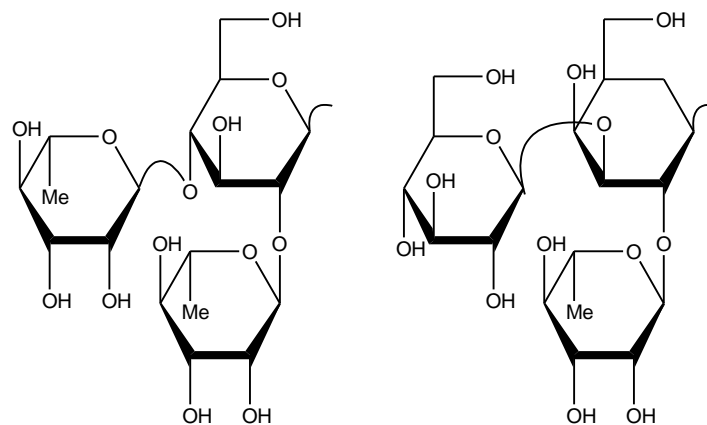


Figura 5: Estrutura do pregnano

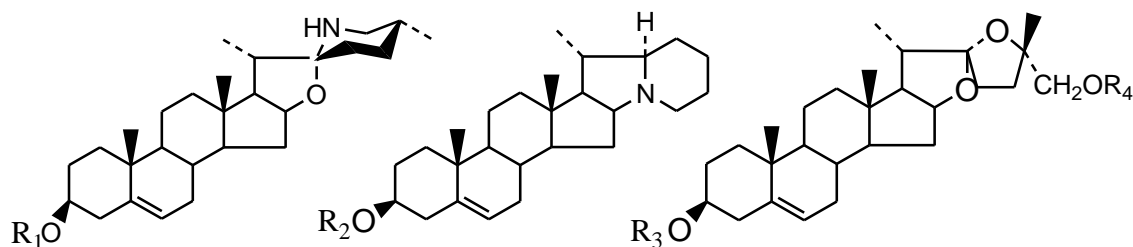
Fonte: <https://es.wikipedia.org/wiki/Pregnano>

Investigando compostos orgânicos na espécie, o autor declara existir um histórico que o extrato metanólico do *S. aculeatissimum* possui três alcaloides: solanina (Figura 6-6), solasonina (Figura 6-4) e solamargina (Figura 6-5), além dos já citados apresenta também metabólitos glicosídeos esteroidais aculeatisides A e B (Figura 6-4 e 8). Recentemente, Martins (2013) ressalta que além da presença dos metabólitos mais abundantes encontrados na espécie (solanina, solamargina e a solasonina), a planta ainda contém chaconina. Pereira et al. (2006) fracionou e avaliou a atividade antibacteriana do extrato metanólico das folhas do *S. aculeatissimum*, e após a identificação do composto bioativo responsável pela ação antibiótica constatou que a substância que desencadeou a atividade é o bioflavonoide rutina.



Chacotriose

Solatriose



1 solasodina R₁: H

2 solanidina R₂: H

3 nuatigenin R₃: H - R₄: H

4 solasonina R₁: β-solatriose

6 solanina R₂: β-solatriose

7 aculeatiside (A) R₃: β-chacotriose - R₄: β-glicose

5 solamargina R₁: β-chacotriose

8 aculeatiside (B) R₃: β-solatriose - R₄: β-glicose

Figura 6: Estruturas de glicosídeos esteroides de *S. aculeatissimum*
Fonte: Nabeta (1993)

Calos induzidos *in vitro* a partir de folhas de *S. aculeatissimum* podem produzir cetonas esteroides: stigmast-3-ona e stigmast-4-en-ona e esteróis saturados campestanol e estigmastanol por sofrer transformação por oxidação do grupo hidroxila resultando em β-insaturados por hidrogenação.

1.5 Síntese química dos fitoesteróis

Os esteróis vegetais também chamados de fitoesteróis são abundantemente encontrados na natureza, trata-se de um grupo de esteroide álcool com odor característico, insolúvel em água e solúvel em alcoóis. Possuem muitas aplicações como aditivos alimentares, na medicina e fabricação de cosméticos. O ergosterol, por

exemplo, possui a capacidade de reduzir níveis de colesterol em humanos além de prevenir o câncer (SULTAN & RAZA, 2015).

Na grande maioria todos os esteróis vegetais são hidroxilados em C-3 caracterizando-os de esteróis (núcleo esteroidal). No reino animal, os esteroides têm profunda importância como hormônios, coenzimas e pró-vitaminas. Há evidência de que alguns dos fitoesteróis são eficazes contra as doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Para a biossíntese dos esteroides é utilizado como precursor o derivado do escaleno resultante da epoxidação nas posições 2 e 3, a partir desse composto (2,3 epoxi-esqualeno) pode tomar várias conformações. Se tomar uma disposição tal que sugira uma conformação “cadeira-barco-cadeira-barco” vai ser o substrato de enzimas específicos, ciclases, que o transformam no lanosterol, no caso dos animais ou no cicloartenol, no caso das plantas (Figura 7-A,B). A biossíntese dos fitoesteróis tem igualmente como precursor o óxido de esqualeno que toma uma conformação inicial igual, cadeira-barco-cadeira-barco (Figura 7-C) (ARAÚJO, 2012).

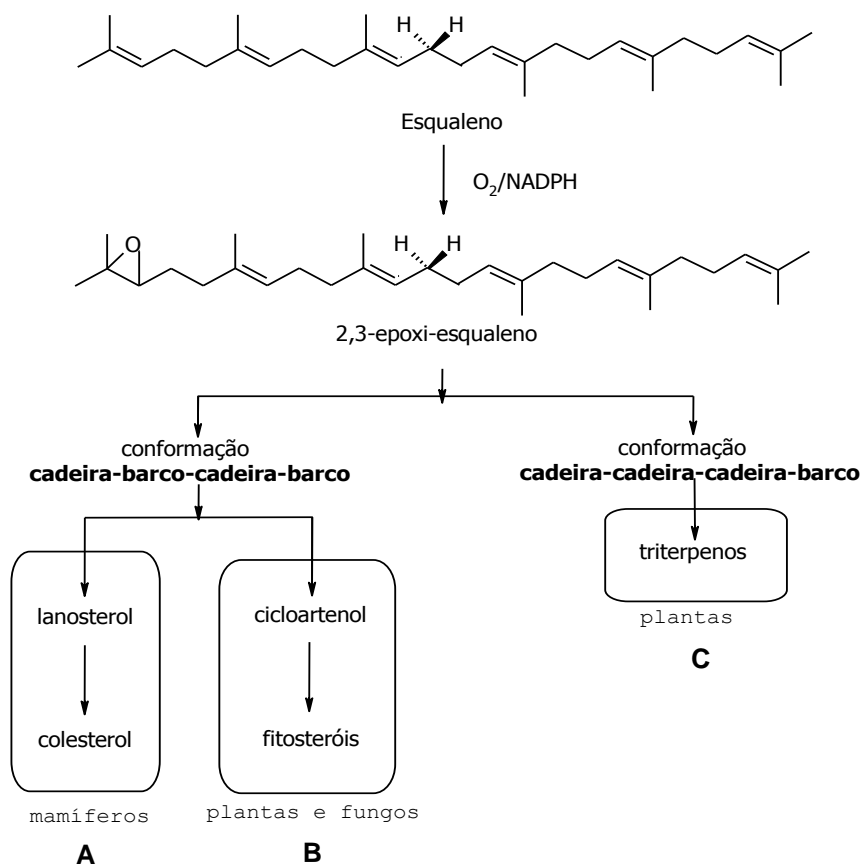


Figura 7: Formação de esteroides a partir do lanosterol (A) e cicloartenol (B); e triterpenos (C) a partir do esqualeno. **Fonte:** Araújo, 2012.

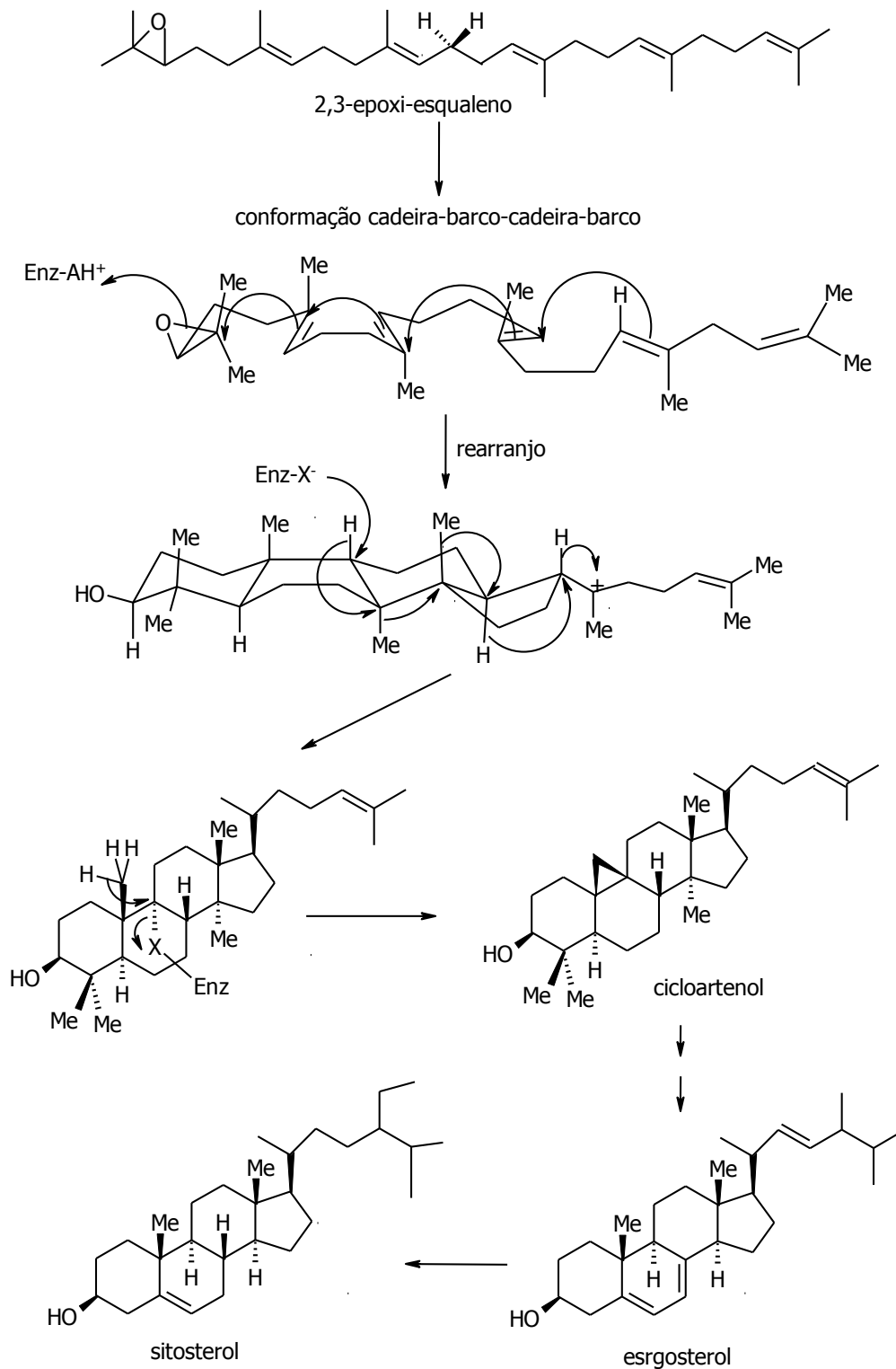


Figura 8: Esquema resumido da biossíntese dos fitoesteróis. **Fonte:** Araújo, 2012.

Os compostos esteroidais possuem inúmeras variações em sua estrutura. Suas propriedades farmacológicas foram profundamente estudadas, sendo apontado como poderoso recurso que encontra aplicações, tanto na medicina humana quanto veterinária. Na produção comercial dessas drogas, a diosgenina, uma saponina esteroideal presente

na forma de glicosídeo em várias plantas, tem sido usada na produção de medicamentos por apresentar alta concentração nas *dicoreas* (MOLA et al., 1997).

1.5.1 Saponinas esteroidais

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, tem como característica molecular uma parte lipofílica denominada aglicona (triterpeno ou esteroide) e outra parte hidrofílica denominada glicona (açúcares em cadeia linear ou ramificada). São classificadas de acordo com seu núcleo fundamental (aglicona) e pelo seu caráter ácido (presença de grupamento carboxila), básico (presença de nitrogênio) ou neutro (sem a presença do nitrogênio). As saponinas básicas pertencem aos alcaloides esteroidais presentes no gênero *Solanum* (família Solanaceae), são conhecidas quanto à posição do nitrogênio: espirosolano (secundário) (Figura 9-A-B), e solanidano (terciário) (Figura 9-C) (CUNHA, 2005).

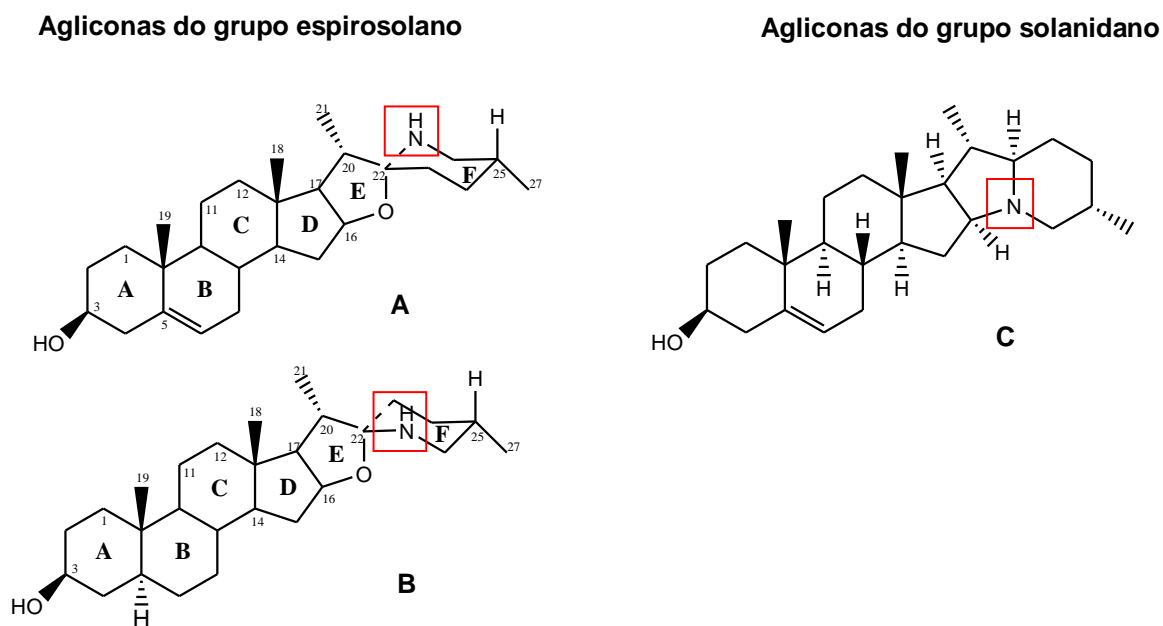


Figura 9: Estrutura molecular do grupo espirosolano: solasodina (A) e tomatidina (B); e do grupo solanidano: solanidina (C). Fonte: Simões et al. (2003)

Saponinas esteroidais são sintetizados a partir do colesterol através de uma série de etapas de oxigenação e hidroxilação, e posteriormente se ligam com moléculas de

açúcar. A estrutura química desses compostos possui propriedades farmacológicas bioativas como ação antiinflamatória, antiviral e antitumoral. (KOHARA, 2005)

As solanáceas contêm saponinas esteroidais com grande aplicação farmacológica, o desempenho das cadeias de açúcares determina as propriedades na atividade biológica (KOHARA et al., 2007).

1.5.2 Alcaloides esteroidais

A classe dos compostos nitrogenados é considerada para Niemeyer (2014) um dos tipos mais interessantes como metabólitos secundários, principalmente por seu envolvimento em interações ecológicas e sua atividade farmacológica que levam à sua ampla utilização como drogas. Esta classe divide-se nas seguintes subclasses: Alcaloides, Aminoácidos Tóxicos, Glicosídeos Cianogênicos, Glucosinolatos, Amidas e Amidas Aromáticas, destacando os Alcaloides. Bessa et al. (2013) também ressalta a extensa aplicação dos efeitos farmacológicos dos alcaloides, citando como exemplo, a morfina e a tubocurarina.

Os alcaloides possuem hidrogênio, carbono, nitrogênio e oxigênio em sua estrutura cíclica ou heterocíclica. Compreendem uma grande classe de aproximadamente 15.000 exemplos de metabólitos secundários diferentes, destacando-se os seguintes compostos dos alcaloides: Pirrolidina, Tropano, Piperidina, Pirrolicidina, Quinolicidina, Isoquinolina e Indol. Para a síntese dos alcaloides os precursores são os aminoácidos ortina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptofano e ácido antranílico.

Sendo muito utilizados na indústria farmacológica para produção de medicamentos analgésicos, porém alguns compostos possuem atividade tóxica para seres humanos e animais. O papel dos alcaloides na defesa química das plantas é sustentado pela grande variedade de efeitos fisiológicos que estes exercem sobre os animais e, também por suas atividades antimicrobianas (FUMAGALI et al., 2008).

1.6 Solasodina

O primeiro isolado de solasodina foi em 1905 da espécie *Solanurn sodomwum* e sua estrutura foi identificada em 1945, amplamente utilizado em drogas antitumorais na

China. Devido a sua importante atividade biológica e escassez natural (0,03% na planta), estimulou o esforço no processo na obtenção sintética desse metabólito (WU et al., 2015).

Este alcaloide esteroide pode ser detectado em grande variedade de espécies do gênero *Solanum*, como por exemplo: *S. laciniatum*, *S. dulcamara* Linn., *S. nigrum* Linn, *S. torvum* Swartz, *S. lycopersicum* Linn, *S. tuberosum*, *S. aviculate* etc. No processo de biossíntese da solasodina o colesterol é o precursor, e as modificações ocorrem em sequência de reações bioquímicas conforme demonstra a (Figura 10) : (I) a L-arginina é utilizada como fonte para o átomo de nitrogênio através do processo de substituição convertendo em 26-hidroxicolesterol em (II) 26-amino-22-hidroxicolesterol, na sequência ocorre outra substituição para ciclizar e formar um anel heterocíclico piperidina; depois da 16 β -hidroxilação (III) a amina secundária é oxidada para se obter imina e no processo final através de uma reação de adição nucleofílica do 16 β -hidroxilo para imina (IV) ocorre a reação específica no estabelecimento da configuração (22R) da solasodina.

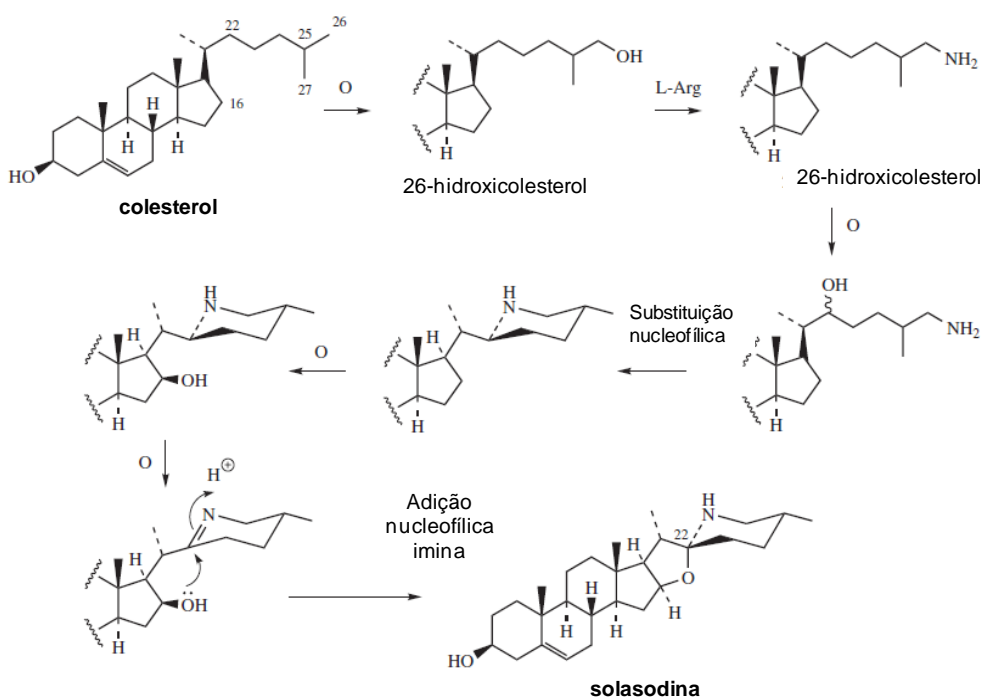


Figura 10: Biossíntese da solasodina a partir da molécula de colesterol
 Fonte: <http://www.epharmacognosy.com/2012/07/steroidal-alkaloids.html>

O esteroide solasodina tem sido apontado como metabólito que contém concentrações relativamente elevadas em grande número de espécies de *Solanum*. O metabólito pode ser convertido em composto de partida de 16-deshidropregmolona

(Figura 11), que pode ser utilizado para a produção semissintética de esteroides farmacêuticos e contraceptivos em várias partes do mundo (SILVA et al., 2003).

Manosroi et al. (2005) descreve esta conversão e considera a solasodina um precursor importante para a produção de várias drogas esteroides, como os hormônios sexuais, corticosteroides, medicamentos contraceptivos e outros medicamentos relacionados com esteroides.

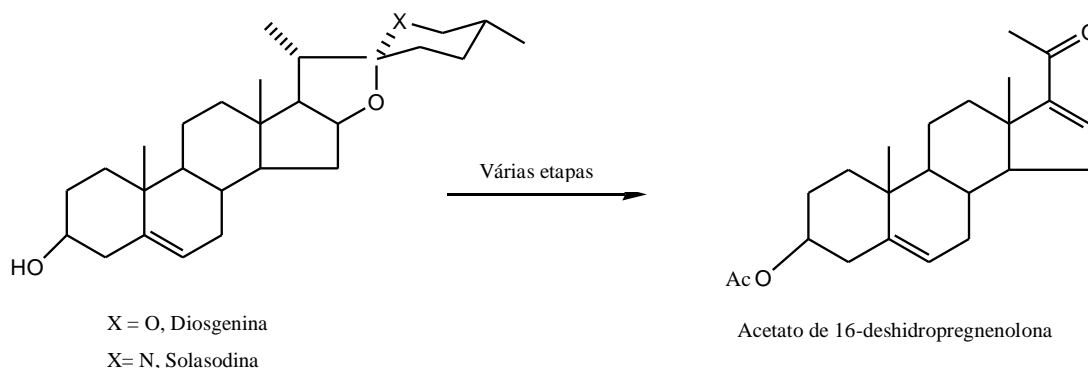


Figura 11: Conversão de solasodina e diosgenina em acetato de 16-deshidropregnenolona. Fonte: Manosroi et al. (2005).

Progestinas e corticosteroides para tratamento de artrites, inflamações na pele, entre outros, representam o montante na produção de drogas esteroidais, e continuam sendo mais fáceis na obtenção da 16-deshidropregnenolona, fonte esta proveniente da degradação da diosgenina ou solasonida (MOLA et al., 1997).

A solasodina atualmente é obtida da diosgenina, através de vários processos de síntese, todas têm a mesma estratégia de abertura de anel F (fase I), substituição no nitrogênio (fase II) e fechamento do anel F (fase III) (WU et al., 2015).

Manosroi et al. (2005) descrevem que solasodina tem sido relatado como esteroide precursor importante para a fonte complementar da comercial síntese de vários medicamentos esteroides, podendo ser obtido principalmente a partir de várias plantas de gênero *Solanum*. Vários procedimentos de isolamento de solasodina foram relatados a partir de folhas ou caule de *S. aculestisimum* Jacq.

A solasodina é uma aglicona da solasonina, solamargina e nuatigenin, que por sua vez pode ser convertido no derivado do pregnano, este por sua vez precursor na síntese de aldosterona, progesterona, cortisona e hidrocortisona. Segundo o autor o

rendimento da solasodina é surpreendentemente elevado, considerado grande potencial econômico (NABETA, 1993).

1.7 Cultivo *in vitro* e elicitação

Culturas de tecidos de plantas podem ser estabelecidas em laboratório sob condições estéreis e vários explantes (folhas, caules, raízes, raízes transformadas etc.), sendo utilizados para extração de metabólitos secundários, visto que, a célula vegetal possui a capacidade de produzir e acumular muitos dos mesmos compostos químicos produzidos pela planta-mãe na natureza (KARUPPUSAMY, 2009; HUSSAIN et al., 2012; MURTHY et al., 2014).

É conhecido que o potencial da cultura de calos produz grande variedade de metabólitos secundários, pois segundo Hussain et al. (2012) a produção torna-se mais confiável, simples e previsível. O isolamento do fitoquímico ocorre de maneira mais rápida e eficiente, quando comparado com a extração a partir de plantas completas. Entretanto, há situações em que a produção requer células diferenciadas ou culturas de órgãos (MURTHY et al., 2014).

O processo de elicitação é utilizado para induzir ou aumentar a síntese de metabólitos secundários de plantas. É um dos métodos estabelecidos mais eficazes para melhorar a produção de metabólitos secundários *in vitro* (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013).

Vários fatores químicos, físicos e biológicos, são responsáveis pela elicitação. Elictores químicos incluem íons metálicos e compostos inorgânicos (nitrato de prata, sulfato de cobre, sulfato de vanadilo, etc); elicitores físicos correspondem à radiação ultravioleta e variações de temperatura, enquanto eliciadores biológicos são compostos orgânicos obtidos a partir de organismos vivos, tais como fungos, bactérias, vírus, componentes da parede celular e de produtos químicos (ácido araquidônico, ácido salicílico, jasmonatos, etc.) sintetizados pela planta no local do ataque do patógenos ou herbívoros (ZHAO et al., 2005; CUSIDO et al., 2014).

Segundo o Ramachandra e Ravishankar (2011) a elicitação é baseada no conceito que metabólitos secundários são produzidos pela planta como parte de sua defesa contra o ataque de patógenos e são eficazmente produzidos em determinadas culturas. Quando as plantas estão estressadas, a produção de metabólitos secundários pode aumentar porque o crescimento é muitas vezes inibido mais do que a fotossíntese, e o carbono

fixo é predominantemente alocado para síntese de metabólitos secundários. Bessa et al. (2013) classifica estes compostos de acordo com a sua rota biossintética sendo as três famílias de moléculas principais geralmente consideradas: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides.

O uso de elicitores tem sido efetivo não só para induzir ou aumentar a síntese de metabólitos específicos, como também para elucidar as rotas biossintéticas e o acúmulo destes compostos bioativos. Por meio da elicitação desencadeará produção de altas quantidades de compostos bioativos se comparadas com as quantidades equivalentes do crescimento natural das plantas (HUSSAIN *et al.*, 2012).

Ressalta-se que, a luz sendo um dos elicitores físicos de fácil manuseio, influencia essencialmente no metabolismo primário e secundário de várias plantas, sua intensidade é um fator determinante na resposta metabólica das plantas na produção de alguns metabólitos e suas respectivas concentrações por mudanças no equilíbrio dos hormônios e enzimas. Estas mudanças são controladas por enzimas envolvidas na rota de biossíntese, como por exemplo as enzimas fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase por meio de expressões gênicas estimuladas pela luz na síntese dos fenilpropanóides, (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; SOUZA, 2014).

Pelo exposto é oportuno destacar que a utilização da luz nas experimentações que envolvam células vegetais pode ser uma boa ferramenta para elucidar rotas e induzir respostas bioquímicas de interesse, já que ocorre influência efetiva tanto em transduções genéticas quanto em enzimas responsáveis pela síntese de compostos orgânicos.

1.8 Meios nutritivos de cultivo

As necessidades nutricionais das plantas em geral restringem-se a certo número de elementos minerais considerados como indispensáveis ao seu crescimento e desenvolvimento, que normalmente, são absorvidos pelas raízes, a partir do solo. Da mesma forma culturas cultivadas *in vitro* necessitam para o seu crescimento os mesmos elementos essenciais, que são fornecidos via meio de cultivo. Além disso, o meio deve incluir em sua composição uma fonte orgânica de carbono e suplementos de vitaminas e reguladores do crescimento (RAMACHANDRA & RAVISHANKAR, 2011).

MORAIS et al. (2012) descreve que estudos futuros para cultivo de células *in vitro* podem ocorrer pelo início de combinações de auxinas e citocininas para aumentar a produção de solasodina, além do uso de diferentes indutores como intensidades de luz e várias concentrações de sacarose.

O trabalho de Sidhu (2011) relata o efeito das formulações dos meios e suas técnicas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento e multiplicação de plantas medicinais, e na produção de metabólitos secundários. A escolha da composição adequada do meio é importante para que o desenvolvimento do tecido seja bem-sucedido na cultura. O meio contém uma fonte de carbono (sacarose), macro e micronutrientes, vitaminas, hormônios e outras substâncias orgânicas. Existem variedades de meios de cultivo disponíveis para a cultura de tecidos de plantas, mas o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) 50% da concentração de sais é geralmente o mais utilizado.

1.9 Reguladores de crescimento

A indução e manutenção de células e tecidos *in vitro* requerem frequentemente a presença de auxina e citocinina, dois tipos de compostos que intervêm na regulação do ciclo de crescimento promovendo o alongamento e a divisão celular, respectivamente. De modo geral, as auxinas e as citocininas são substâncias reguladoras do crescimento vegetal, enquanto o emprego do termo *fitormônio* tem ficado restrito às auxinas e citocininas naturais (CUNHA, 2005).

Murthy et al. (2014) relata que culturas celulares em geral exigem fornecimento exógeno de reguladores de crescimento para o crescimento e proliferação de biomassa e acúmulo de metabólitos. Em geral, o tipo da planta e a concentração do regulador de crescimento são fatores cruciais para o crescimento de células e órgãos, a proliferação e acumulação de metabólito.

Os reguladores podem ser adicionados em culturas para melhorar o crescimento das plantas e aumentar a síntese de metabólitos. Sidhu (2011) observou em seu experimento em *Baliospermum montanum* e muitas outras espécies, que o crescimento *in vitro* não foi alcançado sem concentrações adequadas de reguladores do crescimento exógenos. No entanto, a quantidade inadequada ou excessiva desses reguladores pode causar anormalidades morfológicas e fisiológicas.

O mesmo autor também descreve que o nível de reguladores de crescimento é conhecido por efeito na produção de metabólitos. Observa-se o aumento na síntese de metabólitos quando se adiciona os reguladores num balanço criterioso, neste caso ocorre a produção e o aumento de saponinas em culturas de células de *Panax quinquefolius* L., sendo considerada mais elevada do que em plantas adultas (SHIDU, 2011).

O estudo citado, entre outros, possibilitará a elaboração de um protocolo para aumentar a produção do metabólito secundário solasodina presente na espécie *Solanum aculeatissimum* Jacq., por meio do cultivo *in vitro* de calos com a combinação de reguladores de crescimento e doses adequadas.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELMO, J. S. e LIMA, R. A. Identificação de metabólitos secundários no extrato etanólico das folhas de *Solanum jamaicense* (solanaceae) e seu potencial fungicida sobre *Candida albicans in vitro*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 1, p. 10, 2014.

ARAÚJO, M. E. Biossíntese de sesquiterpenos. Química de Produtos Naturais. **Departamento de Química e Bioquímica**. Universidade de Lisboa, (moodle.ciencias.ulisboa.pt/mod/resource/view.php?id=63772), 2012.

BESSA, N. G. F.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R., & ALVES, A. Preliminary phytochemical screening of native Cerrado plants of medicinal popular use by the rural community of the Vale Verde settlement-Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n.4, p. 692-707, 2013.

CORRÊA, J.A.M. Estudo químico de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos. Tese doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p.35, 2015.

CUNHA, A. P., Farmacognosia e Fitoquímica - Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Cap.5, p. 72-73, 2005.

CUSIDO, R. M., ONRUBIA, M., SABATER-JARA, A. B., MOYANO, E., BONFILL, M., GOOSSENS, A., PEDREÑO, M. A. & PALAZON, J. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. **Biotechnology Advances**. 2014.

FUMAGALI, E., GONÇALVES, R. A. C., MACHADO, M. F. P. S., VIDOTI, G. J. & OLIVEIRA, A. J. B. D. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GAHUKAR, R. T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. **Crop Protection**, v. 42, p. 202-209, 2012.

GHIMIRE, B.K.; YU, C.Y.; CHUNG, Ill-Min. Direct shoot organogenesis and assessment of genetic stability in regenerants of *Solanum aculeatissimum* Jacq. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 108, n. 3, p. 455-464, 2011.

GIACOMINI, L.L. Estudos taxonômicos e filogenéticos em *Solanum gonatotrichum* Bitter (Solanoideae, Solanaceae) no Brasil. [manuscrito] / Leandro Lacerda Giacomini, 121 f. : il. ; 29,5 cm. 2010.

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

GROTH, D. Caracterização morfológica das sementes e plântulas de seis espécies invasoras do gênero *Solanum* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, p. 25-48, 1989.

GUARIM NETO, G. and MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.4, p. 561-584, 2003.

IKENAGA, T.; HANDAYANI, R.; OYAMA, T. Steroidal saponin production in callus cultures of *Solanum aculeatissimum* Jacq. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 12, p. 1240-1244, 2000.

HUSSAIN, M. S., FAREED, S., SABA ANSARI, M., RAHMAN, A., AHMAD, I. Z. & SAEED, M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 4, n. 1, p. 10, 2012.

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.

KOHARA, Atsuko et al. Characterization and engineering of glycosyltransferases responsible for steroid saponin biosynthesis in Solanaceous plants. **Phytochemistry**, v. 68, n. 4, p. 478-486, 2007.

KRIS-ETHERTON, P.M., K.D. HECKER, A.B, S.M. COVAL, A.E. BINKOSKI, K.F. HILPERT, A.E. GRIEL, and T.D. ETHERTON. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American journal of medicine**, v.113, n. 9, p. 71-88, 2002.

LORENZI, H., Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas, Tóxicas e Medicinais. 2ª edição. Nova Odessa, SP: **Plantarum**, 1991.

MANOSROI, J. ; MANOSROI, A. ; SRIPALAKIT, P. Extração de solasodine de frutos secos e folhas de *Solanum laciniatum* ait. E a síntese do acetato de 16-dehydropregnenolone de solasodina por catálise de transferência de fase. In: **III Congresso WOCMAP em Plantas Medicinais e Aromáticas-Volume 5: Qualidade, eficácia, segurança, transformação e comércio em Medicinal 679**. p. 105-111, 2005.

MARTINS, G.Z. Estudo Farmacognóstico e *Screening* Biológico de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Solanaceae) / Gilmarcio Zimmermann Martins. – Araraquara, 2013172 f. 2013.

MENTZ, L. A.; OLIVEIRA, P. L. ***Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil**. Pesquisas, Botânica, n. 54. Instituto Anchieta de Pesquisas. 327p. Il. 2004.

MOLA, J. L.; ARAUJO, E. R. e de MAGALHÃES, G. C. de. Solasodine from solanum species of the federal district. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 460-462, 1997.

MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; & SILVA, A.S. Aplicações da Cultura de Tecidos EM PLANTAS Medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.

MURTHY, H. N., LEE, E. J. e PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, p. 1-16, 2014.

NABETA, K. *Solanum aculeatissimum* Jacq: in vitro culture and the production of secondary metabolites. In: **Medicinal and Aromatic Plants V**. Springer Berlin Heidelberg, p. 329-341. 1993.

NIEMEYER, H. Muestreo cuantitativo de alcaloides en especies de la flora nativa vascular de Chile: consideraciones biogeográficas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 1, 2014.

PATEL, H. e KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in plant tissue culture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 2, p. 60–65, 2013.

PEREIRA, A.C.; OLIVEIRA, D.F.; FIGUEIREDO, H.C.P; CAVALHEIRO, A.J.C.; CARVALHO, D.A. Identificação de uma das substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana de *Solanum aculeatissimum* Jacq. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

RAMAKRISHNA, A. & RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signal Behav**, v. 6, p. 1720-1731, 2011.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-13, 2001.

ROSSATO, A. E.; PIERINI, M. M.; AMARAL, P. A.; SANTOS, R. R.; CITADINI, V. Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos. **Fitoterapia Racional**, v.1, p.211, 2012.

SANTOS, M. M., Nunes, M. G. S., & Martins, R. D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 327-334, 2012.

SIDHU, Y. In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture. **The Plymouth Student Scientist**, v. 4, p. 432-449, 2010.

SILVA, T. M. S. D., Carvalho, M. G. D., Braz-Filho, R., e Agra, M. D. F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2003.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEI E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A., PETROVICK P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SOUZA, G. S. Desenvolvimento vegetativo, características anatômicas e fitoquímicas de plantas jovens de duas espécies de guaco, submetidas a diferentes condições de

qualidade de radiação. Tese doutorado – Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2014.

STEHMANN, J.R., Mentz, L.A., Agra, M.F., Vignoli-Silva, M., Giacomini, L. Solanaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB014718>), 2010.

SULTAN, A.; RAZA, A.R. Steroids: A Diverse Class of Secondary Metabolites. **Medicinal Chemistry**, v. 2015, 2015.

WU, J.J.; SHI, Y.; TIAN, W.S. Facile synthesis of solasodine based on a mild halogenation-ring opening reaction of spiroketals in steroidal saponins. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 10, p. 1215-1217, 2015.

YENDO, A. C.; DE COSTA, F.; GOSMANN, G.; & FETT-NETO, A. G. Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields. **Molecular Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 94-104, 2010.

ZHAO, J., DAVIS, L. C. & VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, n.4, p. 283–333, 2005.

OBJETIVO GERAL

Avaliar e potencializar o processo de produção do metabólito solasodina por meio do cultivo *in vitro* de calos e plântulas de *Solanum aculeatissimum* Jacq., verificando o efeito da luminosidade e doses de cinetina, para avaliar a melhor alternativa de potencialização na produção do metabólito e sua influência no crescimento e resposta histoquímica *in vitro*, comparada com as quantidades obtidas nos tecidos das folhas e frutos em campo, como fonte de matéria-prima na produção de medicamentos esteroides.

CAPÍTULO 1 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SOLASODINA EM CALOS E PLÂNTULAS DE *Solanum aculeatissimum* JACQ. CULTIVADOS *IN VITRO* SOB DIFERENTES QUALIDADES DE LUZ.

Luciana Arantes Dantas¹, Fabiano Guimarães Silva², Paulo Sérgio Pereira² Lucas Anjos de Souza², Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho², Aurélio Rubio Neto².

¹Mestranda, Agroquímica, IF Goiano; ²Prof. Dr. IF Goiano/Rio Verde – GO

RESUMO

Solanum aculeatissimum é uma planta anual de distribuição em todo Brasil, invasora de pastagens. O metabólito solasodina presente em folhas, caules e frutos tem sido relatado como esteroide precursor valioso para a fonte complementar da comercial síntese de vários medicamentos esteroides. Existe número limitado de relatos referente à cultura de tecidos para esta planta, apesar que nunca houve cultivo para qualquer tipo de propriedade econômica voltada a essa espécie. O presente trabalho teve como objetivo produzir solasodina em cultivo *in vitro* a partir de calos e plântulas de *S. aculeatissimum* como fonte de matéria-prima na produção de medicamentos esteroides, avaliando o efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento, seu metabolismo e a histologia dos calos obtidos. O estabelecimento *in vitro* foi realizado por meio da germinação das sementes em meio MS 50% da concentração dos sais para a obtenção de plântulas, estas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas de radiação fotossinteticamente ativa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidos por lâmpadas fluorescentes. Para a avaliação do efeito da dose cinetina e luminosidade na indução de calos, foi delineado um experimento inteiramente ao acaso, contendo 4 doses de cinetina (KIN): 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 mg L^{-1} e na ausência e presença de luz. Dessa forma, para cada tratamento, 4 segmentos foliares de 1 cm^2 , oriundos do material estabelecido *in vitro*, foram inoculados em frascos de vidro contendo 40 mL de meio MS 50%, 30 g L^{-1} de sacarose, 3,5 g L^{-1} de Ágar e 1 mg L^{-1} de 2,4-D, pH ajustado para $5,7 \pm 0,03$. A viabilidade celular dos calos foi monitorada utilizando o corante azul de Trypan. Avaliaram-se também os diferentes espectros de luz [branca (300-750 nm), azul (400-490 nm), verde (490-560 nm), amarelo (560-590 nm) e vermelho (600-700 nm)] sobre o crescimento e na produção de solasodina em plântulas e calos estabelecidos. A quantificação do metabólito foi realizada em HPLC. Os resultados encontrados demonstraram que a luminosidade influenciou o crescimento de calos independente da dose de cinetina utilizada, sendo a condição do escuro mais favorável. A qualidade espectral não influenciou na quantidade biomassa obtida para plântulas, porém em calos cultivados com 2,5 mg L^{-1} de KIN, o maior crescimento ocorreu sob a exposição da luz amarela. Em calos a produção de solasodina foi obtida pela exposição da luz vermelha e no escuro, em plântulas a quantidade produzida do metabólito foi bem inferior em comparação com os calos, não ocorrendo diferença na produção sob diferentes espectros. Ficou evidente que a escolha do cultivo de calos no escuro é uma alternativa para otimizar a produção de solasodina *in vitro* comparada com as quantidades obtidas no fruto em campo.

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecidos, comprimento de onda, alcaloide esteroidal.

CAPTER 1 – SOLASODINE PRODUCTION OPTIMIZATION IN CALLUS AND SEEDLING OF *Solanum aculeatissimum* JACQ. CULTIVATED IN VITRO UNDER DIFFERENT LIGHT QUALITIES.

Luciana Arantes Dantas¹, Fabiano Guimarães Silva², Paulo Sérgio Pereira² Lucas Anjos de Souza², Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho².

¹Graduate Student, IF Goiano; ²Prof. DSc. IF Goiano/Rio Verde – GO.

ABSTRACT

Solanum aculeatissimum is an annual distribution plant across Brazil, invading pastures. The selasodine metabolite present in leaves, stems and fruits has been reported as a steroid valuable precursor for complementary source of commercial synthesis of several steroidal drugs. There is a limited number of reports related to tissue culture for this plant, although there has never been cultivating for any kind of economic property facing this species. This study aimed to produce selasodine by *in vitro* cultivation of callus and seedlings of *S. aculeatissimum* as a source of raw material in the production of steroid medicines, assessing the effect of different cultivation conditions on growth, metabolism and histology of callus obtained. The *in vitro* establishment was performed by germination on MS medium 50% of the salts concentration for obtaining seedless they were maintained under 16 hour of photoperiod of photosynthetically active radiation of 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provided by fluorescent lamps. For evaluating the effect of kinetin dose and light on callus induction, was designed a randomized experiment, containing four doses of kinetin (KIN): 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg L^{-1} and in the absence and presence of light. Thus, for each treatment, four of 1 cm^2 leaf segments, derived from the materials set out *in vitro* were inoculated in glass bottles containing 40 mL of MS medium, 50%, 30 g L^{-1} sucrose, 3.5 g L^{-1} Agar and 1 mg L^{-1} 2,4-D, adjusted to $\text{pH } 5.7 \pm 0.03$. Callus cell viability were monitored using the Trypan blue dye. Also it was evaluated the different light spectra [White (300-750 nm), blue (400-490 nm), green (490-560 nm), yellow (560-590 nm) and red (600-700 nm)] on growth and production of solasodine in seedlings and established callus. Metabolite quantification was performed on HPLC. The results showed that light influenced the growth of callus kinetin dose, being the dark condition the most favorable. The spectral quality does not influence the amount of biomass obtained for seedlings, but callus grown with 2.5 mg L^{-1} KIN, the highest growth occurred in the exposure of the yellow light. In callus the solasodine production was obtained by exposure of red light and dark in seedlings the amount of metabolite produced was much lower compared to callus, there was no difference in production under different spectra. It is evident that the choice of calluses in the dark cultivation is an alternative to optimize solasodine production *in vitro* compared with the amounts obtained in the fruit in field.

KEY WORDS: tissue culture, wavelength, alkaloid steroidal. .

2.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Solanum* é o maior e mais complexo gênero da família Solanaceae, com cerca de 1500 espécies habitando sistemas ecológicos estabelecidos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo a América do Sul, o centro de diversidade e distribuição (SILVA et al., 2003).

S. aculeatissimum possui elevado número de acúleos em toda a planta. É popularmente conhecido como arrebenta-cavalo, arrebenta-boi, juá, joá, juá-bravo, juá-de-espinho, juá-melancia, mata-cavalo, a nomeação arrebenta-cavalo refere-se ao fato das sementes serem tóxicas aos equinos, podendo causar-lhes a morte. Planta daninha encontrada facilmente em pastagens e beira de estradas, em regiões tropicais e subtropicais do Brasil, começa a florescer em setembro, permanecendo com frutos até maio. É uma erva sublenhosa, atinge cerca de 50 cm de altura, o caule possui acúleos retos e amarelados, folhas grandes lobadas, com espinhos grandes nos pecíolos e nas nervuras principais (GROTH, 1989).

A presença relativamente elevada do composto esteroide solasodina em grande número de espécies do gênero *Solanum*, tem sido apontado como precursor valioso na conversão do composto de partida de 16-deshidropregmolona, que pode ser utilizado na produção semissintética de esteroides farmacêuticos e contraceptivos em várias partes do mundo (SILVA et al., 2003; MANOSROI et al., 2005). Vários procedimentos de isolamento de solasodina foram relatados a partir de folhas ou caule de *S. aculeatissimum* Jacq.

Devido algumas espécies de plantas conterem a presença de compostos químicos de interesse econômico para o desenvolvimento de novos produtos, a biotecnologia vem se destacando em todo o mundo, como por exemplo as indústrias farmacêuticas que buscam novas fontes e alternativas de drogas e fragrâncias de origem natural, a indústria alimentícia no fornecimento de aromatizantes e corantes, na agricultura na busca de fungicidas naturais e inseticidas. Produtos oriundos de plantas têm sido utilizados pela humanidade como medicamento desde a antiguidade, supõe-se que mais de 70% dos medicamentos derivados de plantas foram desenvolvidos a partir do conhecimento popular (SANTOS et al., 2012).

Para o sistema de produção, a cultura de células e tecidos pode ser alternativa para aumentar o rendimento desses compostos através do estudo da biossíntese vegetal, com isso essa técnica biotecnológica pode subsidiar estudos e no levantamento de

informações relevantes para aperfeiçoar a produção de fitoquímicos. Oliveira et al. (2009) também destaca a cultura de tecidos e células vegetais como alternativa para investigar a produção de diversos metabólitos secundários em plântulas, calos e suspensões celulares.

É conhecido que o grande potencial da cultura de calos produz grande variedade de metabólitos secundários, pois segundo Hussain et al. (2012) a produção torna-se mais confiável, simples e previsível. O isolamento do fitoquímico ocorre de maneira mais rápida e eficiente, quando comparado com a extração a partir de plantas completas. Entretanto, há situações em que a produção requer células diferenciadas ou culturas de órgãos (MURTHY et al., 2014).

Os agentes responsáveis pela ativação e indução da resposta celular nas plantas são denominados elicitores, este processo é responsável pela indução da resistência vegetal envolvendo mecanismos bioquímicos de defesa existentes por causa da resposta à exposição de agentes bióticos e abióticos (BONALDO et al, 2005; CAVALCANTI et al., 2005). Esta elicitação é um processo para induzir ou aumentar a síntese de metabólitos secundários de plantas. É um dos métodos estabelecidos mais eficazes para melhorar a produção de metabólitos secundários *in vitro* (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013).

Segundo Ramachandra e Ravishankar (2011) a elicitação é baseado no conceito de que metabólitos secundários são produzidos pela planta como parte de sua defesa contra o ataque de patógenos e são eficazmente produzidos em determinadas culturas. Quando as plantas estão estressadas, a produção de metabólitos secundários pode aumentar porque o crescimento é muitas vezes inibido mais do que a fotossíntese, e o carbono fixo é predominantemente alocado para síntese de metabólitos secundários.

A utilização de células e tecidos vegetais para a produção de compostos naturais ou recombinantes de interesse comercial ganha cada vez mais atenção (HUSSAIN et al., 2012). Recentemente Ahmad (2016) avaliou o efeito de várias luzes espectrais na acumulação de biomassa e na produção de metabólitos secundários, citando a utilização de luzes coloridas como estratégia promissora para a produção melhorada de metabólitos.

Diante do exposto esse trabalho tem como objetivo avaliar a produção de solasodina por meio do estabelecimento *in vitro* de plântulas e calos, em função de cintenina (KIN) e condições de luminosidade. O teor de solasodina do material *in vitro* foi comparado com folhas e frutos coletados em campo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material Vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO. Os frutos de *Solanum aculeatissimum* foram coletados no mês de dezembro de 2014 nas coordenadas 17° 48' 343'' S - 50° 54' 005'' W, altitude 616 m. A identificação da espécie estudada foi efetuada pelo Prof. Dr. João Renato Stehmann, da Universidade Federal de Minas Gerais – Herbário BHCB, na cidade de Belo Horizonte - MG. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Instituto Federal Goiano - *Campus* Rio Verde, sob registro número 496.

Os frutos foram coletados, selecionados e cortados e, então foram acondicionados em bandejas plásticas para secagem em estufa de circulação forçada com temperatura constante de 40 °C durante 48 horas. Após o período de secagem as sementes foram retiradas e armazenadas para estabelecimento do material *in vitro* (Figura 1).



Figura 1: Frutos recém coletados (A); Corte dos frutos (B); Frutos distribuídos em bandeja na estufa para secagem (C); Frutos secos após um período de 48 h de secagem (D). (Barra igual a 4,0 cm de comprimento). Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015.

Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento de plântulas *in vitro*, foi utilizado meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo 50% da concentração de sais, 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de Ágar (Marca Dinâmica[®]) e pH ajustado para 5,7 ± 0,03. Em cada tubo de ensaio (25 x 150 mm), foi adicionado 10 mL de meio e então os tubos foram vedados com tampa plástica de polipropileno e submetidos a autoclavagem a 121 °C sob pressão de 1,05 kg cm⁻² durante 20 minutos. Após a autoclavagem, os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 3 °C, umidade relativa de 45% até o momento da inoculação das sementes *in vitro* (Figura 2-D)

Previamente à inoculação das sementes *in vitro*, as mesmas foram desinfestadas, revestidas com gaze e imersas em água corrente durante 30 minutos, seguido de imersão em álcool 70% por 1 minuto e em seguida imersas em solução de hipoclorito de sódio - NaOCl (água sanitária comercial – 2,5% de cloro ativo) contendo uma gota de Polissorbato (Tween) por 15 minutos. Posteriormente, em fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada para eliminação de resíduos das soluções utilizadas anteriormente na desinfestação, e inoculadas *in vitro* (Figura 2-A).

As plântulas produzidas (Figura 2-B) eram transferidas a cada 30 dias para um novo meio de cultivo, idêntico ao utilizado para germinação das sementes (Figura 2-C e E). Após a germinação, as plântulas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas de radiação fotossinteticamente ativa de 45-55 μmol m⁻² s⁻¹, fornecidos por lâmpadas fluorescentes.

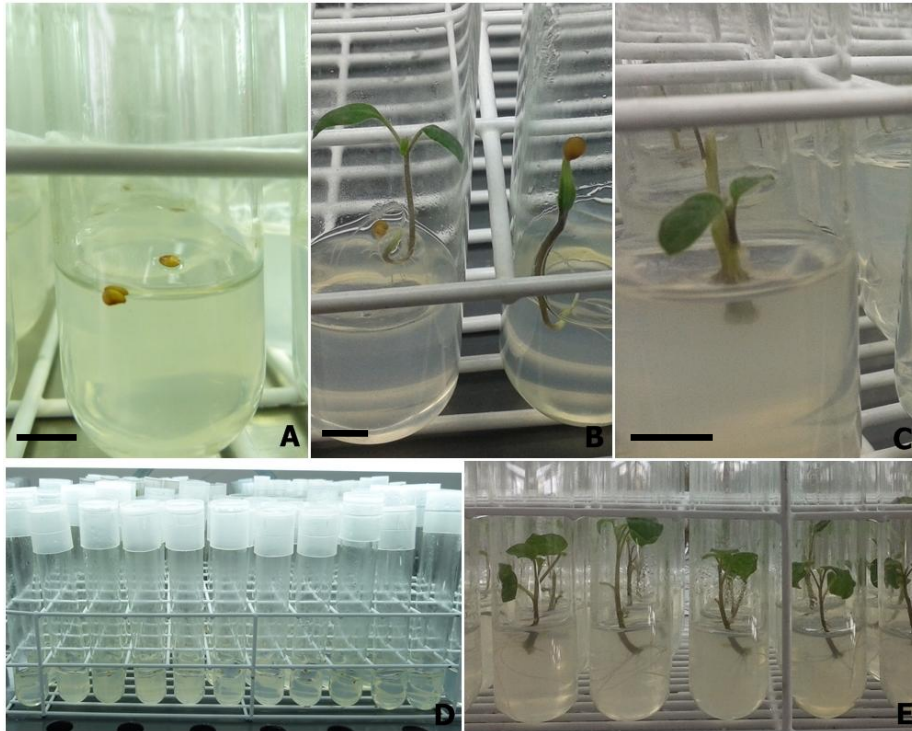


Figura 2: Sementes inoculadas (A); Plântulas produzidas (B); segmento nodal utilizado para multiplicação (C); tubos de ensaio com tampas de polipropileno contendo meio MS 50% usados na germinação de sementes (D); plântulas estabelecidas após 15 dias de subcultivo (E). (Barra igual a 1,0 cm de comprimento). Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015.

2.2.2 Indução de calos em *Solanum aculeatissimum* Jacq.

Para a indução de calos foi delineado um experimento inteiramente casualizado (DIC), com fatorial (2x4) sendo 2 exposições (claro e escuro) x 4 concentrações de cinetina KIN (2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 mg L⁻¹). Dessa forma, para cada tratamento, 4 segmentos foliares de 1 cm² (Figura 3-A), oriundos do material estabelecido *in vitro*, foram inoculados em frascos contendo 40 mL de meio MS 50% (Figura 3-B), 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de Ágar e 1 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), pH ajustado para 5,7 ± 0,03. Os calos induzidos (Figura 3-C) com seus respectivos tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com as mesmas condições descritas no estabelecimento *in vitro*.

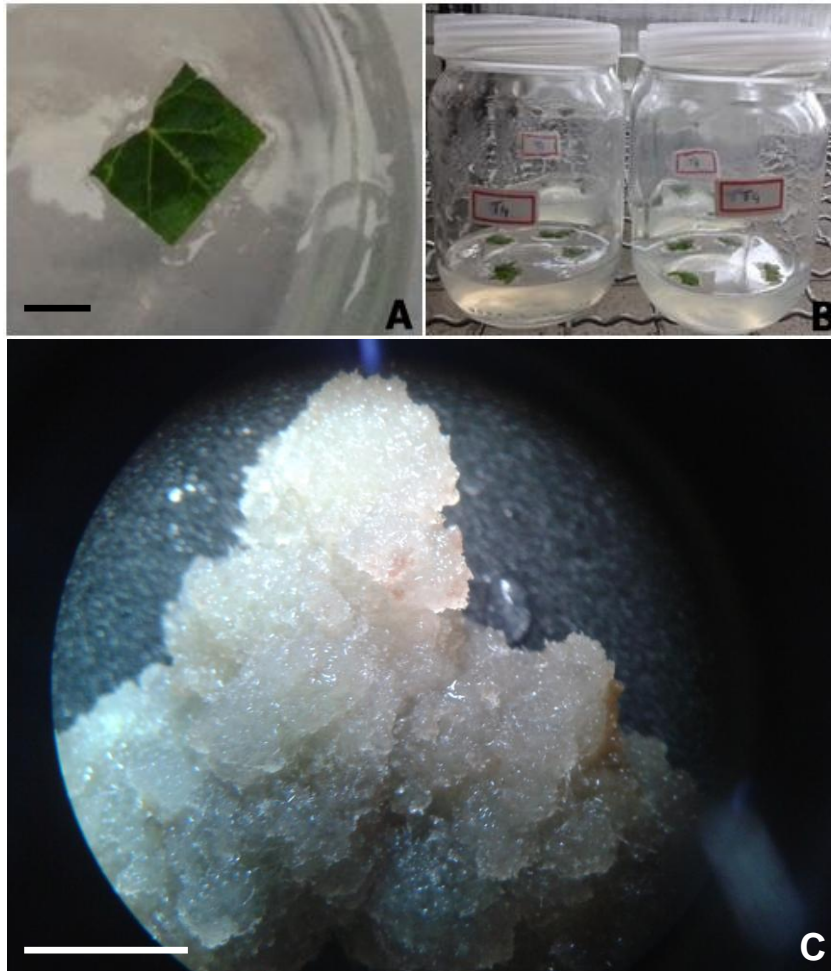


Figura 3: Segmento de 1 cm² de folhas de *S. aculeatissimum* utilizados na indução de calos (A); segmentos foliares utilizados na indução dos calos em frascos de vidro com tampa de polipropileno (B); calo friável induzido (C). (Barra igual a 0,5 cm de comprimento). Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015.

2.2.3 Manutenção e multiplicação dos calos

Aproximadamente 10 mg de calos friáveis, obtidos como descrito anteriormente, com 90 dias de cultivos, foram excisados e acondicionados em microtubo de 1,5 mL, a esse tubo foi adicionado 1 mL de água destilada que, então foi agitado com pipeta até a completa fragmentação do calo, gerando, então, uma solução de suspensão celular. Em um novo microtubo de 1,5 mL foi adicionado 0,1 mL da suspensão celular e 0,1 mL de corante Trypan Blue (SIGMA-Aldrich, Brasil) a 0,2 % (v/v). Após 10 minutos, foi retirada uma alíquota de 10 µL que foi transferida para lâminas e cobertas com lamínula de vidro para contenção da suspensão. As células foram contadas em microscópio ótico

com 100 x de aumento (Marca: LEICA DM500), acoplado a uma câmara fotográfica (Marca: LEICA ICC₅₀).

2.2.4 Histoquímica

Os testes histoquímicos foram realizados para detecção de compostos pertencentes ao metabolismo primário e secundário de folhas e calos induzidos após 30 dias de *S. aculeatissimum* Jacq. Os cortes de folhas e calos, *in natura*, foram realizados manualmente com o uso de navalha descartável.

Folhas de aproximadamente 8 cm coletadas em campo foram comparadas com folhas cultivadas *in vitro*, juntamente com calos obtidos após 30 dias de indução (Figura 4) suplementados nas duas concentrações de KIN: 2,5 e 10 mg L⁻¹; no claro e escuro.

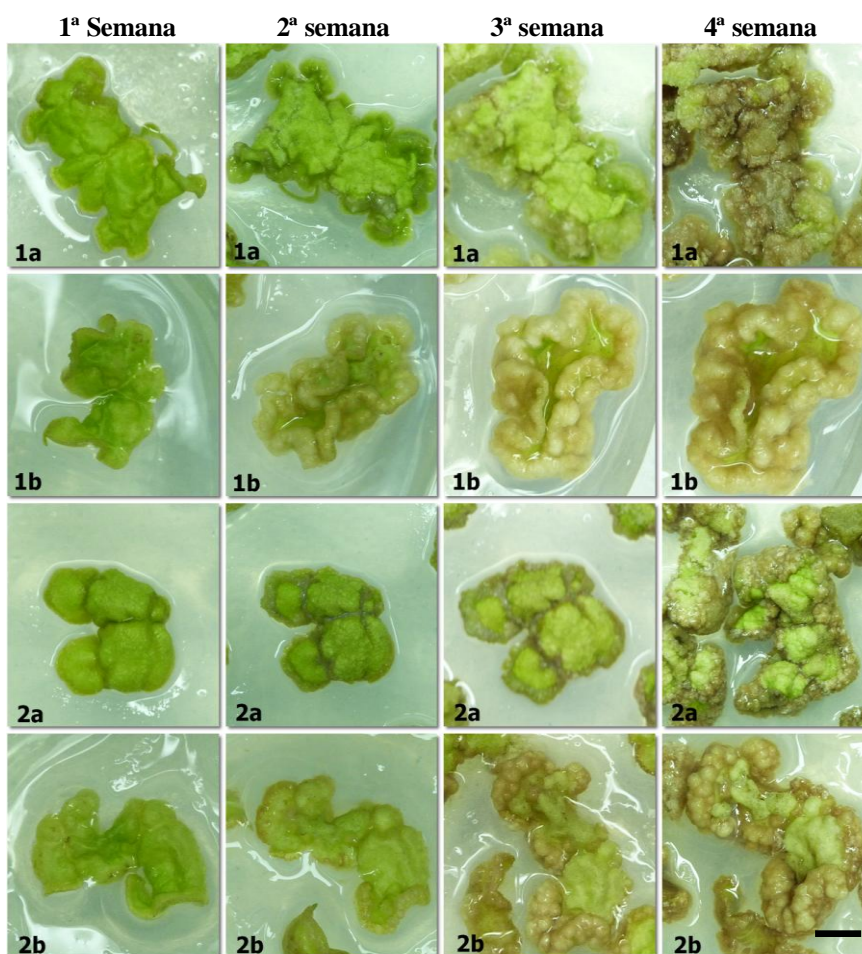


Figura 4: Indução dos calos durante 4 semanas em meio MS 50% suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) – 1mg L⁻¹ e KIN (**1:** 2,5 mg L⁻¹; **2:** 10 mg L⁻¹); **a:** Cultivados no claro; **b:** Cultivados no escuro. Barra= 0,5 cm.

Para a identificação de compostos do metabolismo primário, foram utilizados os reagentes Sudan III para detecção de lipídios (Johansen, 1940), Xilidine Ponceau (XP) para proteínas totais (O'brien e Mccully, 1981) e Reagente de Schiff (PAS) para carboidratos totais (Maia, 1979). Para identificação de compostos do metabolismo secundário, foram utilizados os reagentes dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) para compostos fenólicos (Gabe, 1968), $AlCl_3$ para flavonóides em luz UV, reagente de Nadi para avaliação de terpenos (óleos essenciais e ácidos resínicos) (David e Carde, 1964), reagente de Wagner para compostos Nitrogenados/Alcaloides (Furr e Mahlberg, 1981).

O estudo histológico com imagens foi obtido em microscópio óptico (modelo BX61, Olympus) com sistema U-photo para obtenção e edição das fotomicrografias.

2.2.5 Crescimento de plântulas e calos cultivados sob variação de luzes contendo diferentes comprimentos de onda

Plântulas micropropagadas em meio MS 50%, 30 g L⁻¹, 3,5 g L⁻¹ ágar e pH 5,7 ± 0,03, de aproximadamente 6 cm, 2 pares de folhas e com 15 dias (Figura 5) nas condições descritas anteriormente, foram acondicionados em armário iluminado (Figura 6) contendo diferentes demandas de luz: branca (300-750 nm), azul (400-490 nm), verde (490-560 nm), amarelo (560-590 nm) e vermelho (600-700 nm). Para cada tratamento de luz foram utilizadas 20 repetições.

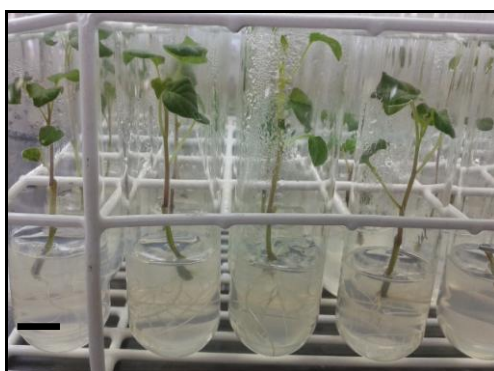


Figura 5: Plântulas de *S. aculeatissimum* após 15 dias de subcultivo. (Barra igual a 1,0 cm de comprimento). Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015.

Após a quinta repicagem calos micropropagados foram cultivados durante 15 dias da mesma forma como descrito acima, para explantes; após esse período os calos foram transferidos para o mesmo armário descrito acima; porém, havendo um tratamento isento de qualquer luminosidade, ou seja, escuro. Para cara tratamento de luz foram utilizadas 4 repetições com 5 calos.

Tanto as plântulas como os calos, foram mantidos nos tratamentos de diferentes luminosidades durante 30 dias e, então, foram coletados e suas massas aferidas.

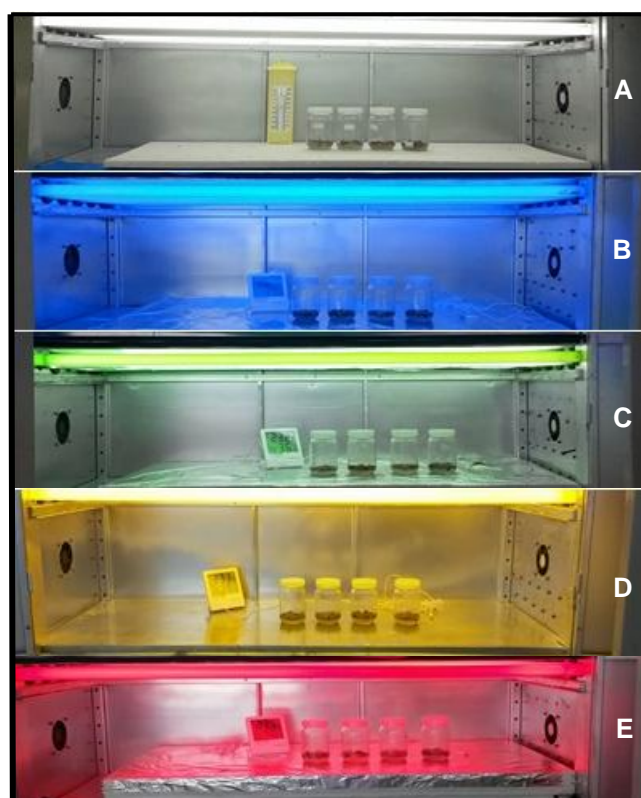


Figura 6: Armário de luz contendo diferentes comprimentos de onda: branca A (300-750 nm), azul B (400-490 nm), verde C (490-560 nm), amarelo D (560-590 nm) e vermelho E (600-700 nm). Foto: Luciana A. Dantas. Rio Verde – GO, 2015.

2.2.6 Quantificação de solasodina por HPLC

Após 120 dias de cultivo, plântulas e calos obtidos foram submetidos à secagem a 40 °C em estufa de ventilação forçada até peso constante. Na extração utilizou-se 0,2 g

em 5 mL de metanol de grau HPLC (Neon®) em banho ultra-sônico (30min) e posterior filtração, o filtrado foi acondicionado em geladeira em frascos tipo vials para aguardar as análises. Os frutos e folhas passaram pelo mesmo processo de secagem e extração.

O solvente utilizado primeiramente foi o metanol grau HPLC (Neon®), e solução ácido acético 0,1% em água ultrapura obtida do sistema (Direct-Q® 3UV). Os extratos foram injetados em 20 µL simultaneamente em dois comprimentos de onda, a 210 nm e 212 nm. O fluxo da eluição foi ajustado ao fluxo de 1 mL/min, com a fase móvel A de ácido acético 0,1% e fase móvel B metanol grau HPLC (Neon®). Após todo o ajuste não foi possível a detecção da solução padrão de solasodina.

Em outra tentativa, secundariamente, o metanol foi substituído por acetonitrila (Neon®) nas mesmas condições, realizando a leitura somente a 210 nm, neste caso foi possível captar o sinal do padrão de solasodina.

As amostras foram filtradas em filtros Millipore 0,45 µm. A coluna cromatográfica LC18 (250 mm x 4,6mm, 5µm Supelcosil® Supelco), acoplada com pré-coluna LC18, 2 cm (Supelguard, Supelco) com forno ajustado a 30 °C.

As análises em HPLC-UV foram executadas no equipamento Shimadzu® equipado com detector fotodiodo com lâmpada de deutério e tungstênio com os módulos: degaseificador (DGU-20A5r), bomba quaternária (LC-20AT), sistema injetor (SIL-20A HT), coluna cromatográfica (CTO- 20A), detector fotodiodos (SPD-M20A), interface CMB-20A).

Foram injetados 20 µL de cada amostra e detectadas simultaneamente no comprimento de onda de 210 nm. O fluxo da eluição foi 1 mL min⁻¹. O sistema de eluição foi isocrático totalizando a corrida em 17 min.

A Solasodina padrão foi utilizada para a obtenção da Curva de Calibração (MANOSROI, 2005).

Foi realizado análise de variância com probabilidade de 5% de significância, teste de comparação de médias e análise de regressão. Os detalhes de cada teste estão descritos na legenda de cada resultado.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Indução e crescimento de calos

Calos cultivados em meio MS 50%, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de KIN apresentaram menor capacidade de crescimento no escuro em relação aos calos cultivados em presença de luz, entretanto, a capacidade de crescimento no escuro se tornou maior quando os calos foram cultivados nas doses de 7,5 e 10,0 mg L⁻¹ de KIN (Figura 7). Desse modo, pelas análises realizadas determinou-se que a melhor capacidade de crescimento foi no tratamento contendo 10 mg L⁻¹ de KIN e em escuro.

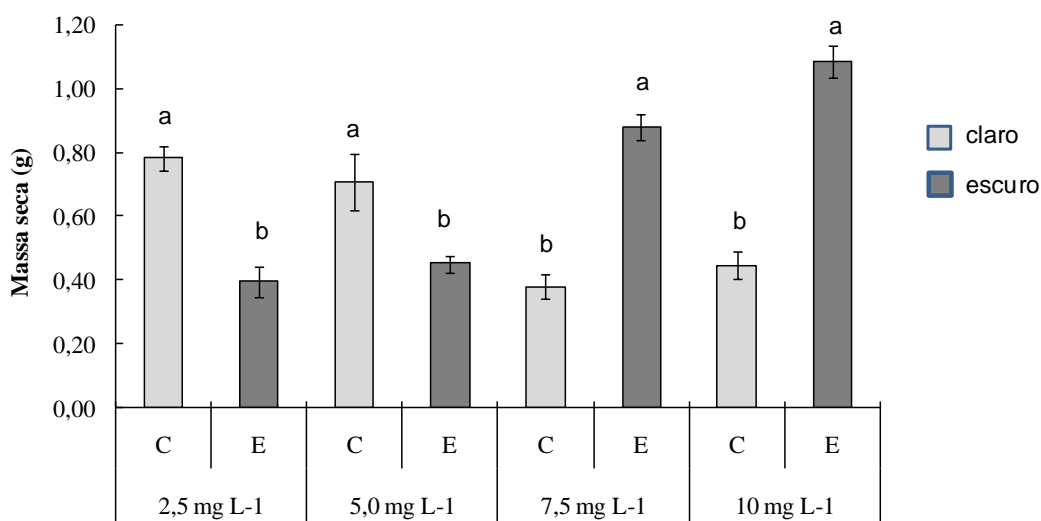


Figura 7: Massa seca de calos de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivados no claro (C) e no escuro (E) com diferentes doses de KIN (2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹). As médias foram comparadas entre claro e escuro dentro de cada dose pelo teste de Tukey a 5%. As barras indicam o erro padrão das médias.

Analisando a capacidade de crescimento dos calos, na presença e ausência de luz, observa-se que sob iluminação ocorreu diminuição da capacidade de crescimento à medida que elevou a concentração de KIN, enquanto o cultivo no escuro favoreceu o crescimento dos calos em concentrações mais elevadas (Figura 8). Em ambos os casos a tendência foi linear.

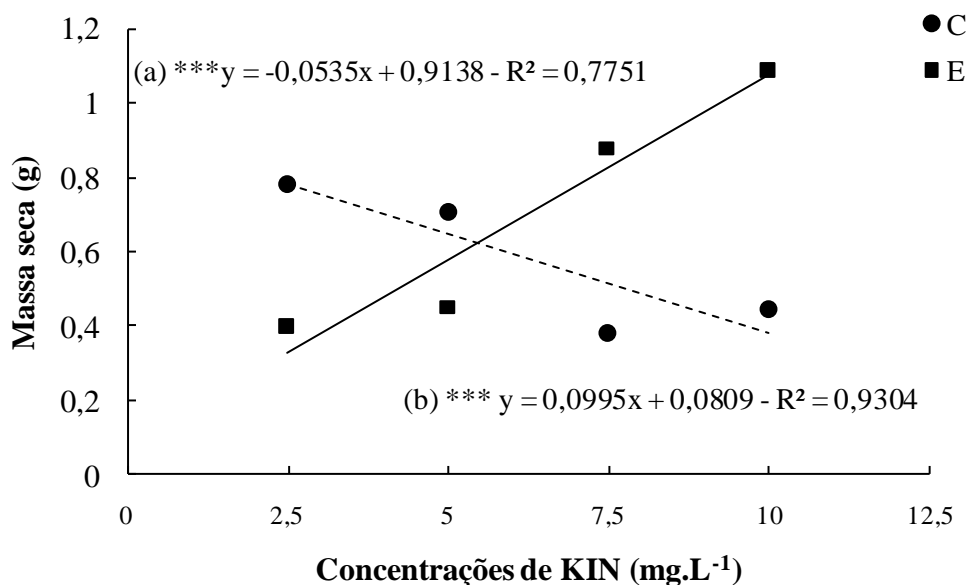


Figura 8: Massa seca de calos de *S. aculeatissimum* Jacq. em resposta a diferentes doses de KIN (2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹) cultivados em no claro (C) e no escuro (E). A equação (a) representa a regressão linear para calos crescidos no claro (C), a equação (b) representa a regressão linear para calos crescidos no escuro (E). *** p<0,001.

Com resultados diferentes no crescimento de calos de *S. aculeatissimum*, Ikenaga (2000) induziu calos em diferentes concentrações de KIN (0,01; 0,1; 1 e 10 ppm) cultivados no claro e no escuro, e os resultados obtidos demonstraram que os calos friáveis foram estimulados em concentrações mais elevadas quando cultivados no escuro, porém as variações de doses não afetaram o crescimento dos calos.

Na indução de calos e embriões somáticos em *Carica papaya* L., Almeida (2001) avaliou o tipo de explante e o meio de cultivo sob condições de fotoperíodo de 16 horas e no escuro, os resultados mostraram que nas duas condições de luminosidade a indução do calo foram equivalentes, porém o autor obteve maior resultado de crescimento em calos cultivados no escuro. Da mesma forma, a avaliação do crescimento dos calos de *S. aculeatissimum* também apresentou resultados similares.

2.3.2 Crescimento de plântulas e calos cultivados sob diferentes luzes com diferentes comprimentos de onda

Após 15 dias de crescimento sob diversos comprimentos de onda, a massa fresca de plântulas foi avaliada, sendo que não houve diferença. Mesma observação foi constatada a massa seca (Figura 9).

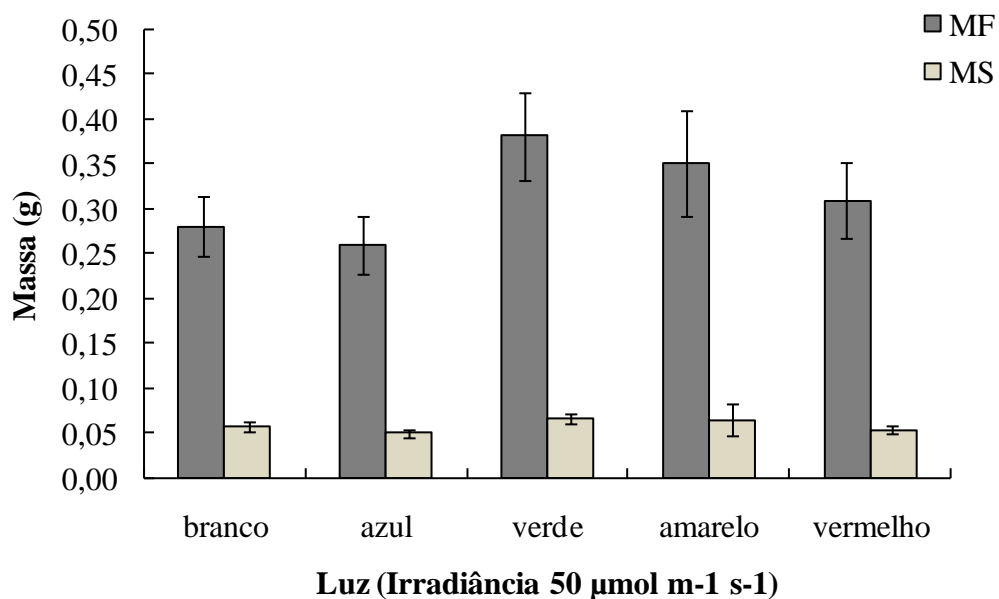


Figura 9: Massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivadas durante 15 dias em diferentes comprimentos de onda. A análise de variância não foi significativa. As barras indicam o erro padrão das médias.

O aumento de massa fresca de calos foi maior quando os mesmos foram expostos à luz amarela, enquanto a menor produção de massa fresca foi observada em calos mantidos em escuro. Os demais comprimentos de onda estudados (branca, azul, verde e vermelho) apresentaram a produção de biomassa igual aos tratamentos de luz amarela e escuro (Figura 10). Já em relação a produção de massa seca, não houve influência da exposição ou não de luz bem como a incidência de diferentes comprimentos de onda (Figura 11).

No cultivo de *Stevia rebaudiana*, Amahd et al. (2016) investigou o efeito de várias luzes espectrais na acumulação de biomassa e produção de metabólitos secundários, segundo o estudo, a luz branca foi a que obteve maior eficácia tanto na calogênese quanto no acúmulo de biomassa do que nas luzes coloridas, os resultados foram semelhantes, diferente dos resultados obtidos nesse experimento. Segundo o autor o uso de luzes coloridas é uma importante estratégia na produção de biomassa e na produção de compostos bioativos, porém não há muitos relatos utilizando diferentes luzes espectrais na indução de calos e no acúmulo de biomassa na espécie trabalhada.

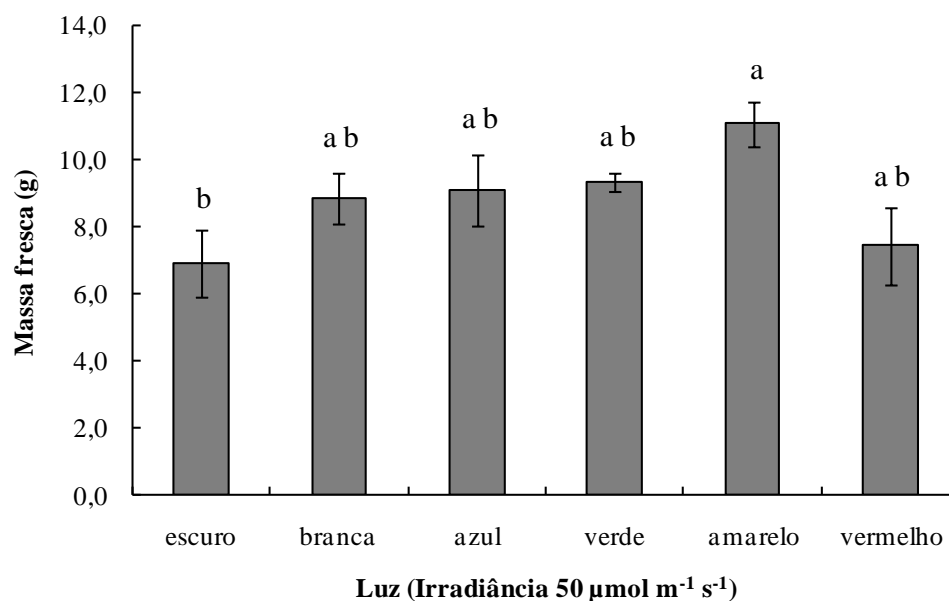


Figura 10: Massa fresca de calos de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivados durante 15 dias em diferentes comprimentos de onda. As barras indicam o erro padrão das médias.

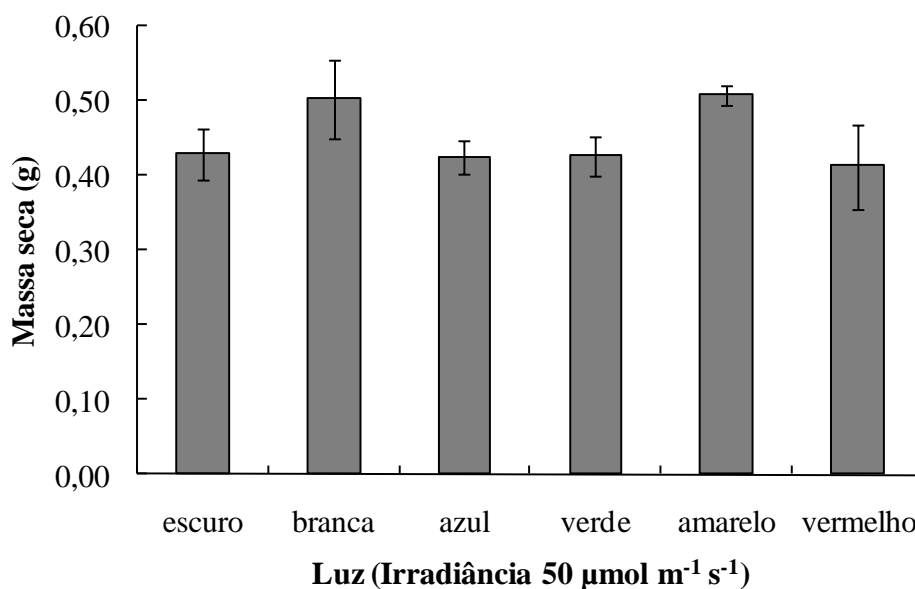


Figura 11: Massa seca de calos de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivados durante 15 dias em diferentes comprimentos de onda. A análise de variância não foi significativa. As barras indicam o erro padrão das médias.

O estudo de Tariq et al. (2014) descreve que a luz é um fator físico que influencia positivamente na indução e na proliferação de *Artemisia absinthium* L., concluindo que diferentes exposições de luz podem ajudar a melhorar o crescimento e o desenvolvimento na produção *in vitro*.

2.3.3 Histoquímica

Em todas as amostras de folhas *in vivo* e *in vitro* e em calos foi possível observar a coloração rósea (Figura 12) pela presença de amido e polissacarídeos da parede celular e em tricomas glandulares de cabeça secretora. Teste similar foi realizado em calos de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Frederiq & Hommersand mostrando uma ligeira reação positiva, indicando presença de material celulósico nas paredes celulares (BOUSON et al., 2011).

A presença de tricomas pode estar relacionada à proteção, considerando dois mecanismos: presença de substâncias provenientes do metabolismo secundário em glândulas secretoras e pela quantidade de tricomas presentes (JERBA et al., 2005). Além da coloração evidenciando carboidratos nos calos, observou a presença de grânulos sugestivos de amido em todos os calos cultivados.

Nogueira (2006) descreve a relação da ocorrência abundante de grãos de amido estar relacionada com o potencial embriogênico de calos de Murici-Pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), devido esse padrão bioquímico ser fonte de energia intensa na divisão celular e alta taxa respiratória, para o posterior desenvolvimento de embriões.

Nas folhas, foram observados lipídeos na região muito fina da cutícula foliar (Figura 13-A e B). A epiderme é a região em que se encontra a cutícula com fundamental função na sobrevivência da planta, revestindo esse tecido há presença de cutina com característica hidrofóbica dando a capacidade de evitar a perda de água em toda superfície da parte aérea da planta. Dependendo da espessura e da densidade da cutícula, podem ser mais resistentes ao ataque de patógenos, como no caso do tomate mutante com cutícula mais espessa tornaram-se resistentes a *Botritis cinerea* (REINAPINTO & YEPHREMOV, 2009).

Nos calos cultivados no claro (Figura 13-C e E) e no escuro (Figura 13-D e F) a presença de lipídeos encontra-se desorganizada na maioria das células, porém em algumas regiões dos calos do escuro nota-se certa organização e coloração mais intensa na região mais externa.

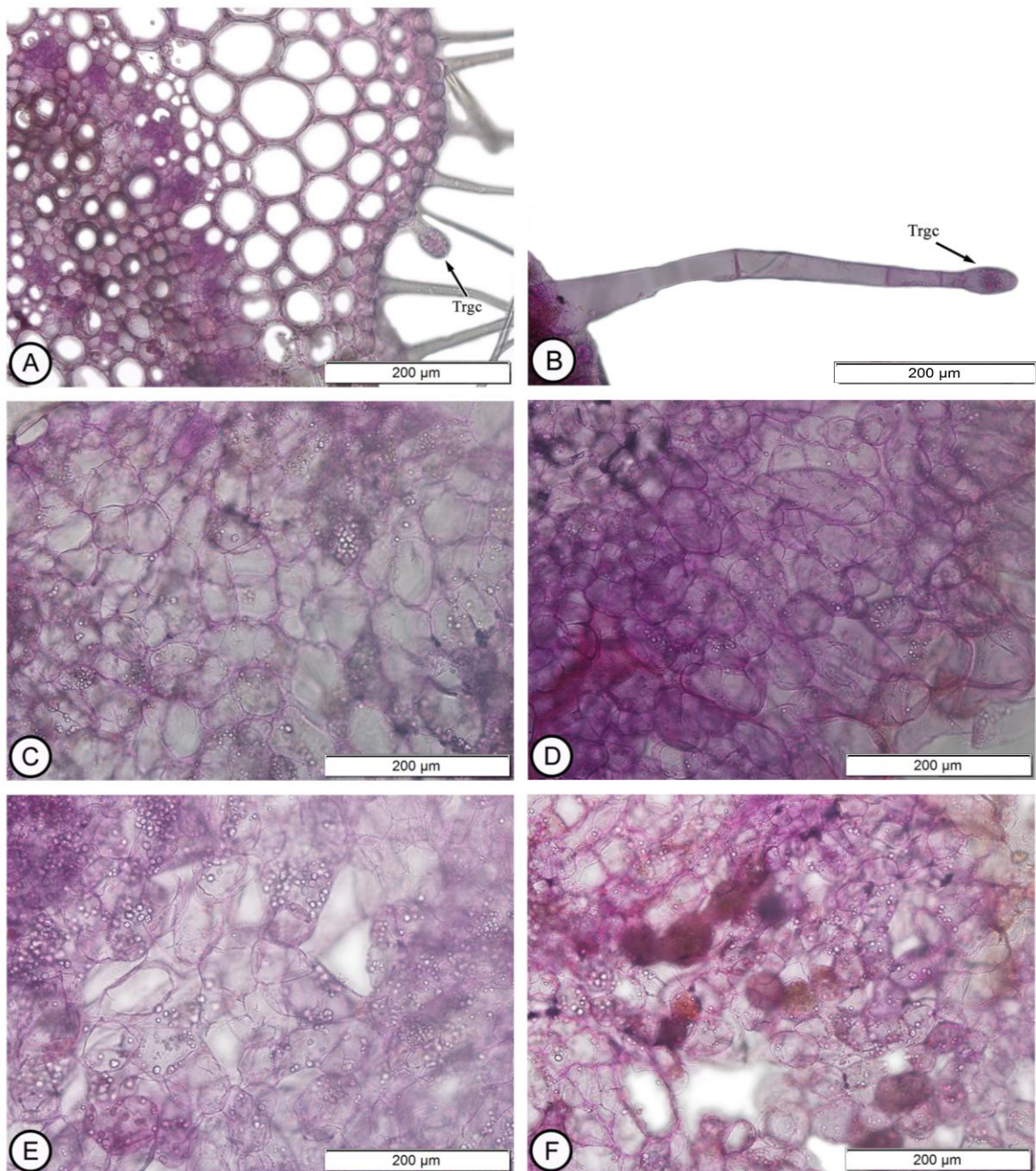


Figura 12: Secções transversais de folhas coletadas *in vivo* (A), folhas estabelecidas *in vitro* em meio MS 50% dos sais (B), calos cultivados no claro (C e E) e calos cultivados no escuro (D e F) ambos com as respectivas concentrações (2,5 mg L⁻¹ KIN; e: 10,0 mg L⁻¹ KIN) da espécie *S. aculeatissimum* Jacq. submetidos a coloração de Schiff para detecção de carboidratos. **Trgc:** Tricoma glandular com cabeça secretora.

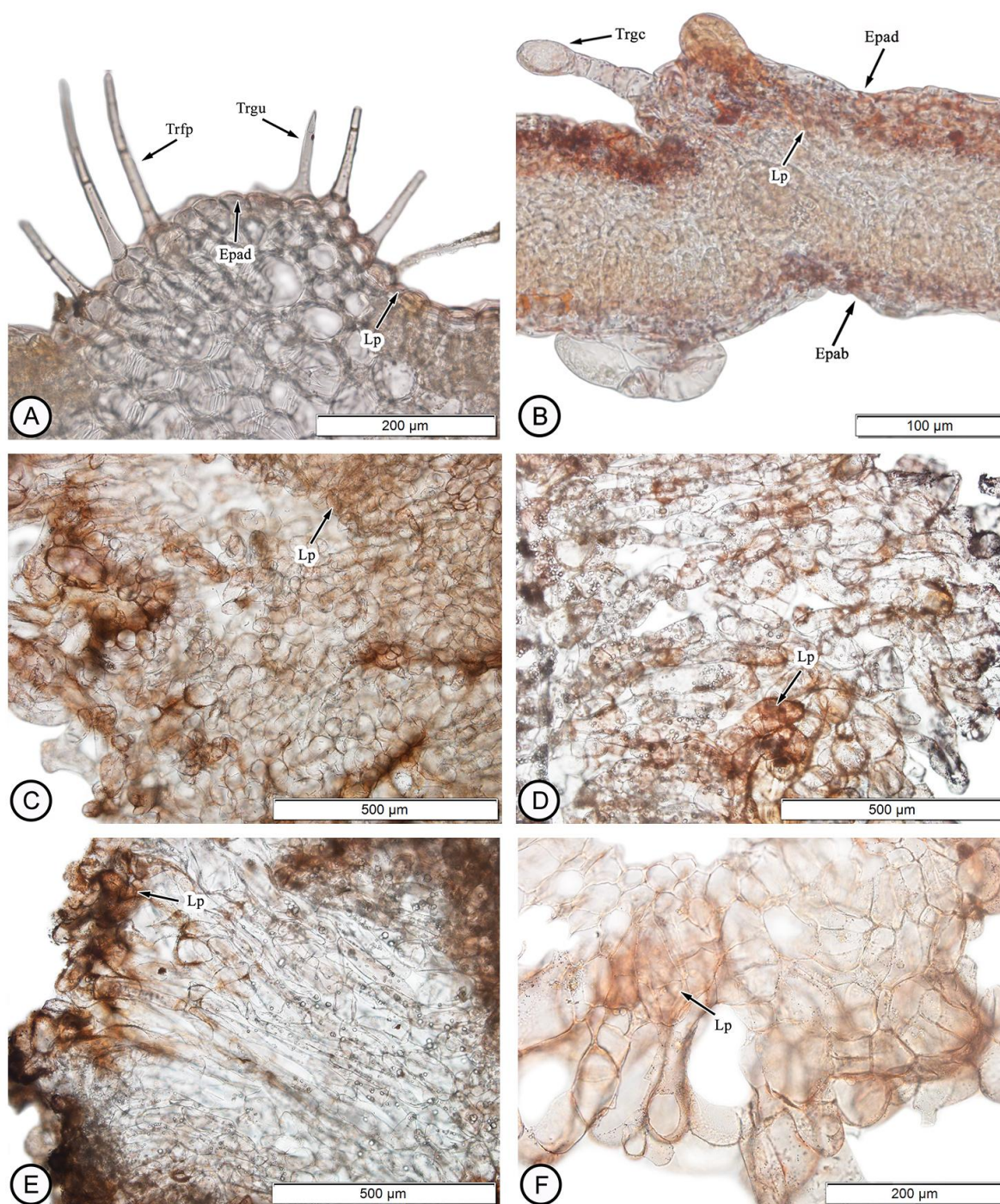


Figura 13: Secções transversais de folhas coletadas *in vivo* (A), folhas estabelecidas *in vitro* em meio MS 50% dos sais (B), calos cultivados no claro (C e E) e calos cultivados no escuro (D e F) ambos com as respectivas concentrações ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN; e: $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN) da espécie *S. aculeatissimum* Jacq. submetidos a coloração de Sudan III para detecção de lipídeos. **Trfp:** Tricoma filiforme pluricelular; **Trgu:** Tricoma glandular unicelular; **Trgc:** Tricoma glandular com cabeça secretora; **Epad:** Epiderme adaxial; **Epab:** Epiderme abaxial; **Lp:** Lipídeos.

Ainda observando o metabolismo primário, em todo o material analisado não detectou nenhuma coloração evidenciando presença de proteínas (Figura 14), resultado parecido foi obtido em folhas de *Solanum granuloso* (PICOLI et al., 2013).

Na detecção diferencial de compostos terpenoides, as misturas de óleos essenciais e ácidos resínicos são evidenciadas por uma coloração que vai de violeta a púrpura, de acordo com a predominância de um ou de outro componente. Segundo observação do corte da folha do campo é possível identificar presença de terpenos em tricomas filiformes e glandulares com cabeça secretora unicelular, além de toda a extensão da cutícula foliar. A secreção acumulada nos tricomas glandulares neste espaço permanece presa dando uma forma esférica ao tricoma (LIMA, 2010). Nas folhas cultivadas *in vitro* foram detectados somente a presença de terpenos na cabeça secretora de alguns tricomas glandulares (Figura 15).

Descrevendo sobre o significado fisiológico e ecológico na produção de compostos terpénicos e fenólicos de *Solanum elaeagnifolium*, Christodoulakis (2009) avalia que a produção desses compostos nas folhas é uma resposta defensiva contra condições de extrema aridez e temperatura.

Em calos a produção de compostos terpénicos foram bem evidentes em todos os tratamentos com exceção do calo cultivado no claro com KIN na concentração de 2,5 mg L⁻¹.

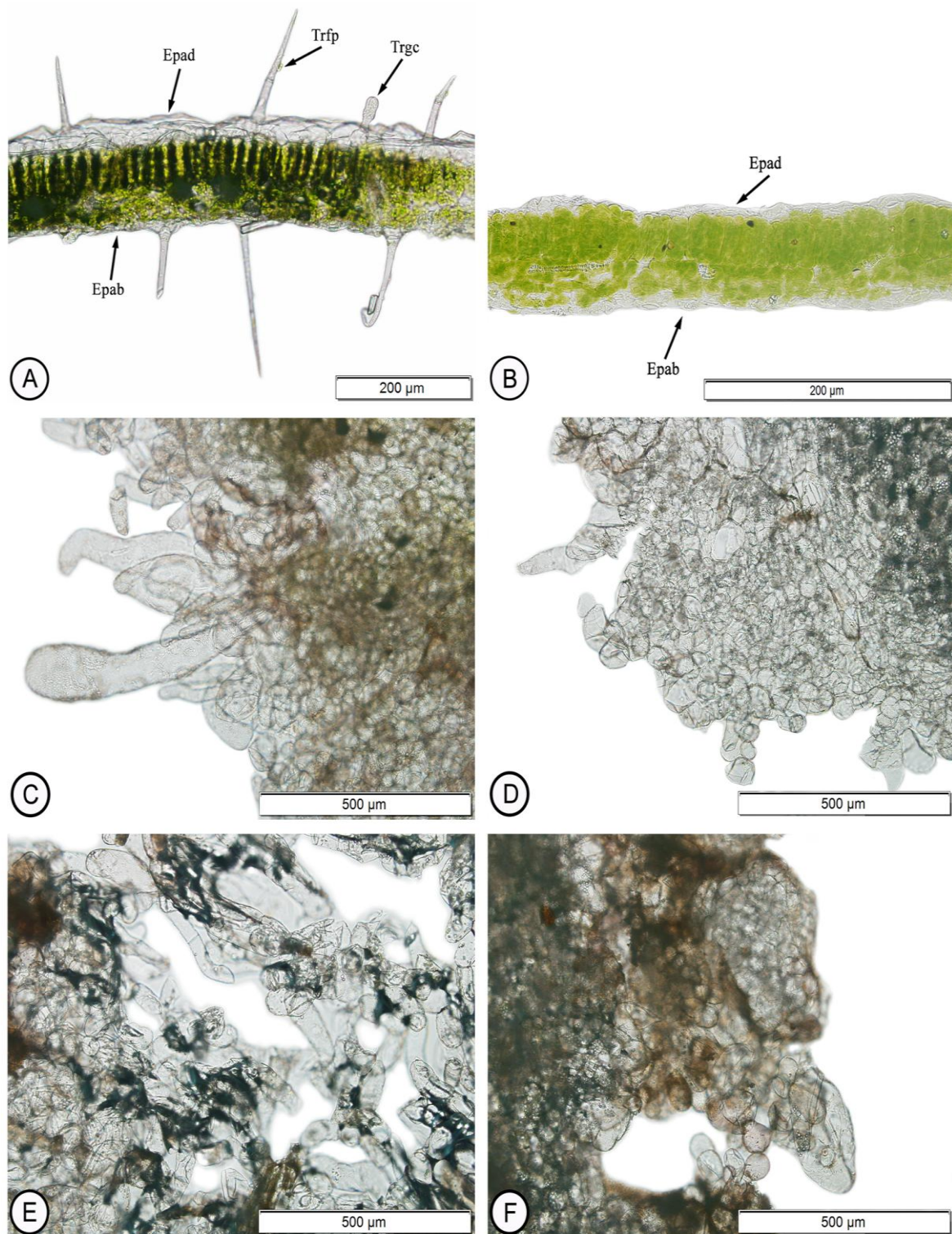


Figura 14: Secções transversais de folhas coletadas *in vivo* (A), folhas estabelecidas *in vitro* em meio MS 50% dos sais (B), calos cultivados no claro (C e E) e calos cultivados no escuro (D e F) ambos com as respectivas concentrações ($2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ KIN}$; e: $10,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ KIN}$) da espécie *S. aculeatissimum* Jacq. submetidos a coloração de Xilidine Ponceau (XP) para detecção de proteínas. **Trfp:** Tricoma filiforme pluricelular; **Trgc:** Tricoma glandular com cabeça secretora; **Epad:** Epiderme adaxial; **Epab:** Epiderme abaxial.

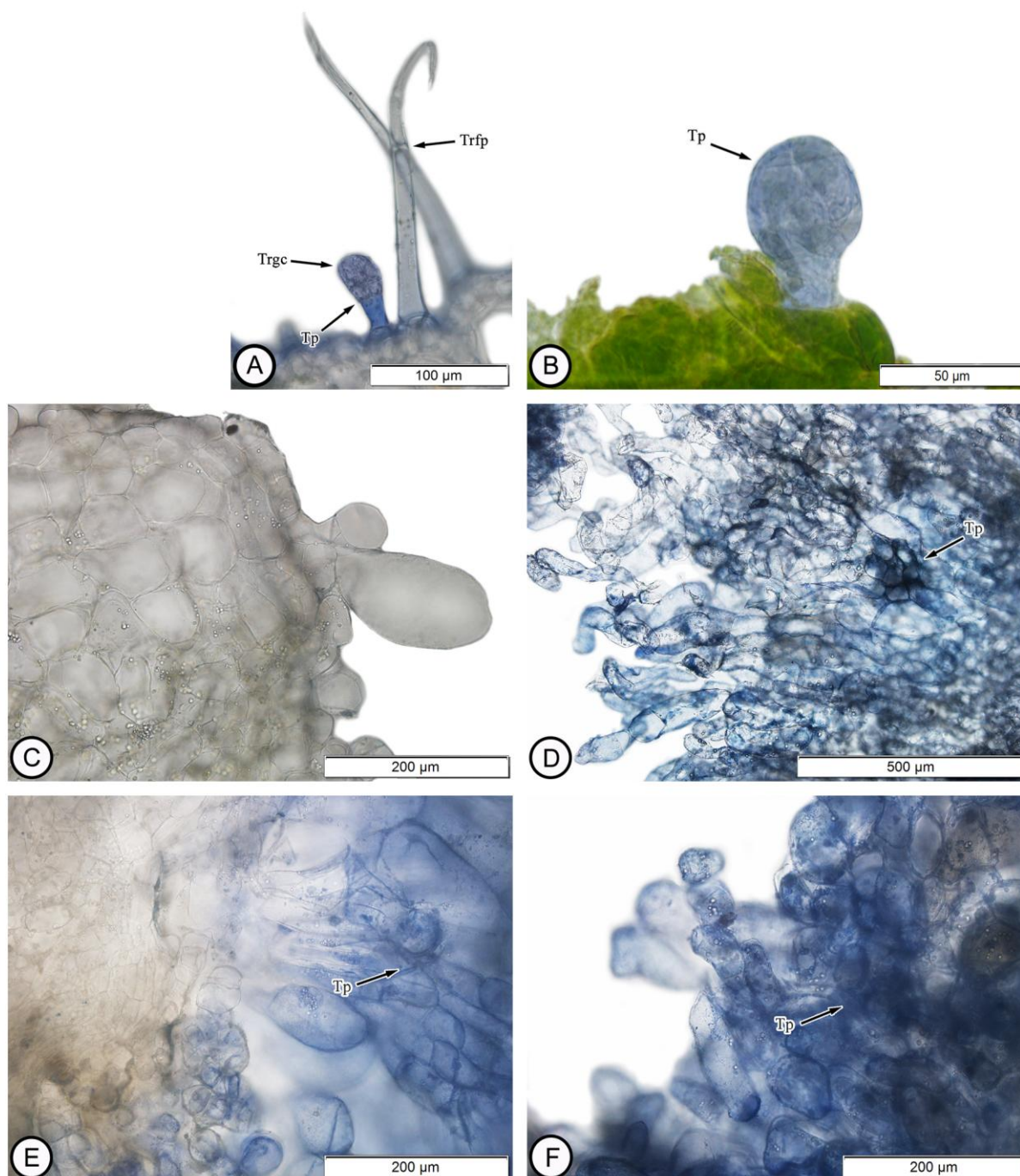


Figura 15: Secções transversais de folhas coletadas *in vivo* (A), folhas estabelecidas *in vitro* em meio MS 50% dos sais (B), calos cultivados no claro (C e E) e calos cultivados no escuro (D e F) ambos com as respectivas concentrações (2,5 mg L⁻¹ KIN; e: 10,0 mg L⁻¹ KIN) da espécie *S. aculeatissimum* Jacq. submetidos a coloração de NADH para detecção de terpenoides. **Trfp:** Tricoma filiforme pluricelular; **Trgc:** Tricoma glandular com cabeça secretora; **Tp:** Compostos terpénicos.

Para a identificação de compostos fenólicos, os fenóis apresentam, em geral, autofluorescência azul em UV e autoflorescência amarela-esverdeada, muito intensa. A presença desses metabólitos indica ação defensiva da planta e de sua adaptação com condições ambientais (CHRISTODOULAKIS, 2009).

Em toda a extensão da folha do campo foi observado compostos fenólicos, tanto com a adição do reagente dicromato de potássio (Figura 16 - A e B) quanto sem e expostos a radiação UV (Figura 16-C,D e E), porém nas folhas cultivadas *in vitro* obteve resposta muito pequena.

Em calos os compostos fenólicos foram observados em grande quantidade nos tratamentos cultivados com KIN 10 mg L⁻¹ (Figura 16 - I e J) tanto cultivados no claro quanto no escuro, já com KIN 2,5 mg L⁻¹ só foi evidente a produção nos calos cultivados no escuro (Figura 16-H). Em todas as observações os calos cultivados no escuro possuem quantidade frequente e mais intensa na detecção desses compostos.

Complementando a classe dos compostos fenólicos foi testado quanto à presença de Flavonóides, estes em geral, emitem uma fluorescência secundária amarelo-esverdeada em presença do fluorocromo cloreto de alumínio - AlCl₃ (Figura 17).

Submetidos a lâmpada UV foi possível observar que em folhas tanto *in vitro*, quanto *in vivo* apresentam resultado positivo em tricomas filiformes pluricelulares e glandulares com cabeça secretora. Em todos os calos testados foi detectado fluorescência, porém nos calos cultivados com KIN 10,0 mg L⁻¹ ocorre maior concentração desses compostos, principalmente os que são cultivados no escuro (Figura 17 – H e J).

Segundo Silva et al. (2003) na família Solanaceae ocorre a presença de flavonoides livres em partes aéreas no gênero *Solanum*, especificamente em *Solanum paludosum* Moric. foi evidenciado também em tricomas glandulares. O mesmo autor correlaciona entre o grau de complexidade dos flavonoides e os tipos de tricoma existente na planta, estruturas mais simples de flavonoides só ocorre com a presença de estruturas mais simples, porém a sua complexidade também acompanha de acordo com o tricoma mais complexo.

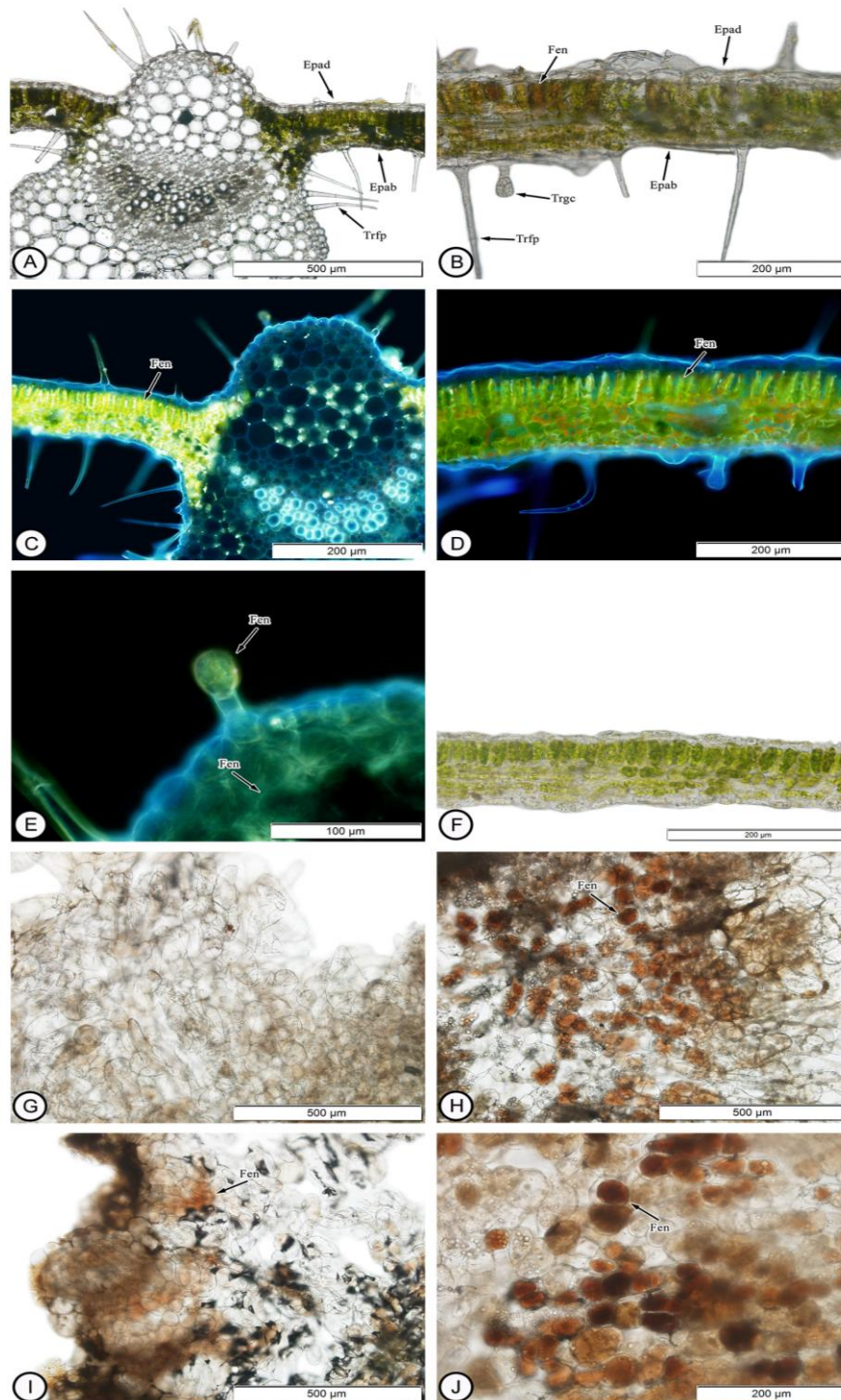


Figura 16: Secções transversais de folhas coletadas *in vivo* após coloração (A e B) e sem coloração (C, D e E) submetidas a radiação UV, folhas estabelecidas *in vitro* em meio MS 50% dos sais (F), calos cultivados no claro (G e I) e calos cultivados no escuro (H e J) ambos com as respectivas concentrações ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN; e: $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN) da espécie *S. aculeatissimum* Jacq. Com exceção do (C, D e E) os demais foram submetidos a coloração com dicromato de potássio para verificar a presença de compostos fenólicos. **Trfp:** Tricoma filiforme pluricelular; **Trgc:** Tricoma glandular com cabeça secretora; **Fen:** Compostos fenólicos. **Epad:** Epiderme adaxial; **Epab:** Epiderme abaxial.

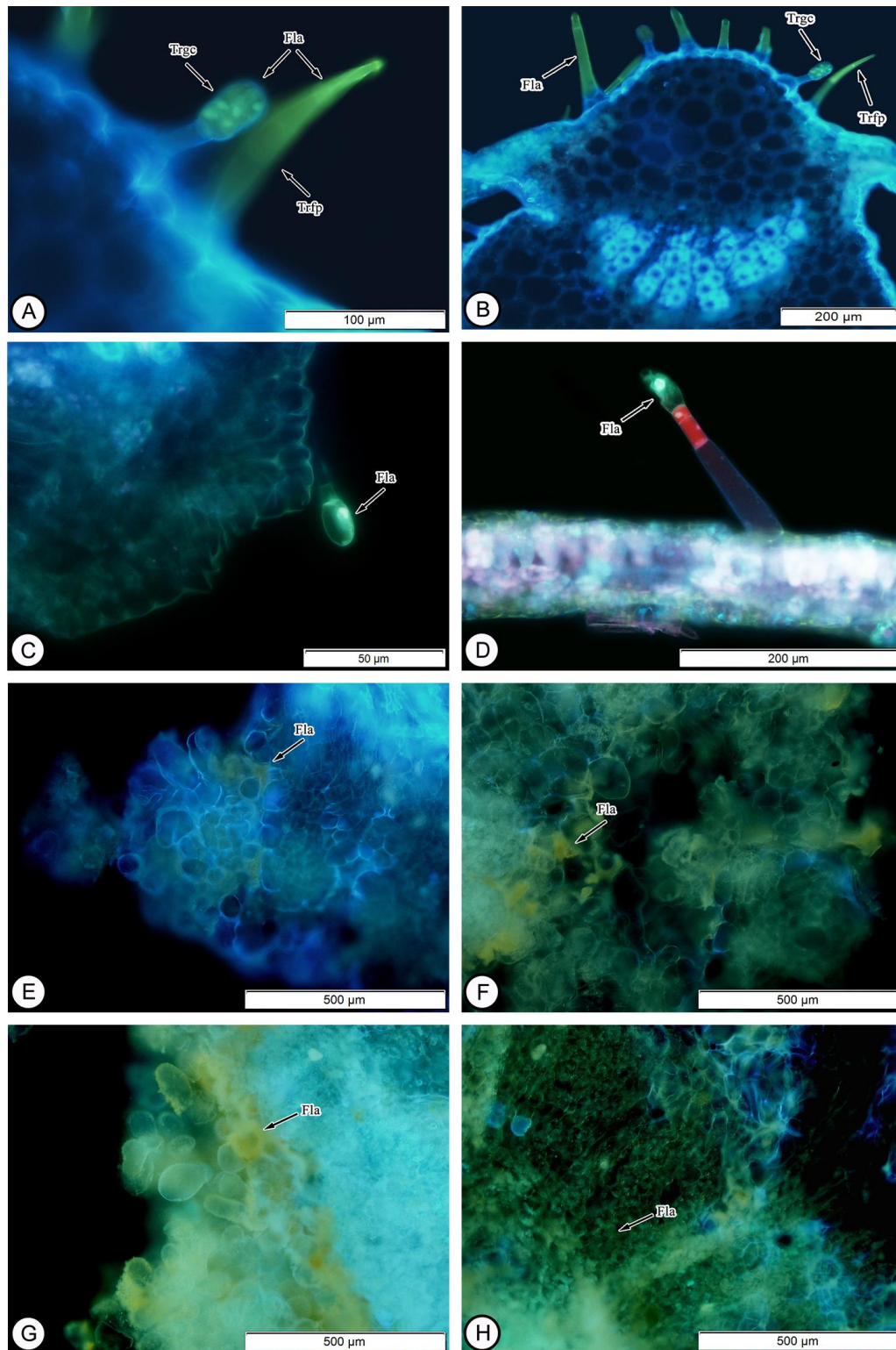


Figura 17: Secções transversais de folhas coletadas *in vivo* (A e B), folhas estabelecidas *in vitro* em meio MS 50% dos sais (C e D), calos cultivados no claro (E e G) e calos cultivados no escuro (F e H) ambos com as respectivas concentrações (2,5 mg L⁻¹ KIN; e: 10,0 mg L⁻¹ KIN) da espécie *S. aculeatissimum* Jacq. submetidos ao fluorocromo cloreto de alumínio (AlCl₃) para detecção de flavonoides. **Trfp:** Tricoma filiforme pluricelular; **Trgc:** Tricoma glandular com cabeça secretora; **Fla:** Flavonoides.

Investigando os tricomas presentes no *S. aculeatissimum* foi possível detectar tricomas estrelados (Figura 18) e glandulares considerados complexos isso pode ser um indício da presença de flavonoides complexos.

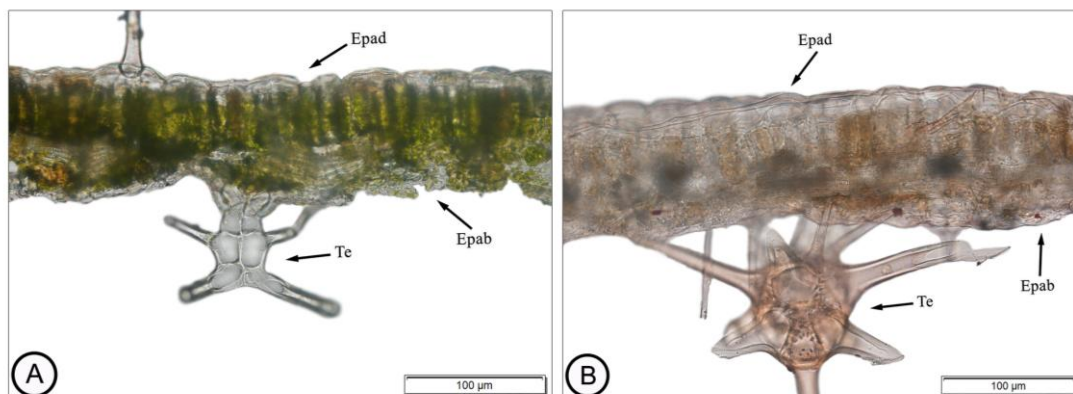


Figura 18: Secções transversais de folhas coletadas *in vivo* da espécie *S. aculeatissimum* Jacq. evidenciando a presença de tricomas estrelados (A-B). **Epad:** Epiderme adaxial; **Epab:** Epiderme abaxial; **Te:** Tricomas estrelados.

Na identificação de compostos nitrogenados, os alcaloides coram de laranja vivo e castanho-avermelhado. Em todos os calos testados (Figura 19-C, D, E e F) foram detectados a presença de compostos nitrogenados sugestivos para alcaloides.

Resumindo todos os dados citados para os testes de detecção das principais classes de metabólitos, obteve-se variação tanto em compostos do metabolismo primário quanto o secundário com exceção dos carboidratos pela presença em todos os tratamentos submetidos a esse teste (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado dos testes histoquímicos de folhas coletadas *in vivo*, folhas estabelecidas *in vitro*, e calos com doses de KIN (A: 2,5 mg L⁻¹; B: 10,0 mg L⁻¹) de *S. aculeatissimum* Jacq. para detecção das principais classes de metabólitos.

Metabolismo Primário	Folha <i>in vivo</i>	Folha <i>in vitro</i>	Calos A		Calos B	
			Claro	Escuro	Claro	Escuro
Carboidratos	+	+	+	+	++	++
Lipídeos	+	+	+	+	+	+
Proteínas	-	-	-	-	-	-
Metabolismo Secundário						
Terpenos	+	+	-	+++	+	+++
Fenólicos	+	+	-	+++	+	+++
Flavonoides	+	+	+	+++	++	+++
Nitrogenados	-	-	+	+	+	+

Abreviaturas: + (presença); - (ausência).

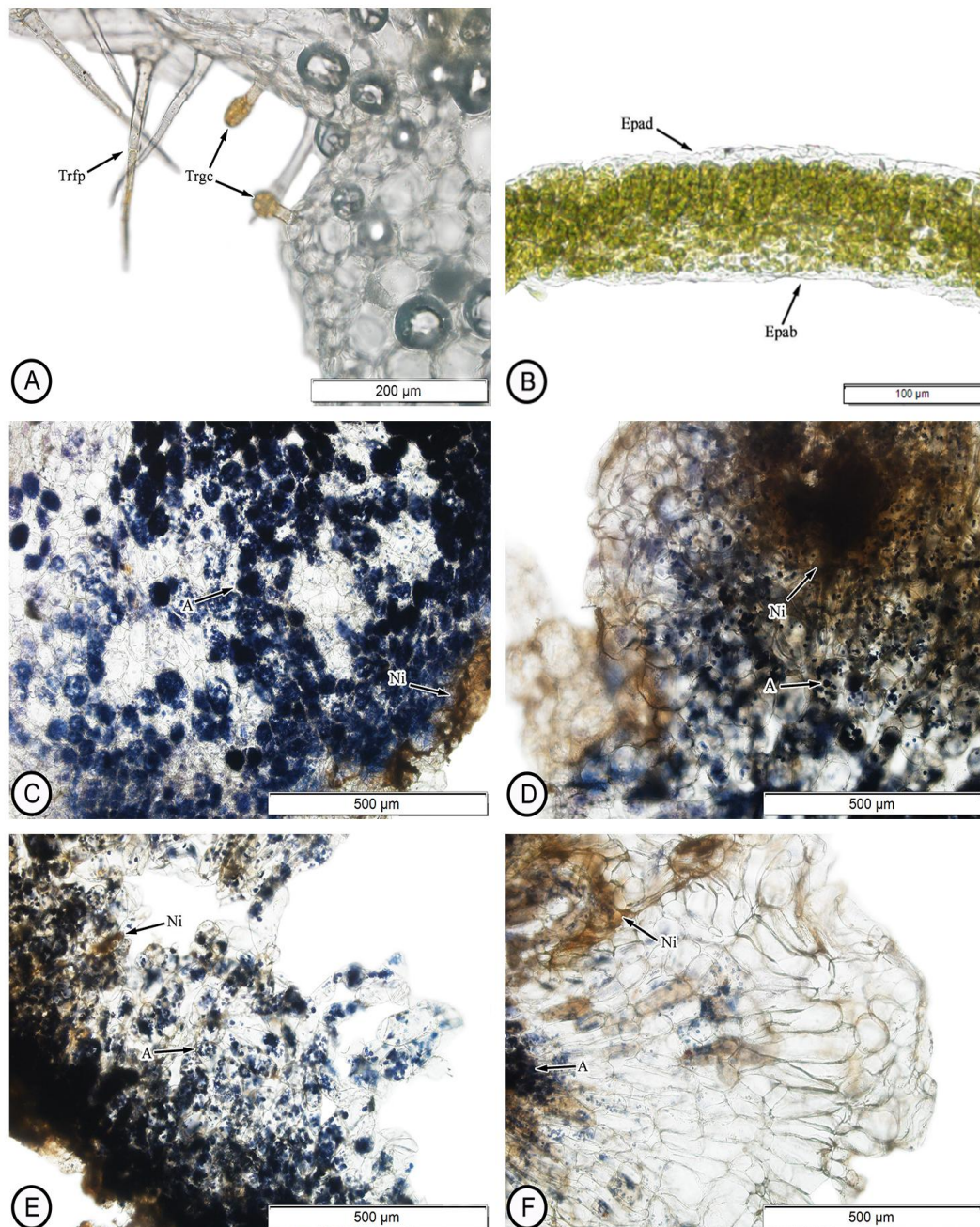


Figura 19: Secções transversais de folhas coletadas *in vivo* (A), folhas estabelecidas *in vitro* em meio MS 50% dos sais (B), calos cultivados no claro (C e E) e calos cultivados no escuro (D e F) ambos com as respectivas concentrações ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN; e: $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN) da espécie *S. aculeatissimum* Jacq. submetidos a coloração com reagente de Wagner para detecção de compostos nitrogenados. **Trfp:** Tricoma filiforme pluricelular; **Trgc:** Tricoma glandular com cabeça secretora; **Epad:** Epiderme adaxial; **Epab:** Epiderme abaxial; **A:** Amido; **Ni:** Compostos nitrogenados.

Calos cultivados com KIN 10,0 mg L⁻¹ independentemente da condição de luminosidade não ocorreu diferença na produção de carboidratos, lipídeos, terpenos, fenólicos, flavonoides e compostos nitrogenados. Já nos calos cultivados com KIN 2,5 mg L⁻¹ ocorrem diferença na detecção de terpenos e compostos fenólicos.

Nenhum dos tratamentos ocorreu produção de proteínas. Carboidratos e lipídeos foram detectados em todas as amostras, e compostos nitrogenados foram observados somente em calos.

2.3.4 Detecção e quantificação de solasodina em plântulas e calos

Em todas as amostras analisadas houve a detecção de solasodina com exceção das folhas como apresentado nas figuras 20 a 25 de alguns cromatogramas obtidos.

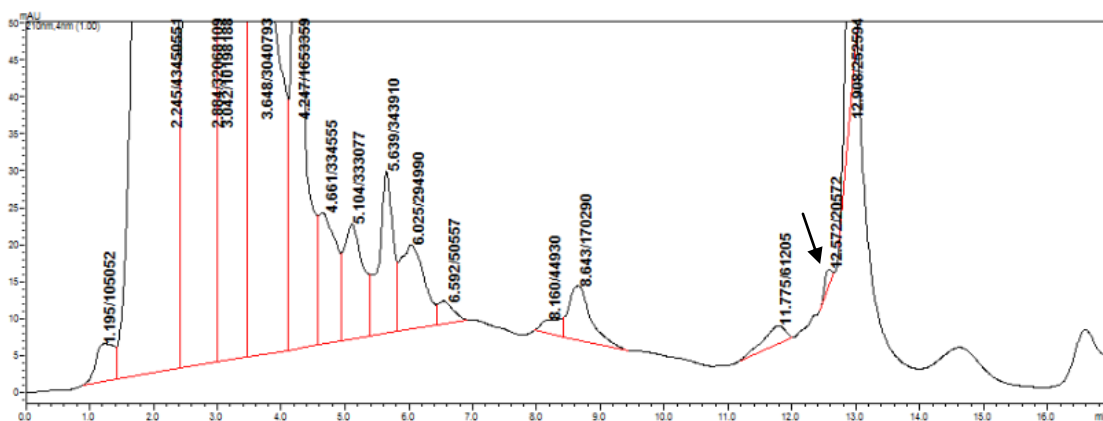


Figura 20: Cromatograma de calo de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivado em meio MS 50% dos sais com suplementação de KIN 2,5 mg mL e sob fotoperíodo de 16 horas de radiação fotossintética ativa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

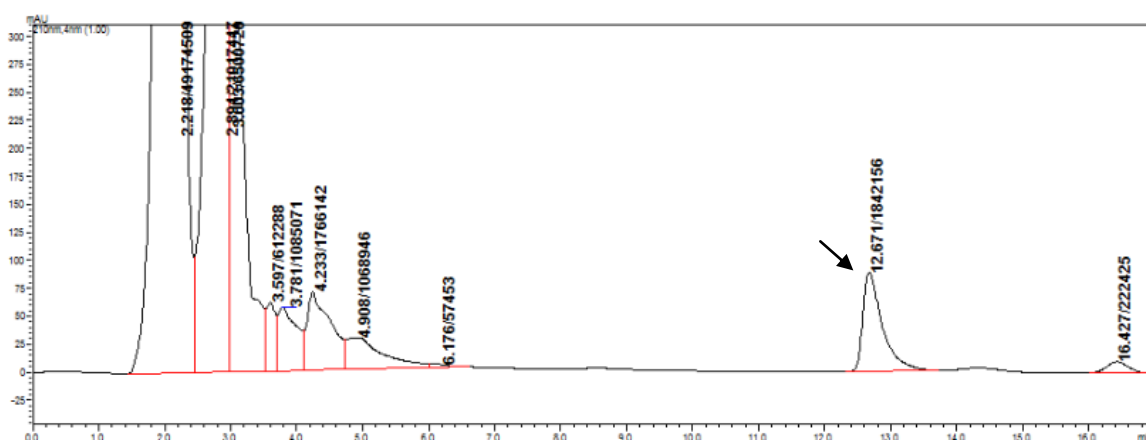


Figura 21: Cromatograma de calo de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivado em meio MS 50% dos sais com suplementação de KIN 5,0 mg L⁻¹ na ausência de luz.

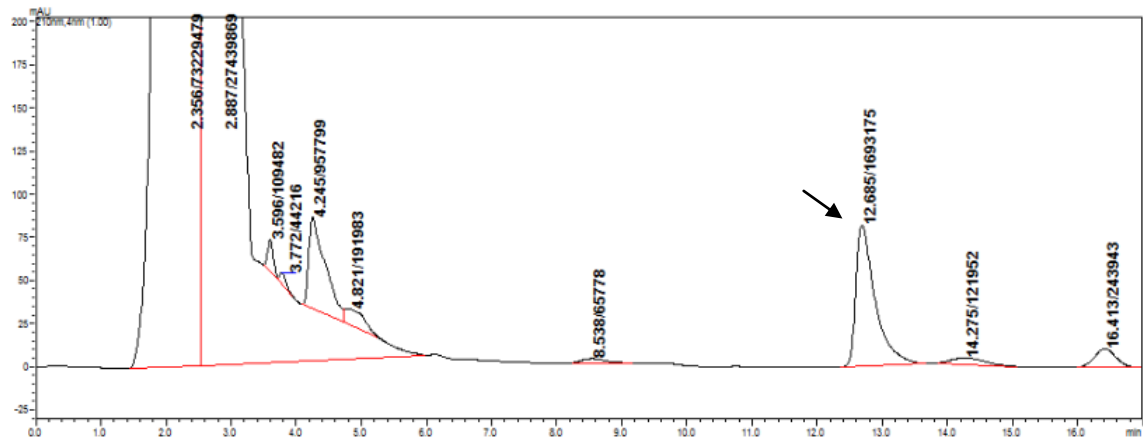


Figura 22: Cromatograma de calo de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivado em meio MS 50% dos sais com suplementação de KIN 2,5 mg L⁻¹ sob fotoperíodo de 16 horas em luz vermelha (600-700 nm).

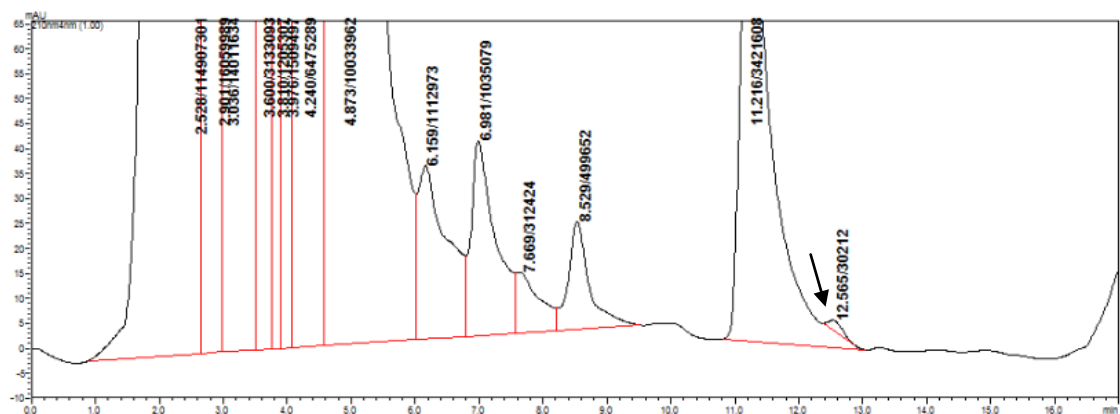


Figura 23: Cromatograma de plântulas de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivadas em meio MS 50% dos sais sob fotoperíodo de 16 horas em luz azul (400-490 nm).

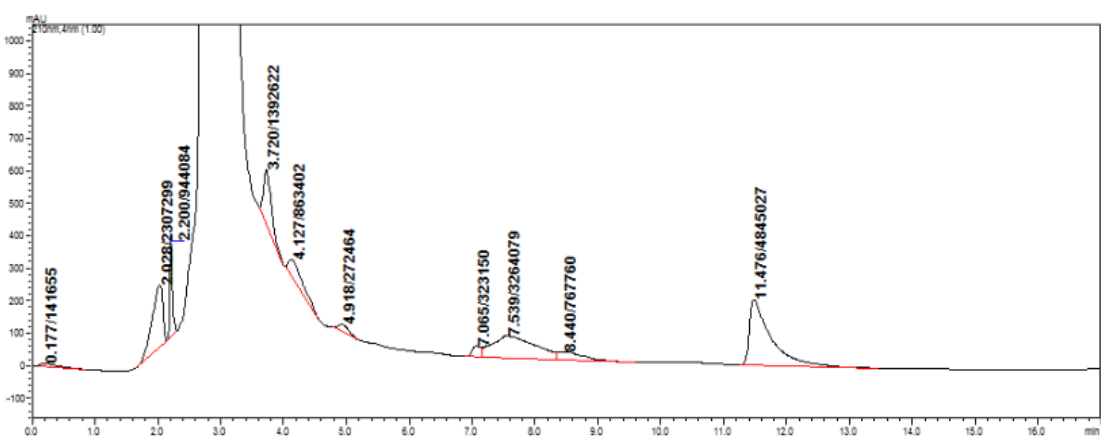


Figura 24: Cromatograma do extrato metanólico obtido das folhas colhidas em campo de *S. aculeatissimum* Jacq.

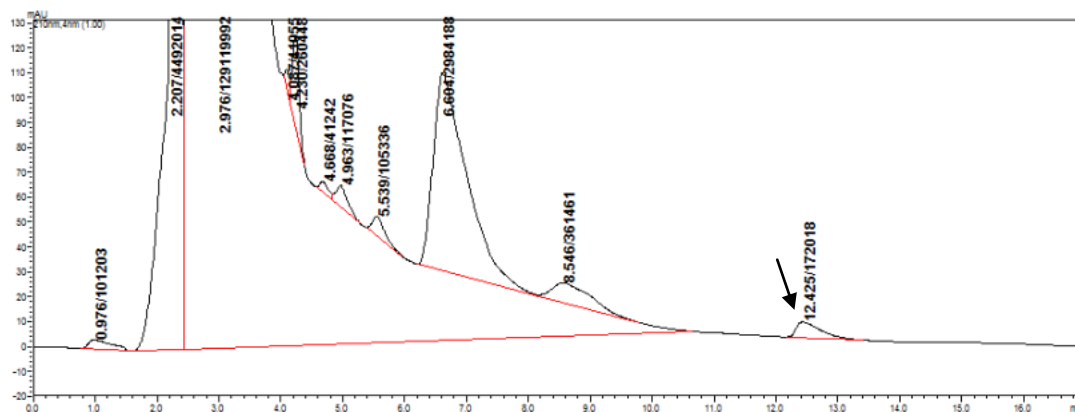


Figura 25: Cromatograma do extrato metanólico dos frutos colhidos em campo de *S. aculeatissimum* Jacq.

Foi possível determinar que calos cultivados em escuro apresentaram maior concentração de solasodina que calos cultivados sob incidência luminosa. Além disso, determinamos que, a partir da dose de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$, houve decréscimo na produção de solasodina em calos cultivados no escuro (Figura 26). O mesmo aconteceu no estudo de Ikenaga (2000), que as concentrações de saponina esteroidal foram estimuladas independentemente das doses de KIN, e em maior quantidade no escuro.

A maior concentração detectada no escuro foi de 311 mg/g e no claro de $5,92 \text{ mg/g}$ nos calos cultivados com doses de KIN de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$.

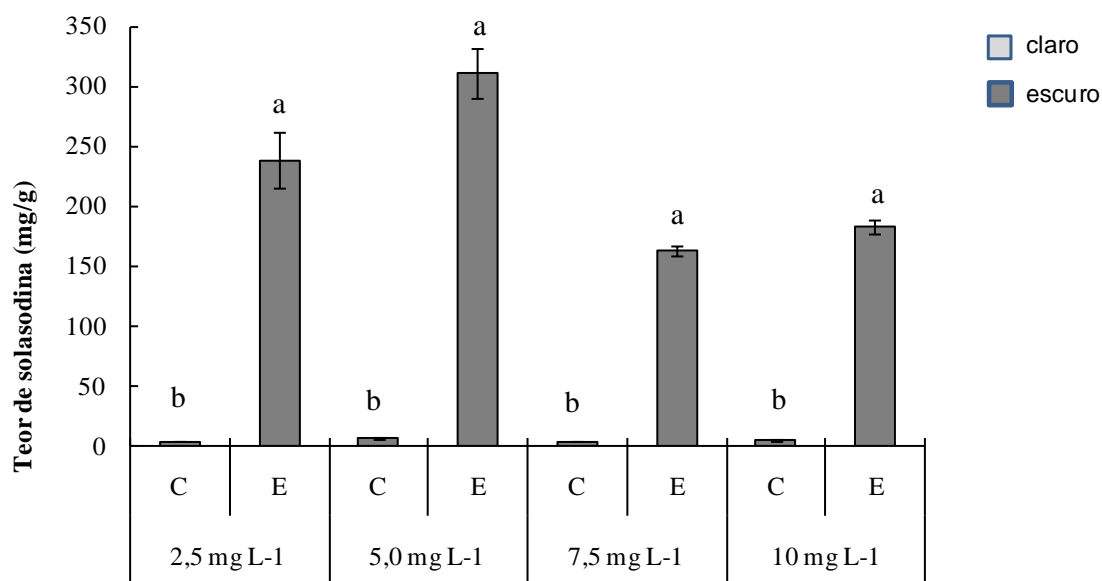


Figura 26: Quantidade de solasodina em calos de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivados no claro (C) e no escuro (E) com diferentes doses de KIN ($2,5$; $5,0$; $7,5$ e 10 mg L^{-1}). As

médias foram comparadas entre claro e escuro dentro de cada dose pelo teste de Tukey à 5%. As barras indicam o erro padrão das médias.

O teor de solasodina em plântulas não foi influenciado pelo comprimento de onda (Figura 27).

Baque et. al. (2010) cita que em raízes transformadas de *Morinda citrifolia* L. (Noni) que as quantidades de antraquinonas, fenólicos e flavonoides foram significativamente influenciados por diferentes fontes de luz. No vermelho distante (devido ao estresse oxidativo) estimulou maior produção desses metabólitos.

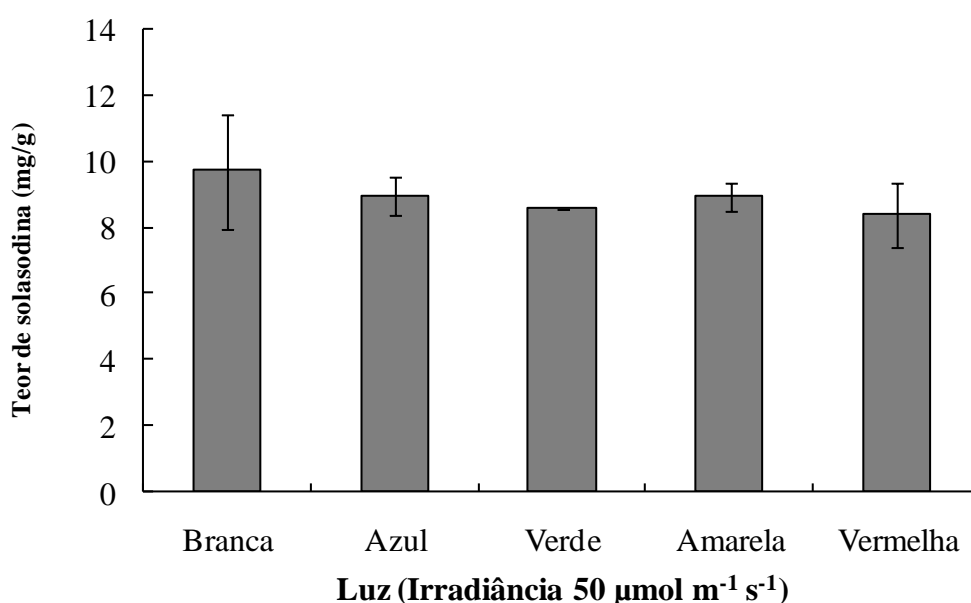


Figura 27: Teor de solasodina em plântulas cultivadas durante 15 dias em meio MS 50% dos sais de *S. aculeatissimum* Jacq. cultivadas em diferentes comprimentos de onda. A análise de variância não foi significativa. As barras indicam o erro padrão das médias.

Victório (2015) ressalta em seu estudo que a luz possui a capacidade de influenciar todo o metabolismo secundário e o crescimento da planta, em virtude dessa influência para calos em meio MS 50% suplementados com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,5 mg L⁻¹ KIN, produziram diferentes quantidades de solasodina após a exposição das luzes (Figura 28).

Quando os calos foram cultivados no escuro e sob a luz vermelha (600-700 nm) ocorreu maior produção de solasodina em relação aos demais espectros, atingindo o valor médio de 298,02 mg/g. Já os calos cultivados sob a luz branca (300-750 nm),

verde (490-560 nm) e amarela (560-590 nm) não houve diferença nas quantidades do metabólito, e, por último, os calos cultivados sob a luz azul (400-490 nm) apresentaram a menor concentração de solasodina.

Elicidores abióticos vêm sendo utilizado na indução de rotas de biossíntese no acúmulo e na distribuição de compostos orgânicos (OLIVEIRA et al., 2009). Li e Kubota (2009) investigaram o efeito na produção de fitoquímicos em alfaces após 12 dias de tratamento de diferentes luzes, o estudo evidenciou o aumento de compostos fenólicos.

Estudo recente de Ahmad (2016) avaliou o efeito de várias luzes espectrais na acumulação de biomassa e na produção de metabólitos secundários em culturas de calos de *Stevia rebaudiana* (Bert.), no seu trabalho ele cita que a utilização de luzes coloridas é uma estratégia promissora para a produção melhorada para antioxidantes.

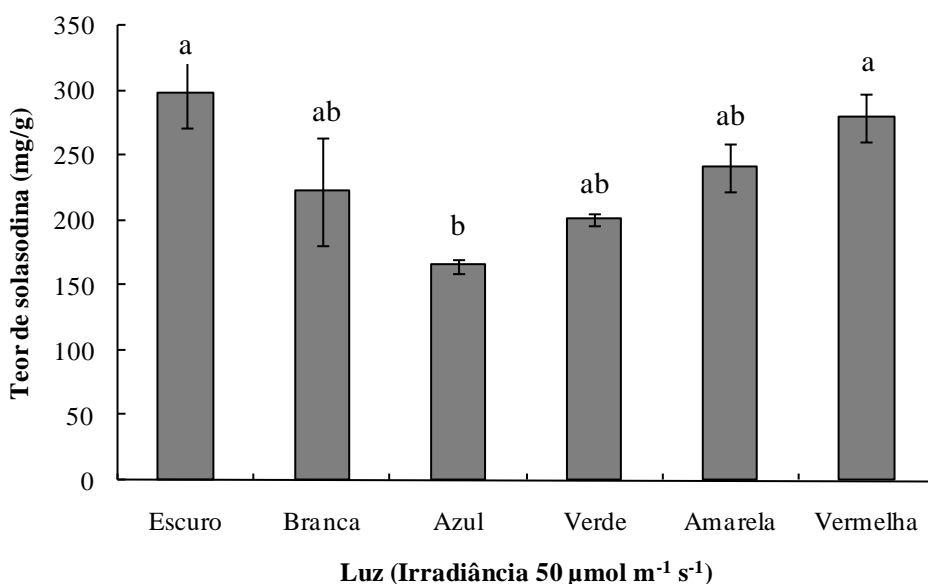


Figura 28: Concentração de solasodina em calos cultivados em meio MS 50% dos sais suplementados com 1 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,5 mg L⁻¹ KIN de *S. aculeatissimum* Jacq. em diferentes comprimentos de onda. As médias foram comparadas entre claro e escuro dentro de cada dose pelo teste de Tukey a 5%. As barras indicam o erro padrão das médias.

Não foi detectado solasodina em folhas cultivadas *in vitro*, já em frutos maduros observa-se a concentração de 29,15 mg/g (Tabela 2). Quando o teor de solasodina detectada nos frutos é comparada com os demais resultados máximos captados em calos foi possível observar que ocorrem aumento considerável na produção do metabólito.

Anirudhan et al. (2009) evidenciou a produção *in vitro* de solasodina a partir de plântulas *Solanum trilobatum* e comparou com quantidade detectada em frutos e semelhantemente constatou aumento do metabólito produzido. Em *Panax quinquefolius* L. o balanço criterioso de reguladores nas culturas também foi responsável pela elevação dos níveis do metabólito de forma mais positiva, do que em plantas adultas (SHIDU, 2011).

Tabela 2: Resultado para detecção de solasodina em folhas e frutos de *S. aculeatissimum* Jacq.

Órgão vegetal	Concentração de solasodina (mg/g)
Folhas	-
Frutos	29,15

(-) não detectado

Alguns estudos utilizando agentes elicitores em algumas espécies do gênero *Solanum* ocorrem variação e melhoramento da concentração de solasodina *in vitro* conforme demonstra a tabela 3. Confrontando os resultados detectados nesse estudo, observa-se que a espécie *S. aculeatissimum* Jacq. se destaca em comparação a quantidade de solasodina das demais espécies do mesmo gênero cultivadas *in vitro*.

Tabela 3: Variação da concentração de solasodina em diferentes espécies do gênero *Solanum* após elicitação.

Solasodina [mg g ⁻¹]	Elicidador	Origem vegetal	Espécie / Fonte	Fonte
9,33	Metil jasmonato	Raízes transformadas	<i>Solanum trilobatum</i> L.	Shilpha et al. (2015)
2,39	NaCl	Calos	<i>Solanum nigrum</i> L.	Bhat et al. (2008)
35,97	Sacarose	Plântulas	<i>Solanum trilobatum</i> L.	Anirudhan et al. (2009)
2,34	BAP + KIN	Parte aérea a partir de calos	<i>Solanum nigrum</i> L.	Bhat et al. (2010)
121,01	BAP + 2,4-D	Suspensão celular	<i>Solanum hainanense</i> H.	Loc & Thanh (2011)
7,59	IBA + AIA	Suspensão celular	<i>Solanum lyratum</i> .	Kuo et al. (2012)

Voltando para o sistema de produção a cultura de células e tecidos citada por Arora et al. (2010), é evidenciado o aumento do rendimento de compostos de interesse sendo uma alternativa de produção e para estudo da biossíntese vegetal.

Ficou evidente que o processo de produção do metabólito solasodina pode ser influenciando por meio do cultivo de calos e plântulas de *S. aculeatissimum* Jacq., expostos a diferentes luminosidade e doses de cinetina. Na avaliação foi possível observar a melhor alternativa de potencialização na produção do metabólito e sua influência no crescimento e resposta histoquímica *in vitro*, comparada com as quantidades obtidas nos tecidos das folhas e frutos em campo. Isto demonstra que a

técnicas biotecnológicas voltadas a esta espécie pode contribuir como fonte de dados futuros e conseqüentemente ser uma fonte de matéria-prima na produção de medicamentos esteroides.

Por meio desse estudo foi possível maximizar o processo de produção do metabólito solasodina através da técnica biotecnológica de cultura de tecidos, utilizando plântulas e calos de *S. aculeatissimum*. Os resultados alcançados demonstraram que a luminosidade influenciou no crescimento *in vitro* de biomassa, tanto de calos quanto de plântulas, porém quando expostos em luzes com variados espectros não diferenciaram entre si no crescimento. O melhor teor de solasodina em calos foi obtido após exposição a luz vermelha e no escuro, e em plântulas a quantidade do metabólito produzido foi inferior em comparação com o teor dos calos, não obtendo diferença entre as luzes. O cultivo de calos demonstrou que é mais eficiente na obtenção de solasodina do que na produção do metabólito *in vivo*, constatando assim que as técnicas biotecnológicas voltadas a esta espécie podem ser conseqüentemente uma fonte promissora de matéria-prima na produção de medicamentos esteroides.

2.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a luminosidade influenciou o crescimento de calos independente da dose de cinetina utilizada, sendo a condição do escuro mais favorável.

A qualidade espectral não influenciou no teor de biomassa obtida para plântulas, porém em calos com $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN o maior crescimento ocorre sob a exposição da luz amarela.

Em calos a produção de solasodina foi obtida pela exposição da luz vermelha e no escuro, em plântulas a quantidade produzida do metabólito foi bem inferior em comparação com os calos, não ocorrendo diferença na produção sob diferentes espectros luminosos.

O cultivo de calos oriundos de explantes foliares foi mais eficiente para produção de solasodina que a produção do metabólito por órgão como folha e fruto, caracterizando avanço significativo para o desenvolvimento de um sistema de produção *in vitro* do metabólito de interesse.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, N.; RAB, A.; AHMAD, N. Variações bioquímicas induzidas pela luz na produção de metabólitos secundários e da atividade antioxidante em calos de *Stevia rebaudiana* (Bert). **Journal of Fotoquímica e Photobiology Biolog**, v. 154, p. 51-56, 2016.

ALMEIDA, E.P.; OLIVEIRA, R.P; DANTAS, J.L.L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricultural**, v. 58, n. 1, p. 51-54, 2001.

ANIRUDHAN, K.; NAIR, A. S. In vitro production of solasodine from *Solanum trilobatum*. **Biologia plantarum**, v. 53, n. 4, p. 719-722, 2009.

BAQUE, M. A., HAHN, E. J. & PAEK, K. Y. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.46, n.1, p. 71-80, 2010.

BHAT, M. A.; AHMAD, M. et al. Salinity stress enhances production of solasodine in *Solanum nigrum* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 17-21, 2008.

BHAT, M. A. et al. In vitro regeneration of *Solanum nigrum* with enhanced solasodine production. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 4, p. 757-760, 2010.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F., ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 11-28, 2005.

BOUZON, Z.L; SCHMIDT, C.E.; ALMEIDA, A.C.; YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, M.C.; CHOW, F. Caracterização citoquímica e organização ultra-estrutural em calos das agarófita *Gracilariopsis tenuifrons*, 2011. Jan;42 (1): 80-6. doi:10.1016/j.micron.2010.07.012.

CHRISTODOULAKIS, N. S.; LAMPRI, P.; FASSEAS, C. Structural and cytochemical investigation of the leaf of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*), a drought-resistant alien weed of the Greek flora. **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 5, p. 432-438, 2009.

HUSSAIN, M. S., FAREED, S., SABA ANSARI, M., RAHMAN, A., AHMAD, I. Z. & SAEED, M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 4, n.1, p. 10, 2012.

IKENAGA, T.; HANDAYANI, R.; OYAMA, T. Steroidal saponin production in callus cultures of *Solanum aculeatissimum* Jacq. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 12, p. 1240-1244, 2000.

JERBA, V. F.; RODELLA, R. A.; FURTADO, E. L. Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. phaseoli. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.3, p. 217-223, 2005.

KUO, C. I; CHAO, C. H.; LU, M. K. Effects of Auxins on the Production of Steroidal Alkaloids in Rapidly Proliferating Tissue and Cell Cultures of *Solanum lyratum*. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 4, p. 400-404, 2012.

LI, Q., & KUBOTA, C. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. **Environmental and Experimental Botany**, 67, p. 59–6, 2009.

LIMA, J. F. Anatomia foliar de *Ocimum gratissimum* L., com ênfase na caracterização dos tricomas secretores e conteúdo do óleo essencial. Jamile Fernandes Lima. Cruz das Almas - Ba, trabalho de graduação,53f, 2010.

LOC N. H; THANH, T. H. Solasodine production from cell culture of *Solanum hainanense* Hance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** v16, p. 581-586, 2011.

MANOSROI, J .; MANOSROI, A .; SRIPALAKIT, P. Extração de solasodine de frutos secos e folhas de *Solanum laciniatum* ait. *E a síntese do acetato de 16-dehydropregnenolone de solasodina por catálise de transferência de fase*. In: **III Congresso WOCMAP em Plantas Medicinais e Aromáticas-Volume 5: Qualidade, eficácia, segurança, transformação e comércio em Medicinal 679**. p. 105-111, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-479, 1962.

MURTHY, H. N., LEE, E. J. e PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v.118, p. 1-16, 2014.

NOGUEIRA, R. C. Caracterização de calos embriogênicos de Murici-Pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) / Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras : UFLA, 41 p. : il. 2006.

OLIVEIRA, M.C.;SIMÕES, K.;BRAGA, M.R. Substâncias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica.**, v.32, n.3, p. 509-519, jul.-set, 2009.

PATEL, H. e KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in plant tissue culture. **J Pharm Phytochem**; v.2, n.1, p. 60–65, 2013.

PICOLI, E.A.T.;ISAÍAS, R.M.S.;VENTRELLA, M.C.;MIRANDA, R.M.M. Anatomia, histoquímica e micromorfologia de folhas de *Gravitinga dunal*. **Bioscience Journal**, v. 29, n.3, 2013.

REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry** v.47 p. 540–549, 2009.

SANTOS, M. M., NUNES, M. G. S., & MARTINS, R. D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.2, p. 327-334, 2012.

SHILPHA, J. et al. Methyl jasmonate elicits the solasodine production and anti-oxidant activity in hairy root cultures of *Solanum trilobatum* L. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 54-64, 2015.

SIDHU, Y. In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture. **The Plymouth Student Scientist**, v.4, n.1, p. 432-449, 2011.

SILVA, T. M. S. D., CARVALHO, M. G. D., BRAZ-FILHO, R., e AGRA, M. D. F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, v.26, n.4, p. 517-522, 2003.

TARIQ.U., M. ALI, BH Abbasi, morfogênicas e variações bioquímicas sob diferentes luzes espectrais em calos de *Artemisia absinthium* L., **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 130, 2014.

VICTÓRIO, C.P.; LEAL-COSTA, M.V.; TAVARES, E.S.; KUSTER, R.M. LAGE, C.L.S. Light spectral affect the morphoanatomical and chemicals features of clonal *Phyllanthus tenellus* Roxb. grown *in vitro*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n.5, p. 111-121, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos a cultura de tecidos vegetais vem se destacando mundialmente em várias frentes do conhecimento científico e tecnológico. Caracterizada como ferramenta biotecnológica, sua evolução se deve, primordialmente, pelo caráter multidisciplinar que lhe é submetido. A aplicação biotecnológica das plantas nos permite extrair compostos de ampla aplicação industrial.

Entretanto trabalhos preliminares são essenciais para início e desenvolvimento da cultura. Simultaneamente trabalhos com caráter bioquímico e molecular com intuito de explorar e elucidar as rotas sintéticas e os pontos regulatórios de tais vias, sempre com o objetivo de explorar plantas com potenciais para produção industrial de metabólitos secundários.

Os avanços descritos neste trabalho representam uma pequena parcela das pesquisas desenvolvidas nessa área, demonstrando a capacidade de resposta bioquímica de células vegetais cultivadas *in vitro* em produzir compostos de interesse econômico.