ESTUDO DAS CONDIÇÕES PARA INDUÇÃO DE CALOS E
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EM *Pfaffia*
glomerata (Spreng) Pedersen.

FÁTIMA ODAHARA KAJIKI
Farmacêutica

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo- Brasil
Agosto de 1996

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen / Fátima Odahara Kajiki. - Piracicaba, 1996.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.

1. Composto secundário - Produção 2. Genseng brasileiro - Biotecnologia I.

CDD 633.88348

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES PARA INDUÇÃO DE CALOS E
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EM *Pfaffia*
glomerata (Spreng) Pedersen.**

FÁTIMA ODAHARA KAJIKI

Aprovada em: 04.12.1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Luis Antonio Gallo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez

ESALQ/USP

Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO
Orientador

*Aos meus pais
Kiyoco e Massayuki*

*Ao Takao
e às nossas filhas
Ana
Lia
e Mirian*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo pela oportunidade concedida, orientação e estímulo constante.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Gallo pela orientação e apoio.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez pelo apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Edna T. Miyake Kato, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela orientação nas análises químicas desenvolvidas.

Aos professores, funcionários, técnicos, estagiários e colegas do CEBTEC, pelo apoio e auxílio constantes.

Ao laboratório de plantas medicinais da ESALQ, pela doação das plantas utilizadas.

Aos técnicos da UNIMEP pelo auxílio no desenvolvimento das análises químicas.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Compostos do metabolismo secundário em plantas e sua utilização como medicamen- tos.....	04
2.1.1. Produção de metabólitos secundários in vitro.....	05
2.2. Saponinas.....	06
2.3. Cultura de tecidos.....	10
2.3.1. Micropropagação.....	11
2.3.2. Organogênese.....	12
2.3.2.1. Produção de compostos se- cundários em calos.....	14
2.3.3. Suspensão de células.....	16
2.3.3.1. Meio de cultura.....	17
2.3.3.2. Condições ambientais.....	19
2.3.3.3. Otimização.....	20
2.4. O gênero <i>Pfaffia</i>	21
2.4.1. Posição taxonomica.....	21
2.4.2. Constituintes químicos.....	22
2.4.3. Uso popular e ação farmacológica...	27
2.4.4. <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) Pedersen..	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29

3.1. Obtenção de plantas in vitro.....	32
3.2. Micropropagação-efeito do BAP.....	32
3.3. Efeito do 2,4-D.....	34
3.4. Produção de calos: 2,4-DxCIN.....	34
3.4.1. Incremento de peso fresco.....	35
3.4.2. Resíduo seco.....	36
3.5. Cultivo de células em suspensão.....	36
3.6. Modificação do meio de cultura.....	37
3.7. Análises químicas.....	37
3.7.1. Amostras.....	37
3.7.2. Determinação do teor de saponina...	41
3.7.3. Determinação do Índice de espuma...	42
3.7.3.1. Obtenção da solução saponínica.....	42
3.7.3.2. Execução.....	42
3.7.4. Cromatografia em camada delgada....	43
3.7.4.1. Preparo das amostras.....	43
3.7.4.2. Sistema cromatográfico....	44
3.7.5. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. Obtenção de plantas in vitro.....	46
4.2. Efeito do BAP.....	46
4.3. Efeito do 2,4-D.....	52
4.4. Produção de calos.....	52
4.4.1. Incremento de peso fresco.....	56
4.4.2. Resíduo seco.....	60
4.5. Suspensão celular.....	60
4.6. Produção de calos em meios modificados....	61
4.7. Análises químicas.....	62
4.7.1. Determinação de saponinas totais...	62
4.7.2. Determinação do índice de espuma...	66

4.7.3. CCD.....	68
4.7.4. HPLC.....	75
5. CONCLUSÕES.....	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

ABREVIATURAS

MS.....MEIO MURASHIGE-SKOOG (1962)
CIN.....CINETINA
2,4-D.....ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO
AIA.....ÁCIDO INDOL ACÉTICO
ANA.....ÁCIDO NAFTALENO ACÉTICO
AIB.....ÁCIDO INDOL BUTÍRICO
BAP.....BENZIL ADENINA PURINA
CCD.....CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA
HPLC.....CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
UV.....LUZ ULTRA VIOLETA

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vias bioossintéticas em plantas.....	08
Figura 2. Compostos químicos do gênero <i>Pfaffia</i> : ácido pfáfico, pulverico, ecdisterona.....	23
Figura 3. Compostos químicos do gênero <i>Pfaffia</i> : chiku- setsusaponina, sitosterol.....	24
Figura 4. Compostos químicos do gênero <i>Pfaffia</i> : iresi- nósido e estigmasterol.....	25
Figura 5. Compostos químicos do gênero <i>Pfaffia</i> : ácido oleanólico.....	26
Figura 6. <i>Pfaffia glomerata</i> (spreng) Pedersen.....	30
Figura 7. Esquema geral dos experimentos realizados com <i>P. glomerata</i>	31
Figura 8. Esquema da seleção de amostras para análises químicas.....	39
Figura 9. Raízes e caules de <i>P. glomerata</i>	40

Figural10. Efeito de diferentes concentrações de BAP e 2,4-D em segmentos nodais de <i>P. glomerata</i> , após 50 dias de cultivo.....	48
Figural11. Efeito de diferentes concentrações de BAP na altura de plantas in vitro.....	49
Figural12. Efeito de diferentes concentrações de BAP na brotação de plantas in vitro.....	50
Figural13. Efeito de diferentes concentrações de BAP no no. de nós/broto, in vitro.....	51
Figural14. Incremento de peso fresco de calo derivados de explantes radiciais, cultivados em meio MS modificado, contendo 2,4-D e CIN.....	57
Figural15. Incremento de peso fresco de calos derivados de explantes caulinares, cultivados em meio MS modificado, contendo 2,4-D e CIN.....	58
Figural16. Calos derivados de explantes radiciais, cultivados em meio MS modificado, contendo 2,4-D e CIN.....	59
Figural17. Cromatograma (HPLC) de padrão alantoina.....	76
Figural18. Cromatograma (HPLC) de padrão de saponina.....	77
Figural19. Cromatograma (HPLC) de extratos de raiz.....	78
Figura20. Cromatograma (HPLC) de extratos de caule.....	79

Figura21. Cromatograma(HPLC) de extratos de calos.....	80
Figura22. Cromatograma(HPLC) de extratos de suspensão de células.....	81
Figura23. Cromatograma(HPLC) do meio líquido das sus- pensão celular.....	82
Figura24. Cromatograma(HPLC) de extratos de calos cultivados em meio contendo 40g/l de sacarose.	83

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Composição do meio de cultura básico MURASHIGE-SKOOG e modificação.....	33
Tabela 2. Produção de calos(%) após 50 dias de cultivo em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D e CIN(explante radicial.....	54
Tabela 3. Produção de calos(%) após 50 dias de cultivo em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D e CIN(explante caulinar).....	55
Tabela 4. Resíduo seco (%) dos calos cultivados nos meios citados na tabela anterior.....	61
Tabela 5. Saponinas totais (%) em raízes, caules de <i>P. glomerata</i> , calos e suspensão de células...	64
Tabela 6. Índice de espuma de calos e suspensão de células.....	67
Tabela 7. CCD de extratos metanólicos de calos e suspensão de células (UV).....	69

Tabela 8. CCD de extratos metanólicos de calos e suspensão de células (Revelador:vanilina sulfúrica).....	70
Tabela 9. CCD de extratos metanólicos (revelador: vanilina sulfúrica e UV).....	71
Tabela 10. CCD de extratos butanólicos de calos e suspensão de células (UV).....	72
Tabela 11. CCD de extratos butanólicos de calos e suspensão de células (revelador:vanilina sulfúrica).....	73
Tabela 12. CCD de extratos butanólicos (revelador:vani- lina sulfúrica e UV).....	74

ESTUDO DAS CONDIÇÕES PARA INDUÇÃO DE CALOS E
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EM *Pfaffia glomerata*
(Spreng) Pedersen

Autora: FÁTIMA ODAHARA KAJIKI

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO:

O objetivo deste trabalho foi estudar as condições biotecnológicas , para a indução de calos de *Pfaffia glomerata* e a produção de saponinas.

Foram realizadas análises químicas (determinação de saponinas totais) em calos e culturas de suspensão de células derivados de explantes radiciais e caulinares, com a finalidade de verificar se compostos secundários são produzidos *in vitro*.

Para avaliar o efeito de auxinas e citocininas no crescimento de calos e produção de saponinas, foram analisadas várias combinações de 2,4-D x CIN (mg/L), sendo que 1,0 x 0,5 apresentou os melhores resultados.

A luz influenciou pouco a produção de saponinas pelos calos, sendo que no escuro a produção foi de 3,81% e no claro, 3,49%.

Alta concentração de sacarose(60g/l) aumentou o conteúdo de saponinas totais(5,92%); também glicose foi efetiva para produzir compostos secundários(5,46%).

STUDIES ON THE CALLUS INDUCTION AND PRODUCTION OF
SECONDARY COMPOUNDS IN *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen.

Author: FÁTIMA ODAHARA KAJIKI

adviser: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY:

The influence of various media constituents on the growth and saponin production in *Pfaffia glomerata* callus and suspension cultures was studied.

Chemical analyses (total saponins determinations) of the saponins contents in calli and suspension cultures from shoot and root explants of *P. glomerata*, were carried out in order to determine whether it was possible to obtain secondary metabolites *in vitro*.

The effects of auxins and cytokinins on saponin content and callus growth were examined, and better growth ratio and increased amounts of saponin were observed at the combination of 1.0mg/L 2,4-D and 0.5mg/L KIN.

A combination of 1.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L KIN was found to be better than 2.5 mg/L 2,4-D and 2.5 mg/L KIN for callus growth and saponin production (3.81% and 3.18% respectively).

The total saponins content of *P. glomerata* roots and shoots (1-2 years old) was 3.74% and 2.69% respectively.

Light had a little or no effect on the saponin production by calli cultures.

High sucrose concentrations(60g/L) increased the content of total saponins (5.92%), and glucose was also effective for metabolites formation(5.46).

1. INTRODUÇÃO

Muitas plantas superiores produzem compostos orgânicos importantes economicamente, como resinas, taninos, terpenos, gomas, ceras, corantes, alcalóides e outros. Estes compostos, são produtos do metabolismo secundário das plantas e contribuem para a adaptação e interação da planta com o ambiente. Desempenham papéis importantes na vida vegetal, como defesa a ataque de predadores, patógenos bacterianos, fúngicos e virais; e além disso muitos deles, pelas ações farmacológicas ou pelas propriedades químicas que apresentam, são utilizados como medicamento ou como precursores (TREASE e EVANS, 1983; VICKERY e VICKERY, 1981).

O reino vegetal tem sido fonte de medicamentos valiosos, como a morfina, digoxina, ergotamina, leurocristina e outros. Estes produtos naturais também tem servido como modelo químico para síntese de novos medicamentos (TYLER, 1986).

A ascensão dos medicamentos sintéticos durante este século(iniciada em 1883 com a síntese da antipirina), provocou a diminuição e quase desaparecimento das pesquisas relacionadas com potencial terapêutico das plantas (MORS, 1982; ELISABETSKY, 1987). Atualmente observa-se a revalorização das plantas medicinais devido a alguns fatores: alto custo da síntese química; impossibilidade, em alguns casos, de síntese devido à complexidade química do composto

natural (BALANDRIN e KLOCKE, 1985); largo espectro dos efeitos colaterais tóxicos dos sintéticos (MORS, 1982); resistência de algumas doenças ao tratamento com os sintéticos (KLAYMAN, 1985); e importância da pesquisa de medicamentos para tratamento de doenças ainda sem cura como muitos tipos de câncer, Aids (TYLER, 1986; SPJUT, 1985).

De maneira geral, o que se observa é a tendência mundial de valorização dos produtos naturais de plantas, que se reflete no aumento da demanda por estes produtos. Entretanto, nos últimos anos verificamos que as dificuldades em assegurar um bom suprimento de plantas medicinais tem aumentado, devido ao decréscimo drástico nas reservas naturais, pela exploração irracional, perturbação do ambiente natural pelo homem, encarecimento da mão de obra e dificuldades técnicas em cultivar plantas selvagens (TABATA, 1977).

Neste contexto, o cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa promissora para suprimento constante e homogêneo de material, independente de mudanças climáticas ou condições do solo. Além disso, cultura de células e tecidos vegetais constitui um sistema adequado para investigação das vias biossintéticas, permitindo a otimização da produção *in vitro* de metabólitos secundários e favorecendo a biossíntese de compostos que naturalmente não ocorrem na planta (TABATA, 1977; MISAWA et alii, 1985; CROCOMO & MELO, 1991).

A tecnologia do cultivo *in vitro* pode ser aplicada em plantas medicinais através da micropropagação, cultura de calos e suspensão celular visando a produção de metabólitos secundários. A exploração da capacidade biossintética de várias culturas celulares por alguns grupos de cientistas, tem ocorrido em vários países nas últimas décadas. Os resultados obtidos nem sempre tem

sido satisfatórios, entretanto conhecimentos novos tem sido relatados para uma variedade de substâncias utilizáveis na indústria farmacêutica, cosméticos, alimentos (TABATA, 1977).

O objetivo deste trabalho foi estudar as condições biotecnológicas para indução de calos e suspensão de células de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, e a produção de compostos secundários(saponinas), comparando-a com a biossíntese que ocorre na planta *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Compostos do metabolismo secundário em plantas e sua utilização como medicamentos

Segundo FARNSWORTH et alii(1985), a Organização Mundial de Saúde(OMS) tem estimado que 80% da população mundial usa a medicina tradicional, principalmente plantas medicinais, nos cuidados primários à saúde. Nos países desenvolvidos, medicamentos derivados de plantas também tem importância. Cerca de uma centena de substâncias químicas derivadas de plantas, podem ser consideradas como importantes medicamentos, por exemplo: acetildigoxina(cardiotônico), aescina(antiinflamatório), atropina(anticolinérgico), emetina(amebicida), efedrina(simpaticomimético), pilocarpina(parassimpaticomimético), quinina(antimalárico), reserpina (anti-hipertensivo), e outros.

Alguns medicamentos são modificações sintéticas de substâncias naturalmente obtidas. Muitos produtos naturais são hoje substituídos por compostos de síntese (FARNSWORTH et alii, 1985).

Na busca por novos medicamentos anticancerígenos, o Instituto Nacional do Câncer(NCI) já analisou mais de 120.000 plantas de 35.000 espécies e que resultou na descoberta do taxol(*Taxus brevifolia*) e homoharringtonina(*Cephalotaxus harringtonia*) (SPJUT,1985). Recentemente, comprovando a importância das plantas, novos medicamentos

tem sido descobertos como por exemplo, a artemisina (*Artemisia annua*), cuja complexa estrutura estereoquímica impede sua síntese química em larga escala. Este composto tem sido usado com sucesso na China, em pacientes com malária, inclusive os sensíveis e resistentes à cloroquina (KLAYMAN, 1985).

2.1.1. Produção de metabólitos secundários in vitro- Considerações gerais

O interesse crescente por compostos naturais, principalmente de aplicação farmacêutica, e as dificuldades já conhecidas para assegurar o fornecimento constante de plantas, tem estimulado a investigação do potencial de culturas de tecidos e células *in vitro* como alternativa para produção de metabólitos secundários.

Através da cultura de células e tecidos, compostos secundários de importância poderiam ser produzidos sob condições ambientais controladas, constituindo uma fonte contínua de produtos naturais. Células de qualquer planta, tropical ou alpina, poderiam ser facilmente propagadas para produzir seus metabólitos específicos (TABATA, 1977).

Entre as vantagens da produção de compostos secundários *in vitro*, podemos citar a maior facilidade na purificação dos extratos, devido a ausência de grande parte dos pigmentos resultando em redução dos custos (BALANDRIN et alii, 1985).

As culturas de células em suspensão podem ser usadas para biotransformação de substratos; para pesquisa de novos compostos não produzidos na natureza; isolamento de enzimas. Entretanto tem-se observado que as culturas de tecidos e células produzem quantidades muito pequenas do

composto desejado. Cafeína, Dopa, Ajmalicina e serpentina são os únicos compostos usados em farmácia que são produzidos em grandes quantidades pelas culturas de células (ALFERMANN e PETERSEN, 1995).

A otimização desta produção está relacionada com a seleção de genótipos adequados, seleção de clones celulares altamente produtivos e manipulação de parâmetros ambientais e relativos ao meio de cultura (ZENK et alii, 1977).

Consideráveis avanços tem sido alcançados na produção de compostos secundários em cultura de tecidos, através do uso de métodos analíticos sensíveis como radioimunoensaio (HEINSTEIN, 1985).

Um aspecto importante que tem sido estudado nas culturas de tecidos é a questão da diferenciação das células e a produção dos compostos secundários. Sabe-se que nas plantas *in vivo*, os compostos secundários são sintetizados em tecidos e órgãos específicos. O que determina este comportamento característico de cada planta é o seu genoma. Portanto é necessário elucidar o mecanismo e os fatores que influenciam a expressão dos genes relacionados com a síntese de enzimas específicas, envolvidas na regulação de vias biossintéticas dos compostos secundários (ALFERMANN e PETERSEN, 1995).

2.2. Saponinas

Basicamente, os compostos naturais de importância farmacológica são produzidos através das 3 principais vias biossintéticas: Via do ácido chiquímico, via do acetato mevalonato e via do acetato malonato (Figura 1) (VICKERY e VICKERY, 1981).

Saponinas são um grupo de compostos secundários biossintetizados através da via do acetato mevalonato

(VICKERY e VICKERY, 1981), caracterizados por formar espuma abundante quando agitados na água, à semelhança do sabão. São heterósidos formados por constituintes aglicônicos de natureza esteróide ou triterpênica, conhecidos por sapogeninas, ligadas a longas cadeias glicídicas (COSTA, 1978).

Saponinas ocorrem quase que exclusivamente em plantas, tendo sido relatado a ocorrência destes compostos em certas espécies de estrela do mar (OAKENFULL, 1981).

As saponinas ocorrem em grande variedade de plantas, algumas usadas como alimento; por exemplo: soja, grão de bico, amendoim e espinafre. As saponinas são classificadas como esteroidais ou triterpênicas, dependendo da natureza da genina. A maioria das sapogeninas tem sido caracterizadas como triterpênicas (OAKENFULL, 1981).

As saponinas esteroidais tem sido identificadas mais em monocotiledoneas (liliáceas, amarilidáceas, dioscoreáceas, etc.), enquanto as saponinas triterpênicas isoladas principalmente em dicotiledôneas (DOMINGUEZ, 1973).

Além dos açúcares mais comuns que podem ocorrer ligadas às sapogeninas (D-glicose, D-galactose, ácido D-glicurônico, D-ribose, D-xilose, L-arabinose, L-fucose e L-ramnose), tem sido relatado a ocorrência de 3-metil glicose e quinovose (CHANDEL e RASTOGI, 1980).

Inúmeras saponinas tem sido identificadas em grande variedade de plantas nos últimos anos, suas estruturas químicas elucidadas e ações farmacológicas estudadas.

(AGARWAL e RASTOGI, 1974; CHANDEL e RASTOGI, 1980; MAHATO et alii, 1982; MAHATO et alii, 1988).

Saponinas são substâncias sólidas, brancas ou amareladas, geralmente amorfas, dispersíveis na água. O fato de suas soluções aquosas formarem espuma persistente por agitação e muitas vezes serem hemolíticas, permite a pesquisa dos saponósidos nos vegetais (COSTA, 1978). Estas

Figura 1. Vias biossintéticas

(VICKERY e VICKERY, 1981)

propriedades, porém, são comuns às substâncias tensioativas em geral, não podendo ser prova inequívoca da presença de saponinas. São bons indicadores de que saponinas podem estar presentes sendo necessário entretanto, a realização de cromatografia em camada delgada para melhor identificação (OAKENFULL, 1981).

O Índice de espuma é definido como a maior diluição, referido a 1,0 g do fármaco, que em condições padronizadas, produz um anel de espuma persistente de 1,0 cm de altura (COSTA, 1978).

O teste de Liebermann-Burchard tem sido empregado para detectar saponinas. Também tem sido usado para diferenciar as saponinas esteroidais e triterpênicas (CHANDEL e RASTOGI, 1980).

As saponinas formam um grupo de produtos naturais com largo espectro de ação biológica. O significado das saponinas na farmácia, especialmente sua atividade tensioativa, formação de complexos, hemólise, toxicidade e vários efeitos terapêuticos, tem sido revisado (AGARWAL e RASTOGI, 1974).

As saponinas parecem ter propriedades expectorantes e antiinflamatórias, mas o seu efeito na concentração dos lipídeos no plasma é mais significativo. É bem conhecido que dietas com saponinas reduzem o colesterol plasmático em animais. O mecanismo mais provável é que as saponinas na dieta formam complexos com ácidos biliares, impedindo sua reabsorção e aumentando sua excreção fecal. Desta forma as saponinas estimulam a conversão hepática do colesterol em ácidos biliares, pois os ácidos inibem a hidroxilase microssomal que catalisa esta reação (GOODMAN e GILMAN, 1978; OAKENFULL, 1981; MAHATO et alii, 1988).

Saponinas triterpenóides apresentam atividade antimicrobiana. Verificou-se a ação de várias saponinas

inibindo o crescimento de fungos (*Cryptococcus neoformans*); bactérias (*Escherichia coli*) e vírus (herpes). O efeito antiinflamatório de várias saponinas foi observado, entre elas saponinas de *Panax ginseng*, saikosaponinas de *Bupleurum radix*, saponinas triterpênicas de *Anemoneraddeana* (MAHATO et alii, 1988).

Com relação à toxicidade, segundo o INDEX MERCK (1989), a ingestão oral de saponinas é praticamente inócua. Quando injetados na corrente sanguínea, agem como poderosos hemolíticos, mesmo em diluições extremamente altas.

HOSTETTMANN et alii (1982), demonstraram atividade moluscucida (*Biomphalaria glabrata*) de várias saponinas triterpênicas. Verificaram também a necessidade do composto estar na forma de glicósido, pois as sapogeninas correspondentes eram inativas.

JAIN e TRIPATHI (1991) relata a capacidade de algumas plantas contendo glicósidos saponínicos como *Agave cantala* , *Phaseolus vulgaris* e *Balanites roxburghii*, de inibir o ataque de insetos fitófagos.

2.3. Cultura de tecido

Cultura de tecidos vegetais é a técnica de crescimento de células, tecidos e órgãos vegetais em um meio nutriente e na ausência de microorganismos. Entre as aplicações da cultura de tecidos ressaltamos a de ser um instrumento de pesquisa valioso no estudo das plantas, minimizando e controlando variáveis relacionadas com fatores ambientais (SEABROOK, 1980).

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos vegetais tem aberto grandes perspectivas em muitas áreas relacionadas com a produção vegetal, entre elas:

micropropagação de muitas espécies vegetais, cultivo de linhagens livres de doenças, estudo do metabolismo primário e secundário, e melhoramento de plantas. Através da cultura de tecidos, praticamente qualquer espécie vegetal pode ser regenerada *in vitro* utilizando vários processos (DIXON, 1985; TISSERAT, 1985).

A regeneração de plantas através de cultura de tecidos pode ser realizada através : da cultura de embriões, da embriogênese somática e da organogênese. O desenvolvimento da planta através da organogênese consiste na formação e crescimento de brotos diretamente do explante, ou via formação de calos (TISSERAT, 1985).

A maioria das culturas de suspensões celulares são obtidas pela transferência de calos friáveis para meio líquido de mesma composição que o meio usado para crescimento do calos (DIXON, 1985).

2.3.1. Micropropagação

A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido incrementada nos últimos anos devido a vários fatores: dificuldades na reprodução(baixa taxa de germinação por exemplo), exploração irracional resultando na quase extinção de algumas espécies, modificação do meio ambiente (por exemplo poluição) dificultando a coleta de plantas saudáveis.

A propagação vegetativa de plantas medicinais segue as mesmas técnicas usadas para plantas ornamentais. As plantas podem ser regeneradas a partir de meristemas (embrião, ápices caulinares, gemas axilares), ou de tecidos não meristemáticos através da organogênese ou embriogênese. Várias técnicas de propagação clonal tem sido usadas para

plantas medicinais. As plantas regeneradas a partir de meristemas são geneticamente idênticas à planta original, sendo interessante do ponto de vista farmacêutico, visando a produção dos mesmos compostos naturais (BAJAJ, 1988).

2.3.2. Organogênese

Na planta *in vivo*, a morfogênese resulta de processos de divisão e diferenciação celular integrados, dependentes da ação de fitohormônios e luz, principalmente, que agindo à nível gênico, desencadeiam alterações bioquímicas e metabólicas diversas. Na planta adulta, diferentes hormônios são sintetizados em diversos locais e vão afetar os vários tipos de células do organismo (HANDRO e FLOH, 1990).

Nas culturas de tecidos, o controle da organogênese é feito através da adição de reguladores vegetais ao meio e das condições ambientais, principalmente luz e temperatura.

A retirada de um fragmento de tecido de um organismo íntegro e sua colocação num meio de cultura, impõe uma nova condição, onde a capacidade de divisão pode ser readquirida (HANDRO e FLOH, 1990).

Vários fatores relacionados com o explante interferem na organogênese: o órgão fornecedor do explante, a idade, o tamanho do explante, época do ano em que é colhido, características da planta doadora (MURASHIGE, 1974).

Praticamente, qualquer parte da planta pode servir de explante, entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares, regiões meristemáticas, são mais adequados (HANDRO e FLOH, 1990; FLICK et alii, 1986).

Plantas jovens fornecem os melhores explantes, provavelmente porque contém mais tecidos meristemáticos.

Devido às variações sazonais na concentração de auxina endógena, torna-se importante caracterizar a melhor época para obter o explante (FLICK et alii, 1990).

O tamanho e a forma do explante pode ser crítico. A frequência de sobrevivência do explante e a velocidade de desenvolvimento estão diretamente relacionadas com o seu tamanho inicial. Entretanto a probabilidade de explantes livres de microorganismos é inversamente proporcional ao seu tamanho (MURASHIGE, 1974).

Uma resposta comum de um tecido cultivado *in vitro* é a formação de calo, massa de células desorganizadas. Pode ocorrer também apenas proliferação celular nas regiões seccionadas do explante com formação de tecido de cicatrização e regiões de intensa atividade meristemática.

Assim, no explante ou no calo pode ocorrer a formação de caules ou raízes, fenômeno conhecido por organogênese. A organogênese é direta quando ocorre a partir do explante e indireta, quando ocorre a partir de calo (HANDRO e FLOH, 1990). A composição do meio pode ser otimizada visando a regeneração de plantas. O meio Murashige-Skoog (MS) é o mais empregado em cultura de tecidos (TISSERAT, 1985).

O tipo e teor da fonte de carbono utilizada também interferem na organogênese. Sacarose é a mais usada, podendo ser substituída por glicose. Outros açúcares são menos frequentes (FLICK et alii, 1986; HANDRO e FLOH, 1990).

As vitaminas adicionadas ao meio incluem inositol, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, pantotenato de cálcio e biotina. Tiamina é necessária para o crescimento da planta. Outras vitaminas tem sido usadas, como vitamina E, D e vários extratos de plantas com o objetivo de aumentar o crescimento celular (FLICK et alii, 1986). Conforme SKOOG e MILLER (1957), a concentração dos

reguladores de crescimento, particularmente o balanço auxina/citocinina no meio de cultura, influencia a morfogênese na cultura *in vitro*. Geralmente altas concentrações de auxina e baixas de citocinina no meio promovem a formação de calo.

Segundo TISSERAT (1985), a produção de calo também pode ser induzida pela adição de auxina sozinha, entretanto a adição de citocinina aumenta a proliferação do mesmo.

BUTENKO (1968), afirma que o crescimento de culturas de tecidos é limitado pelas reservas de auxina endógena e pela degradação das mesmas. As auxinas exógenas adicionadas ao meio podem servir de substrato para o sistema oxidativo e proteger a auxina endógena da degradação.

Fatores físicos tais como, luz, temperatura e proporção oxigênio/gás carbônico, influenciam a morfogênese.

2.3.2.1. Produção de compostos secundários em cultura de calos

A produção de compostos secundários em cultura de calos, tem sido esporadicamente relatada. A idéia geral é que calo é uma massa de células indiferenciadas e portanto não capacitada a sintetizar substâncias. Entretanto, segundo MURASHIGE(1974), ocorrem variações no tamanho, grau de vacuolização, conteúdo celular e parede celular. Estes calos são na verdade desorganizados, mas não indiferenciados.

TABATA et alii (1974) relataram pigmentação de calos de *Lithospermum erithrorhizon* quando cultivados em meio contendo ácido indolil acético(AIA) e cinetina(CIN). Estes pigmentos contém chiconina, que tem sido usada no

tratamento de queimaduras e ferimentos. O efeito da luz na produção destes pigmentos foi inibitório, sendo interessante relacionar esta inibição com o fato destes pigmentos serem sintetizados no súber de raízes *in vivo*.

Outro aspecto seria a influência do explante na produção de compostos secundários em calos deles originados.

TABATA e HIRAOKA (1976), demonstraram que explantes de folha, raiz e semente produziram calos que não se diferenciaram quanto à qualidade e quantidade de alcalóides produzidos, embora na planta *in vivo*, nicotina e anabasina sejam sintetizadas nas raízes.

Com relação à influência dos reguladores de crescimento na síntese de compostos secundários, TABATA e HIRAOKA (1976) verificaram que ácido 2,4 diclorofenoxiacético(2,4-D) estimulou o crescimento do calo, enquanto altas concentrações inibiram a síntese de nicotina. Entretanto, na ausência deste regulador, não houve indução de organogênese e nem aumento no teor de nicotina, sendo provável que outros fatores estejam envolvidos.

YASAKI e OKUDA (1989) comparando a produção de taninos em calos de *Cinnamomum cassia* em meios contendo AIA e ácido naftaleno acético(ANA), não observaram diferença no conteúdo, nos calos crescidos nestes dois meios.

JHA et alii (1988) relataram que calos de *Cephaelis ipecacuanha* produziram alcalóides (0,35% de emetina e 0,93% de cefelina) quando crescidos na presença de ácido indol butírico (AIB), AIA ou ANA. Nas raízes da planta *in vivo* a produção é 1,28% de emetina e 0,53% de cefelina. Aescina é uma mistura de glicósidos triterpênicos que

ocorre em sementes de *Aesculus hippocastanum* e é usada na prevenção e tratamento de perturbações vasculares periféricas. PROFUMO et alii(1991), relataram a produção deste glicósido em cultura de calos estabelecida a partir de folhas de plântulas, em meio MS, suplementado com CIN, ANA, 2,4-D (2mg/l cada); e em embrióides obtidos a partir destes calos. A produção de aescina nos calos foi (12,2% do peso seco) semelhante à encontrada nas sementes (10,7%); já nos embrióides foi 7 vezes maior (69,5%). Com o uso de segmentos de ramos jovens como explante, que *in vivo* produz quantidades muito pequenas de aescina; PROFUMO et alii(1994) constataram que cultura de tecidos constitui excelente fonte de aescina.

2.3.3. Suspensão de células

Segundo ALFERMANN e PETERSEN (1995), foi na década de 50 que foram realizadas tentativas bem sucedidas de submeter o crescimento de células *in vitro* a algumas condições, para produzir compostos úteis. Muitas pesquisas foram realizadas desde então, mas somente 30 anos mais tarde (1982), Fujita e colaboradores demonstraram a possibilidade de produção de um composto natural de importância, em escala comercial (chiconina /*L. erithrorhizon*).

ZENK et alii (1977) publicaram uma estratégia para produção de compostos secundários em suspensão de células assim resumida: Seleção de plantas altamente produtivas do composto desejado; estabelecimento de calos a partir destas plantas selecionadas; análise química dos calos(composto desejado); seleção de células do calos altamente

produtivas; estabelecimento de cultura de suspensão celular a partir destes calos; análise química da suspensão; seleção de linhagens celulares altamente produtivas e estáveis; otimização do processo.

Segundo ZENK et alii (1977), considerando que o potencial biossintético para formar determinado composto secundário é determinado geneticamente, e que este potencial estaria presente nos calos, é importante estabelecer a cultura de células a partir de plantas altamente produtoras do composto desejado.

Entretanto, calos originados de uma mesma planta, altamente produtora, podem apresentar características diferentes em relação à aparência, crescimento, compostos produzidos ou velocidade de produção; conforme demonstrou CONSTABEL et alii (1981), analisando vários clones derivados de uma única folha de *Catharanthus roseus*, obteve espectros diferentes de alcalóides produzidos.

A seleção de células diferenciadas, melhor produtoras de compostos secundários, na massa de células aparentemente homogênea de uma cultura de calos, tem sido relatada por ZENK et alii (1977), como parte da estratégia para produção de alcalóides em *C. roseus*.

Segundo os mesmos autores, a causa da ocorrência desta variação não está completamente esclarecida, podendo ser devido a mutações genéticas ou variações genéticas normais dentro de uma população de células somáticas.

2.3.3.1. Meio de cultura

Muitos trabalhos tem sido desenvolvidos procurando estabelecer as melhores condições de meio de cultura para a produção de compostos secundários.

Com relação à fonte de carboidrato, MIZUKAMI et alii (1977), demonstraram que a sacarose é muito superior à glicose e frutose na produção de chiconina por células de *L. erithrorhizon*. Aumentando a concentração de sacarose de 3% para 5%, houve aumento considerável na produção de chiconina (quase o dobro).

Com relação às vitaminas, conforme DOUGALL(1980) elas não são necessárias, uma vez que as plantas *in vivo* as produzem. A vantagem em adicionar estes compostos seria minimizar o estresse nas culturas.

Entretanto, segundo FLICK et alii (1986), a tiamina parece ser necessária para o crescimento em cultura de células, enquanto as outras aumentam o crescimento em alguns sistemas.

OHIRA et alii (1976), investigando as necessidades de tiamina por várias culturas de células, concluíram que as plantas podem ser divididas em 2 grupos, um que requer tiamina, enquanto o outro pode crescer sucessivamente na ausência de suprimento externo desta vitamina. Os autores relacionaram a necessidade de tiamina com o grau de diferenciação das células.

Na tentativa de formulação do melhor meio de cultivo de células para produção de compostos secundários, alguns autores têm verificado que o melhor meio para crescimento nem sempre é o melhor meio para produção. KNOBLOCK et alii(1981), verificaram que a produção de putrescinas por *Nicotiana tabacum*, foi inversamente proporcional à concentração de fosfato no meio. Por outro lado, há relação direta entre concentração de fosfato e crescimento da cultura.

Quanto à melhor combinação de reguladores de crescimento, ZENK et alii(1977) verificaram que AIA é o

regulador que produz melhor crescimento e melhor produção de alcalóides, enquanto 2,4-D e ANA suprimem a síntese destes compostos. Benzil adenina purina (BAP), na ausência de uma auxina, estimula a síntese de alcalóides, mas reduz o crescimento celular.

O efeito inibitório do 2,4-D na síntese de compostos em cultura de tecidos, também foi verificado por HOEKSTRA et alii(1990). Em cultura de *Cinchona ledgeriana*, os autores observaram que substituindo 2,4-D por ANA, houve produção significativa de alcalóides.

Por outro lado, LINDSEY e YEOMAN (1983), demonstraram que a diminuição no nível de 2,4-D, provocou diminuição nos teores de alcalóides produzidos por cultura de células de *Datura inoxia*.

2.3.3.2 Condições ambientais

HAGIMORI et alii(1982) estudando o efeito da luz na produção de cardenólidos por *Digitalis purpurea*, verificaram correlação positiva, mas não total dependência, uma vez que culturas *in vitro* crescidas no escuro apresentaram 1/3 da produção.

Com relação à temperatura, pouca informação existe sobre o seu efeito na produção de metabólitos.

Segundo MARTIN (1980), embora o pH do meio de cultura seja ajustado entre 5 e 6 , antes da autoclavagem, o fato de serem pouco tamponados pode resultar em alteração significativa durante o cultivo *in vitro*.

2.3.3.3 Otimização

O uso de precursores no meio de cultura tem sido empregado para aumentar a síntese de metabólitos, embora os resultados sejam contraditórios (BERLIN, 1988).

BERLIN e WITTE (1982) utilizando fenilalanina como precursor em cultura de *Nicotiana tabacum*, verificaram que somente certa quantidade do precursor foi usado na biossíntese das putrescinas, sendo que a atividade da enzima relacionada foi o fator limitante. Os autores concluíram que o precursor não pode ser tóxico para as células e, não devem ser substratos para reações inespecíficas que impedem a canalização dos precursores para as vias biossintéticas desejadas.

CHUNG e STABA(1988) relataram aumento de 66% na produção total de alcalóides, em culturas de *Cinchona ledgeriana* suplementadas com triptofano.

Outro recurso utilizado para aumentar a produção de metabólitos secundários, é o uso de culturas autoclavadas de fungos(elicitor). SEITZ et alii(1989) relataram o aumento da atividade da fenil alanina amonia liase (PAL), e triptofano descarboxilase (TDC), com consequente aumento da produção de alcalóides indólicos em suspensão de células de *Catharanthus roseus* tratadas com culturas autoclavadas de *Pythium aphanidermatum* (elicitador).

A cultura de células em suspensão pode ser também utilizada para conversão de precursores exógenos em compostos desejáveis(biotransformação). Através da biotransformação compostos não sintetizados *in vivo* podem ser produzidos em cultura de células (BALANDRIN, 1985).

2.4. Gênero *Pfaffia*

O gênero *Pfaffia* ocorre no novo mundo desde o México até Argentina. Compreende provavelmente cerca de 30 espécies (ELIASSON, 1988).

Encontramos relatos de várias espécies deste gênero usadas na medicina popular e atualmente sendo alvo de pesquisas farmacológicas. Entre elas: *P.paniculata* (Martius) Kuntze (ginseng do Brasil), *P.iresinoides* (Spreng), *P.tuberosa* (Spreng) Hicken, *P.pulvurulenta* Mart.

2.4.1. Posição taxonômica (segundo Cronquist)

Divisão	MAGNOLIOPYTA
Classe 1	MAGNOLITAE
Subclasse III	CARYOPHYLLIDAE
Ordem 1	CARYOPHYLLALES
Família	AMARANTHACEAE Juss.
Gênero	PFAFFIA
Espécie	<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) Pedersen.

A família AMARANTHACEAE é formada por cerca de 60 gêneros e 900 espécies, difundida nos trópicos, subtropicos e regiões temperadas da América e África. No Brasil ocorrem 12 gêneros com cerca de 86 espécies (BARROSO, 1978).

2.4.2. Constituintes químicos

Estimulados pelo uso popular de várias espécies do gênero *Pfaffia*, tem sido isolados e identificados vários compostos químicos, relatados a seguir:

TAKEMOTO et alii (1983) analisando o extrato metanólico das raízes de *Pfaffia paniculata*, isolou um novo triterpeno identificado como ácido pfáfico (0,006% do peso seco). O ácido pfáfico (Fig.2) apresenta-se como cristais incolores e exibe reação de Liebermann-Burchard positiva.

Ainda nesta espécie foram recentemente identificados 6 novos saponósidos do ácido pfáfico, nomeados pfaffósidos A, B, C, D, E e F; além de estigmasterol, sitosterol e alantoina (NISHIMOTO et alii, 1984; NAKAI et alii, 1984).

O sitosterol (Fig.3) e o estigmasterol (Fig.4) são fitosteróis das plantas superiores, de ampla distribuição. Podem existir como combinações de natureza heterosídica, denominadas fitosterolinas. O sitosterol ou sitosterinas encontram-se nos óleos de germes de cereais, no de algodão (β -sitostrina) e de soja (γ -sitosterina).

O estigmasterol ou estigmasterina é encontrada nos óleos de soja, cacau e trigo, sendo utilizado na preparação de hormônios, desoxicorticosterona e progesterona (COSTA, 1978).

A alantoina (2,5-Dioxo-4-imidazolidinil uréia; 5-ureidohidantoína; glioxildiureído) é produto do metabolismo das purinas. Solúvel em água e álcool, mais solúvel à quente. É utilizado como cicatrizante (MERCK INDEX, 1989).

	R1	R2	R3
Ácido Pfáfico	H, β -OH	H2	H2 TAKEMOTO et alii(1983)
Ác. pulverico	O	H2	O SHIOBARA et alii(1992)

	R1	R2	
Ecdisterona	H	OH	NISHIMOTO et alii, 1987
Pteterona	OH	H	idem

Figura 2. Compostos químicos do gênero *Pfaffia*

Chikusetsusaponina

NISHIMOTO et alii (1987)

R1: glicuropiranosil

R2: glicopiranosil

Sitosterol

Figura 3. Compostos químicos do gênero *Pfaffia*

estigmasterol

iresinósido

SHIOBARA et alii(1992)

Figura 4. Compostos químicos do gênero *Pfaffia*

	R1	R2	R3	
Ácido oleanólico	CO ₂ H	OH	H	NISHIMOTO et alii (1986)

Figura 5. Compostos químicos do gênero *Pfaffia*.

Nas raízes de *P. iresinoides* foram identificados e isolados ecdisteroides, três novos glicósidos ecdisteroides, polipodine, pterosterona (Fig.2) e chikusetsu-saponina (Fig.3). A análise quantitativa através de HPLC mostrou altos valores para ecdisteronas (Fig.2) (%/peso seco) em folhas (0,92%), caule (0,17%) e raízes (0,62%) (NISHIMOTO et alii, 1987 ;1988).

NISHIMOTO et alii (1986) encontraram ecdisterona (0,23%) e ácido oleanólico (Fig.5) em raízes de *P. tuberosa*. Este valor foi considerado baixo comparado com o que foi encontrado em *P. iresinoides*.

SHIOBARA et alii(1992), isolaram um pigmento amarelo, iresinósido(Fig.4), em raízes de *P. iresinoides*.

OLIVEIRA et alii(1990) analisando algumas espécies de *Pfaffia*, encontraram em extrato metanólico de raízes de *P. glomerata* 0,64% de ecdisona e 0,057% de rubrosterona.

Ecdisterona ou β -ecdsona que é o hormônio da muda dos insetos, foi descoberto em plantas em 1966. A ocorrência deste esteróide no reino vegetal sugere que as plantas desenvolveram a capacidade de sintetizar estes compostos para se proteger de insetos fitófagos (HARBONE,1973).

2.4.3. Uso popular e ação farmacológica

P. paniculata é usada popularmente no controle de diabetes, como tônico e afrodisíaco. Também é atribuída ação cicatrizante e antiulcerosa, provavelmente devido à presença de alantoína (OLIVEIRA, 1986).

NISHIMOTO et alii(1984) demonstraram que pfa-fósido A e C apresentaram efeito inibitório no crescimento de células tumorais de melanomas (B-16).

Segundo MAZZANTI & BRAGHIOLI (1994) *P. paniculata* apresenta ação antiinflamatória, analgésica e baixa toxicidade.

ARENAS E AZORERO(1977), relataram o uso de *Pfaffia tuberosa*(Spreng)Hicken, no tratamento da infertilidade, pelos povos indígenas do Paraguai.

2.4.4 *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen

P. glomerata conhecida popularmente como ginseng brasileiro, corango sempre-viva (RIBEIRO & PEREIRA, 1994) e como anador e acônito do mato, no nordeste, tem uso popular como energética, antitérmica e antigripal (ALCÂNTARA et alii, 1994). Relata-se também seu uso popular no controle de diabetes, colesterol e em melanomas. (RIBEIRO & PEREIRA, 1994).

Pfaffia glomerata é uma planta herbácea, ereta, perene, ramificada, medindo até 200 cm de altura. Vários estudos a respeito de sua propagação tem sido desenvolvidos, principalmente devido à coleta predatória que esta e muitas plantas medicinais tem sofrido. Estudando espécies de *Pfaffia*, MAGALHÃES et alii (1994), verificaram que sementes de *P. glomerata* apresentaram 50% de germinação enquanto *P. iresinoides*, 70%.

ALCÂNTARA et alii (1994) demonstraram o efeito antimicrobiano do extrato das raízes de *P. glomerata* para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus fecalis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) - Departamento de Química-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)-Universidade de São Paulo (USP)- Campus Piracicaba.

As análises químicas foram realizadas nos laboratórios da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP)-Campus Taquaral.

Os experimentos realizados podem ser assim esquematizados: Micropropagação, Produção de calos, Cultivo de células em suspensão, Alteração das condições de cultivo de calos visando a produção de compostos secundários, Análises químicas para saponósidos.(Figura 7)

Espécimes da planta foram cedidas pelo Horto do Departamento de Botânica/Laboratório de Plantas medicinais Prof. Valter Accorsi, tendo posteriormente sido propagadas no CEBTEC .

Estas plantas foram classificadas pelo Prof. Ricardo R. Rodrigues, do Departamento de Botânica/ESALQ como sendo *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen.(Figura 6)

Figura 6 .*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen

Figura 7. Esquema geral dos experimentos realizados com *Pfaffia glomerata*

3.1 Obtenção de plantas *in vitro*

Os ápices caulinares de brotos, com cerca de 3 cm de altura, recentemente colhidos, foram desprovidos das folhas mais externas e colocados em solução de hipoclorito de sódio(0,4%) a 20% (V/V), contendo 2 gotas de Tween 20(agente emulsificante pertencente à classe dos polissorbatos), por 15 minutos sob agitação frequente. Após a desinfecção foram lavados 3 vezes com água destilada esterilizada.

Em placas de Petri e com o auxílio de pinça e bisturi, foi retirado o restante das folhas, deixando um ápice com 1,0 cm, sendo imediatamente inoculado em meio MS modificado, sem regulador de crescimento. A desinfecção e inoculação dos explantes foram realizadas em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas.

O meio de cultura utilizado foi o de Murashige-Skoog (1962) modificado, conforme tabela 01. Foi utilizado 30 g/l de sacarose e 7,5g/l de ágar (Parahyba). O pH foi ajustado para 5.6 - 5.8. As culturas foram mantidas a 25°C $\pm$ 2°C; luminosidade de $\pm$ 2000 lux com fotoperíodo de 16/8 horas (claro /escuro).

3.2 Micropropagação - Efeito do BAP

Segmentos nodais obtidos da região mediana de caules de plantas de mesma idade (30 -40 dias), cultivadas *in vitro*, com $\pm$ 0,5 cm de altura e $\pm$ 0,1 cm de diâmetro, foram inoculados em meio MS modificado (tabela 01), suplementado com BAP nas concentrações: 0,25; 0,5; 1,0;

1,5 mg/l. O controle foi realizado sem adição de BAP, representado por 0,0mg/l. Cada tratamento foi realizado com 10 repetições. As condições de cultivo são as mesmas do item 3.1 .

Tabela1. Composição do meio de cultura básico Murashige-Skoog(1962) e a modificação efetuada.

COMPONENTES	MS (1962) mg/L	MODIFICAÇÃO mg/L
Sais		
NH ₄ NO ₃	1650	
KNO ₃	1990	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	
KH ₂ PO ₄	170	
Na ₂ EDTA	37,31	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,81	
H ₃ BO ₃	6,2	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6	
KI	0,83	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	
Constituintes orgânicos		
Glicina	2,0	
Ácido Nicotínico	0,5	
Piridoxina -HCl	0,5	
Tiamina-HCl	0,1	0,5
Mio-inositol	100,0	

As observações do efeito do BAP foram realizadas durante 30 dias, semanalmente. As variáveis mensuradas foram: altura(cm), número de brotos/explante, número de nós/broto.

3.3 Efeito do 2,4-D

Explantos caulinares, como os descritos no item anterior, foram inoculados em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D nas concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 mg/L. O controle foi feito sem adição de auxina, sendo representado por 0,0mg/L. Foram feitas 10 repetições e as condições de cultivo as mesmas do item 3.1 .

O efeito do 2,4-D foi observado através do surgimento de raízes e/ou calos.

3.4 Produção de calos -Interação de CIN X 2,4-D

Os explantes testados foram segmentos de caules e raízes de plantas de mesma idade(30 - 40 dias) obtidas *in vitro*.

Os segmentos caulinares foram obtidos dos entre-nós da região mediana de caules de mesmo diâmetro, medindo cerca de 1,0 cm de altura.

Os segmentos radiciais foram obtidos da região mediana de raízes de diâmetros semelhantes, medindo cerca de 1,0 cm de comprimento.

Os dois tipos de explantes foram inoculados em meio MS modificado(tabela 01) suplementado com CIN e 2,4-D.

As concentrações de CIN testadas foram: 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 mg/L. As concentrações de 2,4-D testadas foram: 0,0; 0,1; 1,0 e 2,5 mg/L. As interações entre os dois reguladores resultaram em 20 tratamentos, cada um realizado com 10 repetições. Os tratamentos foram nomeados com as letras do alfabeto, de A a T. Este experimento foi conduzido no escuro, à $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

A avaliação do efeito de cada interação dos dois reguladores foi realizada após 50 dias, através: da frequência(%), tamanho e aspecto dos calos induzidos. Através da análise destes parâmetros foram selecionados 6 tratamentos com os quais foram realizados os testes de incremento de peso fresco. Os calos foram classificados segundo o diâmetro apresentado(tamanho): 1:até 0,2cm; 2: até 0,5cm; 3: até 1,0cm; 4: até 1,5cm; 5:mais de 1,5cm.

3.4.1 Incremento de peso fresco

Em condições assépticas (câmara de fluxo laminar), foram pesados inóculos de $0,10 \pm 0,02 \text{ g}$ provenientes dos tratamentos selecionados no item anterior e imediatamente inoculados em meios de igual composição. Para cada tratamento foram realizadas 10 repetições, sendo mantidas no escuro, à $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

As medidas de incremento de peso foram realizadas no 22º, 37º, 52º e 67º dia. Após a medida do 37º dia, os calos foram imediatamente transferidos para meios novos, de mesma composição, dando prosseguimento ao experimento.

3.4.2 Resíduo seco

Os calos dos 6 tratamentos selecionados foram multiplicados através de reinoculações em meios novos de mesma composição, a cada 30-40 dias. Estes calos foram secos em estufa à 60° C até peso constante, sendo então pesados e calculado a porcentagem de resíduo seco.

3.5 Cultivo de células em suspensão

Através das análises de incremento de peso fresco e porcentagem de resíduo seco, foi selecionado 1 tratamento, cujos calos forneceram material para a suspensão celular. Inóculos destes calos pesando cerca de 1 g, foram transferidos para meio líquido de mesma composição do tratamento selecionado. A cultura de células em suspensão foi realizada em erlenmeyer de 250 ml, contendo cerca de 75 ml de meio, sob agitação constante de aproximadamente 100 rpm, a 25° C, mantidos no escuro e claro($\pm$ 2000 lux / fotoperíodo de 16/8 horas claro/escuro).

Foram realizadas reinoculações em meios novos a cada 30 dias, num total de 3 passagens. O material foi filtrado à vácuo, o resíduo celular foi pesado e liofilizado, sendo então armazenado em dessecador para posterior análise química. O meio líquido filtrado, foi centrifugado à 10.000 rpm por 10 min. à 25° C, decantado e posteriormente congelado e liofilizado.

3.6 Modificações do meio de cultivo visando melhorar a produção dos saponósidos

Calos provenientes do tratamento selecionado após análise de incremento de peso fresco e porcentagem de resíduo seco, foram inoculados em meios com as seguintes condições: sacarose 40 g/L; sacarose 60 g/L; glicose 40 g/L; glicose 60 g/L; fenilalanina 1,65 g/L; fenilalanina 3,30 g/L; triptofano 2,04 g/L; triptofano 4,08 g/L. O meio básico utilizado foi o MS modif. contendo a interação de CIN X 2,4-D selecionada.

Calos provenientes do tratamento selecionado (Meio MS modificado, contendo 1,0 mg/L de 2,4-D X 0,5 mg/L de CIN), também foram cultivados no claro ($\pm$ 2000 lux/ fotoperíodo 16/8 , claro/escuro).

Os calos foram secos em estufa à 60°C até peso constante, e armazenados para posterior análise química.

3.7 Análises químicas para avaliação da produção de saponinas

3.7.1 Amostras

A figura 8 mostra o esquema de seleção das amostras.

1. Raízes de *Pfaffia glomerata* (figura 9)
2. caule (roxo) de *Pfaffia glomerata* (Figura 10)
3. (CM/E) : calos originados de explantes caulinares(C), cultivados no escuro(E), em meio MS modificado,

suplementado com 1.0 mg/L de 2,4-D e 0,5 mg/L de CIN (Tratamento M)- experimento 3.4

4.RM/E: Calos originados de explantes radiciais, cultivados em meio idêntico ao anterior.

5.CT/E: Calos originados de explantes caulinares (C), cultivados no escuro (E), em meio MS modificado, suplementado com 2,5 mg/l de 2,4-D e 2,5 mg/l de CIN (tratamento T) - experimento 3.4

6.RT/E: Calos originados de explantes radiciais, cultivados em meio idêntico ao anterior.

7.RM/E/Sc: Resíduo celular da suspensão(Sc) obtida a partir de calos derivados de explantes radiciais(R), (tratamento M), cultivada no escuro(E)- experimento 3.5

8.RM/L/Sc: Resíduo celular (cultivo no claro-L) obtidos no experimento 3.5(idem anterior)

9.RM/E/ML: Meio líquido(ML) da suspensão celular (cultivo no escuro) obtido no experimento 3.5

10.RM/L/ML: Meio líquido(ML) da suspensão celular (cultivo no claro-L) obtido no experimento 3.5

11.RM/E/S1: Calos cultivados em meio MS modificado contendo 40 g/l de sacarose - experimento 3.6

12.RM/E/S2: Calos cultivados em meio MS modificado contendo 60 g /l de sacarose - experimento 3.6

13.RM/E/G1: Calos cultivados em meio MS modificado contendo 40 g/l de glicose-experimento 3.6

14.RM/E/G2: Calos cultivados em meio MS modificado contendo 60 g/l de glicose- experimento 3.6

15.RM/L: Calos cultivados em meio MS modificado / claro -experimento 3.6

Figura 8. Esquema da seleção de amostras para análises

químicas (M: 1,0mg/L 2,4-D x 0,5mg/L CIN ; T: 2,5mg/L 2,4-D x 2,5mg/L CIN; S1:40g/L sacarose; S2: 60g/L sacarose; G1:40g/L glicose; G2:60g/L glicose; ML:meio líquido; Sc:resíduo celular).

Figura 9. Raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (A) ;
Caule de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (B)

3.7.2 Determinação do teor de saponina bruta

Método de NAMBA et alii (1974)

Com exceção das amostras de número 9 e 10, as demais, especificadas no item anterior, foram analisadas.

A amostra pulverizada (8 g) foi submetida a extração com metanol em aparelho de soxhlet, por 8 horas. O extrato obtido foi evaporado até secura. O resíduo foi dissolvido em água destilada e lavado com 3 porções de éter etílico. A solução aquosa foi aquecida em banho maria até eliminação total do éter etílico. Após resfriamento, a solução aquosa foi submetida à extração com várias porções de butanol saturado com água. A camada butanólica, após lavagem com água, foi evaporada até secura. Obteve-se assim o resíduo de saponina bruta.

Alíquotas do extrato metanólico e butanólico foram retiradas, para serem analisadas cromatograficamente. Devido a estas retiradas, o valor de saponina bruta obtida no final, foi corrigido por um fator de correção(F). A seguir a fórmula para obtenção deste fator(F) é apresentada:

$$F = \frac{(V_b - V_{ab})}{V_b} \cdot \frac{(V_m - V_{am})}{V_m}$$

V_b: volume do extrato butanólico

V_{ab}: volume da alíquota retirada do extrato butanólico

V_m: volume do extrato metanólico

V_{am}: volume da alíquota retirada do extrato metanólico

$$S(g) \div F = S_v(g)$$

O valor de saponina (g) obtido , deve ser dividido pelo fator de correção (F) obtido, resultando o valor verdadeiro de saponina(S_v).

SS 1% refere-se a solução saponínica a 1% de cada amostra.

Após a preparação da bateria de tubos para cada amostra, os tubos são agitados no sentido vertical, vigorosamente, durante 15 segundos(cerca de 30 vezes).

A leitura deve ser efetuada após 15 minutos de repouso e consiste em verificar qual a maior diluição, que apresenta um anel de espuma de 1,0 cm de altura. Logo, o Índice de espuma é um valor de diluição e é calculado considerando a concentração da solução saponínica utilizada e a diluição ocorrida na bateria de tubos.

3.7.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Todas as amostras especificadas no item 3.1 foram analisadas.

3.7.4.1 Preparo das amostras para CCD:

Extrato metanólico: Foi constituído por alíquota retirada do extrato metanólico obtido em 3.7.2 .

Extrato butanólico: Foi constituído por alíquota retirada do extrato butanólico obtido em 3.7.2 .

(O resultado final obtido em 3.7.2, foi corrigido em função da retirada destas alíquotas).

Padrão: solução metanólica a 1% de saponina Merck.

As amostras 9 e 10, foram constituídas pelo resíduo obtido do meio líquido liofilizado, dissolvido em metanol (extrato metanólico). Este extrato metanólico foi evapo-

rado até secura, tendo sido, após esta fase, trabalhado como as demais amostras (item 3.7.2.).

3.7.4.2 Sistema cromatográfico

Como fase móvel- fase estacionária foi utilizado Butanol: Acetato de etila: Água: Ácido fórmico na seguinte proporção: 4: 1: 5: 0,6.

O suporte utilizado foi cromatoplaça de sílica gel 60, espessura 0,25 mm, 20X20cm, da Merck.

As amostras e o padrão foram aplicados com 6 toques (capilar).

A cromatografia foi realizada à 25° C, com desenvolvimento único e ascendente, percurso de 11,7 cm em cuba com saturação completa. Como visualizadores foram utilizados luz ultra violeta e revelador sulfovanílico.

Após a nebulização com o revelador sulfovanílico, as cromatoplaças foram aquecidas a 100° C /10min.

3.7.5 Análise por Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras analisadas foram: 1, 2, 4, 8, 10 , 11, especificadas no item 3.7.1 . Foram utilizados os extratos metanólicos, obtidos em 3.7.2, conforme esclarecido no item anterior. Os extratos foram diluídos 9 vezes.

Como padrões foram utilizadas soluções metanólicas de alantoina 0,1% (Merck) e saponina 0,1% (Merck).

O aparelho utilizado foi o cromatografo líquido SHIMADZU SPD-6AV , equipado com coluna SUPERCOSIL LC-18 e detectores UV-Vis-espectrofotômetro. Foi utilizado como fase móvel metanol(Merck) e fluxo de 1,0 ml/min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de plantas *in vitro*

Após 30-40 dias verificamos o desenvolvimento da maioria dos explantes em plantinhas inteiras, com 6 a 8 cm de altura. As plantas eram muito vigorosas, com entrenós longos e não apresentaram brotação.

Os explantes foram inoculados em meio sem regulador de crescimento, portanto os resultados obtidos podem ser atribuídos à atividade da auxina endógena produzida nos ápices caulinares , resultando plantas altas.

Ápices caulinares e gemas axilares são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro*, pois satisfeitas as necessidades nutricionais, se desenvolvem naturalmente em plantas inteiras.

4.2 Micropropagação - Efeito do BAP

Este teste foi conduzido para verificar qual concentração de BAP seria mais produtiva para gerar um crescimento maior, em termos de número de brotos e número de nós, fornecendo maior número de explantes. Os explantes utilizados foram segmentos nodais(gemas axilares), que segundo GRATTAPAGLIA(1990), são os preferidos pois garantem

fidelidade genética, fator importante na micropropagação de plantas medicinais.

A citocinina utilizada foi o BAP, por ser a mais usada nos experimentos de micropropagação e também pelo seu baixo custo. Observamos na figura 10, o efeito do BAP, após 50 dias.

Podemos observar na Figura 11, que a utilização do BAP provocou a quebra da dominância apical das auxinas o que resultou plantas menores (2,0 cm), entretanto os diferentes teores de BAP não produziram diferenças significativas na altura das plantas. A altura das plantas controle (tratamento A), foi praticamente o dobro, mostrando que nestas o que prevaleceu foi a ação da auxina endógena. É interessante notar que foi na última semana que ocorreu o maior crescimento das plantas controle, dobrando praticamente a altura.

Outro efeito do BAP é produzir plantas em tufo, o que é constatado na Figura 12. Observamos que o número de brotos é quase três vezes maior nas plantas tratadas com a citocinina em relação ao controle. Também não houve diferença significativa entre os diferentes teores de BAP aplicados.

Também foi observado que as plantas controle desenvolveram raízes completas, o que não se verificou nos tratamentos com BAP. Estes resultados estão de acordo com a ação das citocininas de desenvolver as partes aéreas e suprimir o enraizamento (MURASHIGE, 1974).

Figura 10. Efeito de diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5mg/L) em segmentos nodais de *P.glomerata*, após 50 dias de cultivo em meio MS modificado (A). Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5mg/L) em segmentos nodais de *P.glomerata* após 50 dias de cultivo em meio MS modificado (B).

Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de BAP na altura (cm) de segmentos nodais de *P. glomerata* cultivados em meio MS modificado. IA: 0,0mg/L; IB: 0,25mg/L; IC: 0,5 mg/L; ID: 1,0mg/L; IE: 1,5mg/L .

Figura 12. Efeito de diferentes concentrações de BAP na brotação de segmentos nodais de *P. glomerata* cultivados em meio MS modificado. IA: 0,0mg/L ; IB: 0,25mg/L; IC: 0,5 mg/L; ID: 1,0mg/L; IE: 1,5mg/L .

Figura 13. Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de nós /broto ,em *P.glomerata* cultivada em meio MS modificado. IA: 0,0mg/L; IB: 0,25mg/L; IC: 0,5mg/L; ID: 1,0mg/L; IE: 1,5mg/L.

Sabe-se que as citocininas são utilizadas em concentrações bem variadas, podendo chegar a 30 mg/L em determinadas culturas (MURASHIGE, 1974). Entretanto, segundo GRATTAPAGLIA (1990), o excesso de citocinina pode levar a entufamento excessivo e diminuição demasiada dos entrenós, o que seria desfavorável à micropropagação.

Na Figura 13 observamos que os cinco tratamentos produziram número de nós semelhantes. Entretanto as plantas tratadas com BAP, são plantas mais baixas e portanto os entrenós mais curtos, porém não comprometendo a qualidade do explante.

4.3 Efeito do 2,4-D

Como observamos na Figura 10, à medida que aumentamos o teor de 2,4-D, o desenvolvimento da parte aérea vai sendo reprimido. Durante este tempo de observação (50 dias), os diferentes teores do regulador não influenciaram significativamente o tamanho dos calos. Plantas controle se apresentaram completas com raízes e parte aérea desenvolvidas.

4.4 Produção de calos - interação 2,4-D X CIN

O objetivo deste experimento foi verificar a influência de diferentes explantes, da interação de 2,4-D e CIN em diferentes níveis, no crescimento de calos e produção de saponósidos, selecionando as melhores condições. Os calos foram mantidos no escuro, pois segundo SEABROOK (1980), evitaria o efeito morfogenético da luz sobre os explantes.

As tabelas 2 e 3 apresentam a produção de calos formados (%) após 50 dias de cultivo no escuro, em meios suplementados com 2,4-D X CIN (diferentes teores), a partir de explantes radiciais e caulinares, respectivamente. Ainda nestas tabelas podemos verificar a magnitude destes calos formados, através da classificação segundo o diâmetro apresentado (como explicado no item 3.4).

Podemos observar na Tabela 2 e 3 que na ausência de auxina (tratamentos A a E) praticamente não houve formação de calos, com exceção dos tratamentos C e E que apresentaram uma produção de 10% de calos muito pequenos.

Observamos nestas tabelas (2 e 3) que a adição de uma mínima quantidade de 2,4-D aumenta consideravelmente a porcentagem de calos formados, confirmando a atividade das auxinas como potente indutor de calos.

Avaliando os dados apresentados nestas tabelas, foi possível selecionar os tratamentos I, M, N, O, Q, S e T como sendo os que apresentaram maior porcentagem de calos bem desenvolvidos.

Entretando, durante as reinoculações seguintes, os calos do tratamento I foram perdendo a capacidade de crescimento apresentando-se muito escurecidos. Portanto com exceção deste, os demais foram analisados no teste de incremento de peso fresco.

Tabela 2. Produção de calos a partir de explantes radiciais, após 50 dias de cultivo em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D X KIN

Tratamento 2,4-D X KIN mg/l	Produção de calos					
	Total %	Tipo* %				
		1	2	3	4	5
A:0,0 x 0,0	0					
B:0,0 x 0,1	0					
C:0,0 x 0,5	10	100				
D:0,0 x 1,0	0					
E:0,0 x 2,5	10	100				
F:0,1 x 0,0	20	100				
G:0,1 x 0,1	100	50	50			
H:0,1 x 0,5	100		30	70		
I:0,1 x 1,0	100	20	10	70		
J:0,1 x 2,5	100	50	50			
K:1,0 x 0,0	100	70	20	10		
L:1,0 x 0,1	100	30		30	40	
M:1,0 x 0,5	80	40	20	40		
N:1,0 x 1,0	80		20	20	20	40
O:1,0 x 2,5	100		10	20	20	50
P:2,5 x 0,0	60	50	50			
Q:2,5 x 0,1	60	30		50	20	
R:2,5 x 0,5	30	100				
S:2,5 x 1,0	100	10	40	50		
T:2,5 x 2,5	100	50			50	

*Tipos (segundo o diâmetro do calo):1(até 0,2cm),2(até 0,5cm; 3(até 1,0cm),4(até 1,5cm) e 5(mais de 1,5cm)

Tabela 3. Produção de calos a partir de explantes caulinares, após 50 dias de cultivo em meio MS modificado suplementado com 2,4-D x CIN

Tratamento 2,4-D x KIN mg/l	Total %	Produção de calos				
		tipos* %				
		1	2	3	4	5
A:0,0x0,0	0					
B:0,0x0,1	0					
C:0,0x0,5	0					
D:0,0x1,	0					
E:0,05	0					
F:0,1x0,0	90	100				
G:0,1x0,1	40			100		
H:0,1x0,5	40	30	70			
I:0,1x1,0	90		70	30		
J:0,1x2,5	100	20	20	30	30	
K:1,0x0,0	70	100				
L:1,0x0,1	90	70	30			
M:1,0x0,5	90	40	60			
N:1,0x1,0	90	20	40	40		
O:1,0x2,5	100	10	10	30	40	10
P:2,5x0,0	100	70	30			
Q:2,5x0,1	100	50	10	40		
R:2,5x0,5	100	100				
S:2,5x1,0	80	60	40			
T:2,5x2,5	90	40	30	30		

*Tipos (segundo o diâmetro do calo): 1 (até 0,2cm), 2 (até 0,5cm), 3 (até 1,0cm), 4 (até 1,5cm) e 5 (mais de 1,5cm)

4.4.1 Incremento de peso fresco

Segundo YEOMAN(1973), a análise do crescimento em calos geralmente é baseado nas medidas de peso fresco. Este parâmetro é o mais usado pois é simples e rápido.

As figuras 14 e 15 representam o incremento de peso fresco de calos submetidos aos tratamentos selecionados no item anterior. Na figura 14 estão os resultados dos calos oriundos de explantes radiciais enquanto na figura 15, os de origem caulinar.

A figura 16 apresenta calos derivados de explantes radiciais, cultivados no escuro, em meios MS modificado, suplementado com 2,4-D x CIN (tratamentos RN/E e RT/E).

Observando as duas figuras, verificamos que nos 37 primeiros dias não houve diferença significativa no incremento de peso fresco, dos diferentes tratamentos.

Nas duas semanas seguintes, conforme a figura 14, o tratamento O é o que apresentou o menor incremento de peso, tendo mantido este comportamento até o final do experimento.

Nos calos com 52 dias de cultivo, observamos que o tratamento M(1,0mg/L 2,4-D x 0,5mg/L KIN) e Q(2,5mg/L 2,4-D x 0,1mg/L CIN) apresentaram os maiores crescimentos. Com 67 dias, estes calos triplicaram seu peso, tendo este incremento ocorrido nos últimos 15 dias de cultivo.(Figura 14)

Com relação aos calos derivados de segmentos caulinares, conforme a figura 15, os tratamentos que apresentaram melhores crescimento foram S (2,5 mg/L 2,4-D x 1,0mg/L CIN), com aumento de 177,9 vezes o peso inicial; e T(2,5mg/L 2,4-Dx2,5mg/L CIN), com aumento de 140,2 vezes.

INCREMENTO DE PESO FRESCO RAIZ/ESCURO

Figura 14. Incremento de peso fresco de calos derivados de segmentos radiciais, cultivados em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D x CIN(mg/L). Tratamentos O:1,0x2,5; S: 2,5x1,0; M: 1,0x0,5; N:1,0x1,0; T:2,5x2,5; Q:2,5x0,1.

Figura 15 Incremento de peso fresco de calos derivados de segmentos caulinares, cultivados em meio MS modificado, suplementado com 2,4-DxCIN(mg/L). Tratamentos- O:1,0x2,5; S:2,5x1,0; M:1,0x0,5; N:1,0x1,0; T:2,5x2,5; Q:2,5x0,1.

Figura 16. Calos derivados de explantes radiciais, cultivados em meio MS modificado, suplementado com : RN/E:1,0mg/L 2,4-D x 1,0mg/L CIN; RT/E: 2,5mg/L 2,4-D x 2,5mg/L CIN.

Observamos que os tratamentos que resultaram em maior crescimento, são aqueles em que a auxina está em concentrações altas em relação à citocinina.

4.4.2 Resíduo seco

A determinação da porcentagem de resíduo seco, em relação ao peso fresco, fornece o quanto de água havia no material analisado, sendo portanto importante na análise do incremento de peso fresco.

Os resultados estão expressos na tabela 4, e constituem a média de 4 determinações.

Conforme a tabela 4, podemos observar que o tratamento Q (2,5mg/L 2,4-D x 0,1mg/L CIN), que apresentou o maior incremento de peso fresco (calos derivados de raiz), apresentou a menor porcentagem de resíduo seco.

O tratamento O (2,5mg/L 2,4-D x 2,5mg/L CIN) apresentou a maior porcentagem de resíduo seco, nos calos derivados de segmentos radiciais e caulinares, embora tenha apresentado o menor incremento de peso fresco.

4.5 Suspensão celular

A cultura de suspensão celular foi realizada a partir de calos derivados de segmentos radiciais submetidos ao tratamento M (1,0mg/L 2,4-D x 0,5 mg/L CIN), cultivados no claro e escuro. O resíduo celular e o meio líquido constituíram amostras para as análises químicas.

Tabela 4. Porcentagem de resíduo seco de calos cultivados em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D x CIN

Tratamento 2,4-D x CIN mg/L	Resíduo seco %	
	raiz*	caule*
M:1,0 x 0,5	3,18	3,87
N:1,0 x 1,0	3,47	3,88
O:1,0 x 2,5	4,46	4,40
Q:2,5 x 0,1	2,64	3,57
S:2,5 x 1,0	3,62	3,52
T:2,5 x 2,5	3,43	3,52

* calos derivados de explantes radiciais e caulinares

Os resultados constituem a média de 4 determinações

4.6 Produção de calos em meios MS modificados, com alterações nos níveis e tipo da fonte de carbono e adição de aminoácidos.

Este experimento foi realizado com calos derivados de segmentos radiciais, submetido ao tratamento M (1,0mg/L 2,4-D x 0,5mg/L CIN).

Calos secos e pulverizados constituíram amostras para as análises químicas, com exceção dos calos crescidos em meio suplementados com fenilalanina e triptofano.

Os calos do tratamento M, cultivados em meio MS modificado suplementado com 2 níveis de fenilalanina e triptofano, resultaram oxidados (triptofano: oxidados na primeira semana de cultivo; fenilalanina: oxidados após 20 dias de cultivo), não puderam constituir amostras para as análises químicas.

De acordo com a comparação entre os diferentes meios disponíveis feita por FLICK et alii (1986), o meio MS contém alta concentração de nitrogênio como amônia livre, em relação ao meio White, que é livre de amônia. Considerando que nestes experimentos foi utilizado o meio MS, e que altas concentrações de amônia reduzem o crescimento celular em alguns sistemas vegetais, podemos supor que a adição dos aminoácidos foi tóxica para o crescimento dos calos.

4.7 Análises químicas

4.7.1 Determinação de saponinas totais

Como vimos no item 2.2 , as saponinas(ou saponósidos) são compostos secundários de larga ocorrência no reino vegetal. Ocorrem em várias espécies do gênero *Pfaffia*, tendo sido relatado também em *P. glomerata*. Estas análises foram realizadas com o objetivo de constatar a presença das saponinas nas culturas de calos e suspensão de células desta planta, comparando com as condições de campo. A quantificação da ecdisterona poderia ser feita por métodos mais rápidos e precisos, sendo no entanto, necessário o uso de padrão. Em virtude das dificuldades em se conseguir este padrão , optou-se por determinar as saponinas totais .

Os resultados estão expressos na Tabela 5.

Observamos que os calos derivados de explantes radiciais, produziram praticamente o mesmo teor de saponinas que a raiz da planta *in vivo*. Com relação aos calos provenientes de caule, principalmente aqueles submetidos ao tratamento M (1,0mg/L 2,4-D x 0,5mg/L CIN) poduziram quantidade bem superior(50% a mais).

Os teores de saponina encontrados nas raízes da planta *in vivo* (3,74%), são compatíveis com os relatados por OLIVEIRA et alii(1980) em outra espécie do gênero *Pfaffia* (*P. paniculata*).

Como vemos na tabela 5, as raízes da planta *in vivo* apresentam maior teor de saponinas do que o caule, tanto que na medicina popular é a parte da planta utilizada. No entanto, observamos que explantes caulinares e radiciais produziram quantidades semelhantes de saponina (CM/E e RM/E). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por TABATA e HIRAOKA(1976), que analisando a produção de alcalóides em calos oriundos de folha, raiz e semente de *N. rustica*, também não observaram diferenças na qualidade e quantidade destes compostos.

Segundo LINDSEY e YEOMAN (1983), culturas *in vitro* que apresentam crescimento muito rápido e desorganizado, acumulam níveis mais baixos de produtos secundários. Foi o que observaram analisando a produção de alcalóides em calos de diversas espécies de solanáceas.

Observando a tabela 5, notamos que CM/E apresentou níveis bem maiores de saponinas e mostrou menor crescimento (Figura 15) do que CT/E, com teores menores do mesmo composto. No entanto RM/E apresentou grande crescimento e produção de saponinas ligeiramente maior do que RT/E, que mostrou menor crescimento (tabela 5 e Figura 14). Com relação às modificações nos níveis de sacarose no meio de cultivo dos calos, podemos observar na tabela 5 correlação positiva entre aumento na concentração de sacarose e produção de saponinas.

Tabela 5. Porcentagem de saponinas totais

Amostras	Saponinas totais % (m/m)	Desvio padrão (SD)
Raiz *	3,74	0,25
Caule*	2,69	0,74
RT/E	3,18	1,01
CT/E	2,50	0,97
RM/E	3,81	0,90
CM/E	4,09	1,04
RM/L	3,49	0,30
RM/E/S1	4,19	0,63
RE/E/S2	5,92	0,62
RM/E/G1	4,48	0,25
RM/E/G2	5,46	0,12

* "in vivo"

R:explante radicial ; C:explante caulinar

T: 2,5mg/L 2,4-D x 2,5mg/L CIN ; M: 1,0 mg/L 2,4-D x 0,5 mg/L CIN

E: escuro ; L: fotoperíodo 16/8 (claro/escuro)

S1: 40g/L sacarose ; S2: 60g/L sacarose ; G1: 40g/L glicose;

G2: 60g/L glicose ; Os resultados são a média de 3 determinações

Dados semelhantes foram encontrados por MIZUKAMI et alii (1977), em relação à produção de chiconina por suspensão de células de *Lithospermum erithrorhizon*. Com relação às diferentes fontes de carbono, os autores encontraram superioridade da sacarose em relação à glicose e frutose na produção de chiconina.

Conforme a tabela 5, podemos notar uma pequena vantagem na utilização de glicose 4% (4,48% de saponina) em relação à sacarose 4% (4,19% de saponina).

A discussão sobre a possibilidade de calos , no seu estado de diferenciação, produzir metabólitos secundários, tem sido feita por BERLIN (1988). A idéia geral é que calo é uma massa indiferenciada e portanto incapaz de sintetizar substâncias. Entretanto a produção de compostos secundários por cultura de calos tem sido confirmada por vários autores: TABATA et alii (1974), TABATA e HIRAOKA (1976), JHA et alii (1988), YASAKI e OKUDA (1989), PROFUMO et alii (1991) e outros.

MURASHIGE (1974), analisando a morfologia dos calos, verificou diferenças nos tamanhos celulares, grau de vacuolização, conteúdo celulares , e afirmou que eles são desorganizados mas não indiferenciados.

Com relação à influência dos reguladores de crescimento na produção de metabólitos secundários, os resultados obtidos com calos submetidos a tratamento com 2,4-D e CIN (tabela 5), mostraram que o tratamento 1,0mg/L 2,4-Dx 0,5mg/L CIN produziu maior quantidade de saponina do que o tratamento 2,5mg/L 2,4-Dx 2,5mg/L CIN. Segundo BERLIN (1988), embora 2,4-D seja mais indicado para crescimento de calos, este suprime a síntese de metabólitos secundários.

Segundo Paupardin¹ , citado por PROFUMO et alii (1991), há um antagonismo entre crescimento (devido à ação auxínica) e a produção de metabólitos secundários.

A produção de saponósidos em calos cultivados em meio contendo 2,4-D, apresentada na tabela 5, demonstra que pode ocorrer síntese de compostos secundários na presença deste regulador de crescimento.

¹ PAUPARDIN.C. (1983) Bull. Soc. Bot. Fr. 130 Actual. Bot. (2) 61-68

Outros autores relatam resultados semelhantes: PAUTHE-DAYDE et alii(1990) com a produção de saponinas em calos de *Gypsophila* spp ; FURUYA et alii(1972), alcalóides em calos de *Papaver somniferum* .

FURUYA et alii (1983) relataram produção de saponinas em cultura de células em suspensão, de *Panax ginseng*, cultivadas em meio contendo 2,4-D; entretanto o conteúdo foi maior quando 2,4-D foi substituído por AIB(ácido indol butírico).

TABATA e HIRAOKA (1976), verificaram inibição da síntese de nicotina em calo de *Nicotiana rustica*, apenas em concentrações muito altas de 2,4-D (10mg/L).

Conforme a tabela 5, calos cultivados no claro (RM/L) apresentaram 3,49% de saponinas; logo, a luz parece interferir pouco na síntese destes compostos. Segundo BERLIN (1988), sob o ponto de vista tecnológico, é mais conveniente a não dependência da luz para a produção de metabólitos secundários.

A não dependência da luz para a síntese de compostos secundários também foi encontrada por OHLSSON et alii(1983) ao pesquisar o seu efeito na produção de cardenólidos por culturas de tecidos de *Digitalis lanata*.

4.7.2 Determinação do Índice de Espuma

A formação de espuma abundante pelos extratos aquosos de materiais vegetais, constitui uma forma de identificar a presença de saponinas nestas plantas. O aparecimento de um anel de espuma pequeno e instável, pode resultar da presença de proteínas, de certos ácidos e mesmo de saponósidos em concentrações muito baixas. É um método simples e rápido, sendo utilizado na pesquisa de saponósidos(COSTA,1978).

As amostras analisadas neste ensaio foram: Raiz (da planta *in vivo*), Caule (da planta *in vivo*), RM/E (calos cultivados no escuro em meio MS modificado com 1,0mg/L 2,4-D x 0,5mg/L CIN), RM/L (idem anterior, cultivados no claro), RM/E/S1 (com 40g/L de sacarose), RM/E/S2 (com 60g/L de sacarose), RM/E/G1 (com 40g/L de glicose) e RM/L/Sc (suspensão celular cultivada no claro). Os resultados estão na tabela 6.

Vemos na tabela 6 que as amostras RM/E e RM/E/S1 apresentaram Índices de Espuma (I.E.) 250. Isto significa que a diluição de 1:250 produz o anel de espuma persistente de 1 cm de altura. Já a amostra RM/L/Sc que apresentou I.E. de 100, necessita ser menos diluída para produzir o mesmo anel de espuma. Logo, 1g da amostra RM/E contém mais saponinas do que 1 g da amostra RM/L/Sc.

Tabela6. Índice de Espuma de calos e suspensão de células

Amostra	Índice de Espuma
Raiz*	200
Caule*	143
RM/E	250
RM/L	143
RM/E/S1	250
RM/E/S2	166
RM/E/G1	143
RM/L/Sc	100

* "in vivo"

R: explantes radiciais ; M: 1,0mg/L 2,4-D x 0,5 mg/L KIN

E: escuro , L: fotoperíodo 16/8 (claro/escuro)

S1: sacarose a 4% , S2: sacarose a 6% , G1: glicose a 4%

Sc: suspensão celular .

4.7.3. Análise cromatográfica

Cromatografia em camada delgada (CCD)

O objetivo da realização da CCD foi o de estabelecer um perfil cromatográfico do extrato metanólico e butanólico das amostras analisadas.

As tabelas de 7 a 12 correspondem à análise cromatográfica em camada delgada das raízes e caules de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vivo* e de suas culturas de calos e células em suspensão.

Analizando os cromatogramas realizados, observamos na Tabela 7, que a suspensão de células produziu duas substâncias (hRf 70,0 e 94,0) que não são sintetizadas pela planta *in vivo* (ou é produzida em quantidades muito menores).

Na tabela 8, verificamos que a substância de hRf 48,7 produzida nas raízes da planta *in vivo*, é encontrada apenas no meio líquido da suspensão celular. Resultados semelhantes foram encontrados por NAIR et alii (1986), que encontraram artemisinina (antimalárico) apenas no meio líquido de suspensões celulares de *Artemisia annua*.

Ainda na tabela 8, podemos observar que o meio contendo 60 g/L de sacarose (RM/E/S2) é mais efetivo na produção de substâncias (hRf 21,3 ; 26,5; 29,9; 66,0; 79,4), quando comparado com meios contendo glicose.

Também na tabela 9, podemos observar que uma substância presente nos extratos metanólicos de raiz, é produzida apenas nos meios líquidos das suspensões celulares.

EXTRATO METANÓLICO																	
COR	HRF	PDR	C*	R*	RM/E	CM/E	RT/E	CT/E	RM/E S1	RM/E S2	RM/E G1	RM/E G2	RM/L ML	RM/E ML	RM/L ML	RM/E Sc	RM/L Sc
AMARELO LIMÃO	85,4		+	++						+							
AZUL	70,0															+	
AZUL	94,0			+		+	+	+		+			+				
AMARELO	94,0															+	
ROXO	94,0		+														

Tabela 7: Cromatograma em camada delgada dos extratos metanólicos de calos e suspensão de células de *P. glomerata*. Fase móvel: Butanol: acetato de etila: água: ácido fórmico (4:1:5:0,6); adsorvente: silicagel 60G; visualização: luz ultra-violeta. PDR: padrão (saponina 1%); C*: caule; R*: raiz da planta *in vivo*; R: explante radicular; C: explante caulinar; E: escuro; L: claro (foto período 16/8); M: 1,0mg/L 2,4-Dx0,5mg/L CIN; T: 2,5mg/L CIN; S1: 40g/L sacarose; S2: 60g/L sacarose; G1: 40g/L glicose; G2: 60g/L glicose; ML: meio líquido; Sc: resíduo da suspensão celular.

Intensidade: * : muito fraca ; + : fraca ; ++ : média ; +++ : forte.

EXTRATO METANÓLICO																	
COR	HRF	PDR	C*	R*	RM/E	CM/E	RT/E	CT/E	RM/E S1	RM/E S2	RM/E G1	RM/E G2	RM/L ML	RM/E ML	RM/L ML	RM/E Sc	RM/L Sc
CASTANHO	0,0	+	+	+													
MARROM AVERM.	8,0		+	+													
CASTANHO VERMELHO CLARO	12,8	+															
	21,3		+	+	+					+						+	
ROXO	26,5		+	++	+					+						+	
ROXO	29,9			+	+					+							
ROXO	48,7			+										+			
VIOLETA CLARO	66,0		+	+	+	+	+			+							
VERDE																	
AMARELO	75,2		+	+													
VIOLETA	79,4		+	+	+	+	+	+		+							
MARROM AVERM.	98,2		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	

Tabela 8: Cromatograma em camada delgada dos extratos metanólicos de calos e suspensão de células de *P. glomerata*. Fase móvel: Butanol: acetato de etila: água: ácido fórmico (4:1:5:0,6); adsorvente: silicagel 60G; revelador: vanilina sulfúrica. PDR: padrão (saponina 1%); C*: caule; R*: raiz da planta *in vivo*; R: explante radicular; C: explante caulinar; E: escuro; L: claro (foto período 16/8); M: 1,0mg/L 2,4-Dx0,5mg/L CIN; T: 2,5mg/L CIN; S1: 40g/L sacarose; S2: 60g/L sacarose; G1: 40g/L glicose; G2: 60g/L glicose; ML: meio líquido; Sc: resíduo da suspensão celular.

Intensidade: * : muito fraca ; + : fraca ; ++ : média ; +++ : forte.

EXTRATO METANÓLICO																
COR	HRF	PDR	C*	R*	RM/E	CT/E	RM/E S1	RM/E S2	RM/E G1	RM/E G2	RM/L	RM/E ML	RM/L ML	RM/E Sc	RM/L Sc	
AMARELO LIMAO	12,8	+														
VERMELHO	19,6		+										+			
AMARELO LIMÃO	26,4		+++					+			+			+	+	
AMARELO LIMÃO	29,0		+					+			+			+	+	
ROSE	29,0			+			+			+				+		
ROSE	47,0			+												
AZUL CLARO	60,6													+		
ROSE	66,6		+	+			+	+	+	+	+			+	+	
AMARELO	74,3		++	+++												
ROXO	76,9						+	+	+	+	+			+	+	
AMARELO	95,7		+	+			+	+	+	+	+			+	+	

Tabela 9: Cromatograma em camada delgada dos extratos metanólicos de calos e suspensão de células de *P. glomerata*. Fase móvel: Butanol: acetato de etila: água: ácido fórmico (4:1:5:0,6); adsorvente: sílica gel 60G; revelador: vanilina sulfúrica / luz ultra-violeta. PDR: padrão (saponina 1%); C*: caule; R*: raiz da planta *in vivo*; R: explante radicular; C: explante caulinar; E: escuro; L: claro (foto período 16h); M: 1,0mg/L 2,4-Dx0,5mg/L CIN; T: 2,5mg/L CIN; S1: 40g/L sacarose; S2: 60g/L sacarose; G1: 40g/L glicose; G2: 60g/L glicose; ML: meio líquido; Sc: resíduo da suspensão celular.

Intensidade: * : muito fraca ; + : fraca ; ++ : média ; +++ : forte.

COR	HRF	PDR	C*	R*	EXTRATO BUTANÓLICO										RM/L Sc	RM/E Sc
					RM/E	CM/E	RT/E	CT/E	RM/E S1	RM/E S2	RM/E G1	RM/E G2	RM/L ML	RM/E ML	RM/L ML	
AZUL	74,3		+													
AMARELO LIMÃO	86,3		+	+												+
AZUL	95,7			+	++	+	+	+								
VERMELHO CLARO	96,0		+													

Tabela 10: Cromatograma em camada delgada dos extratos metanólicos de calos e suspensão de células de *P. glomerata*. Fase móvel: acetato de etila; água: ácido fórmico (4:1:5:0,6); adsorvente: silicagel 60G; visualização: luz ultra-violeta. PDR: padrão (saponina 1%); C*: caule; R*: raiz da planta *in vivo*; R: explante radicial; C: explante caulinar; E: escuro; L: claro (foto período 16/8); M: 1,0mg/L 2,4-Dx0,5mg/L CIN; T: 2,5mg/L CIN; S1: 40g/L sacarose; S2: 60g/L sacarose; G1: 40g/L glicose; G2: 60g/L glicose; ML: meio líquido; Sc: resíduo da suspensão celular.

Intensidade: * : muito fraca ; + : fraca ; ++ : média ; +++ : forte.

COR	HRF	PDR	EXTRATO BUTANÓLICO											
			R*	RM/E	CM/E	RT/E	CT/E	RM/E S1	RM/E S2	RM/E G1	RM/E G2	RM/L ML	RM/E ML	RM/L Sc
MARROM AMARELO	12,8	+												
AZUL	21,3	+	+	+										
AZUL ANIL	25,6	+	+	*					*		*		++	
ROXO	27,3			+					+					+
AZUL	29,9			+				+	+		+		+++	++
ROXO	32,4							+	+		+		+	+
ROXO	42,7												+	
ROXO	48,7												+	
ROXO	52,9												++	
ROXO	66,6	+	+	+				+	+	+	+		+	+
VERDE ABACATE	75,2	+	+											
AZUL ANIL CLARO	79,4			+				+	+	+	+			
ROXO	95,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+

Tabela 11: Cromatograma em camada delgada dos extratos metanólicos de calos e suspensão de células de *P. glomerata*. Fase móvel: acetato de etila; água: ácido fórmico (4:1:5:0,6); adsorvente: silicagel 60G; revelador: vanilina sulfúrica. PDR: padrão (saponina 1%); C*: caule; R*: raiz da planta *in vivo*; R: explante radicial; C: explante caulinar; E: escuro; L: claro (foto período 16/8); M: 1,0mg/L 2,4-Dx0,5mg/L CIN; T: 2,5mg/L CIN; S1: 40g/L sacarose; S2: 60g/L sacarose; G1: 40g/L glicose; G2: 60g/L glicose; ML: meio líquido; Sc: resíduo da suspensão celular.

Intensidade: * : muito fraca ; + : fraca ; ++ : média ; +++ : forte.

COR	HRF	PDR	C*	R*	EXTRATO BUTANOLICO										RM/L Sc	RM/E Sc
					RM/E	CM/E	RT/E	CT/E	RM/E S1	RM/E S2	RM/E G1	RM/E G2	RM/L ML	RM/E ML		
LARANJA	21,3								+	+	+	+				
AMARELO	27,3		+	+++	+					+					+	+
ROXO	29,9								+	+	+	+			+	+
ROXO	32,4								+	+	+	+			+	+
VERMELHO	42,7															
AZUL	44,4												+			
LARANJA	51,2															
ROXO	68,3		+	++	+				+	+	+	+			+	+
CLARO									+	+					*	*
AMARELO	72,6		+++	+++	+											
ROSE	76,9		+	+	+				+	+	+	+			+	+
AZUL	85,4			+					+	+	+	+				
AMARELO	94,0		+	++	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++			+++	+++

Tabela 12: Cromatograma em camada delgada dos extratos metanólicos de calos e suspensão de células de *P. glomerata*. Fase móvel: Butanol: acetato de etila: água: ácido fórmico (4:1:5:0,6); adsorvente: silicagel 60G; revelador: vanilina sulfúrica / luz ultra-violeta. PDR: padrão (saponina 1%); C*: caule; R*: raiz da planta *in vivo*; R: explante radicular; C: explante caulinar; E: escuro; L: claro (foto período 16/8); M: 1,0mg/L 2,4-Dx0,5mg/L CIN; T: 2,5mg/L CIN; S1:40g/L sacarose; S2: 60g/L sacarose; G1: 40g/L glicose; G2: 60g/L glicose; ML: meio líquido; Sc: resíduo da suspensão celular.

Intensidade: * : muito fraca ; + : fraca ; ++ : média ; +++ : forte.

Observamos que muitas das substâncias produzidas pelas raízes da planta *in vivo*, também ocorrem nas suspensões celulares, sendo que a de hRf 29,0 em quantidade maior, conforme a tabela 9.

É interessante notar na tabela 9, que a substância de hRf 76,9 não é produzida na planta *in vivo*, ocorrendo em várias culturas de calos e suspensão celular.

Observando o efeito da luz na produção de substâncias pelas suspensões celulares (Tabela 10 e 11), verificamos que as mantidas no escuro são mais efetivas, em qualidade e quantidade.

Na tabela 12, observamos que o composto de hRf 94,0, é produzido em quantidades maiores nos calos e suspensão celular do que na raiz da planta *in vivo*.

4.7.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As figuras 19 a 26 representam a cromatografia líquida (HPLC) das seguintes amostras (extratos metanólicos): Caule, Raiz, RM/E, RM/L/Sc, RM/L/ML, RM/E/S1, e os padrões: alantoina 0,1% e saponina 0,1%.

O pico (1,833) que aparece na figura 19 (Alantoina), é observado também na figuras 21(extrato metanólico de raízes), 22 (extrato metanólico de caule), 23(amostra RM/E), 25(amostra RM/L/ML) e figura 26(amostra RM/E/S1). No meio líquido (RM/L/ML) o pico é bem pequeno, já nos calos cultivados em meio contendo 40 g/L de sacarose, é equivalente ao encontrado em caules e raízes.

Observamos que o pico 1,217 (saponina) aparece apenas no extrato de raízes. Por outro lado, substâncias detectadas nos extratos de calos e suspensão de células, não ocorrem nos caules e raízes da planta *in vivo*.

Figura 17. Cromatograma (HPLC) de alantoina padrão (solução metanólica a 0,1%)

Figura 18 Cromatograma (HPLC) de saponina padrão (solução metanólica a 0,1%)

Figura 19. Cromatograma (HPLC) do extrato metanólico de raiz de *P. glomerata*.

Figura 20. Cromatograma (HPLC) do extrato metanólico de caule de *P. glomerata*.

Figura 21 Cromatograma (HPLC) do extrato metanólico de calos cultivados no escuro, em meio MS modificado, contendo 1,0mg/L 2,4-D x 0,5 mg/L CIN.

Figura 22. Cromatograma (HPLC) do extrato metanólico de cultura de células em suspensão de *P. glomerata*.

Figura 23 Cromatograma (HPLC) da solução metanólica do meio líquido da suspensão celular de *P. glomerata*.

Figura 24 Cromatograma (HPLC) do extrato metanólico de calos de *P. glomerata*, cultivados em meio contendo 40g/L de sacarose.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nestes experimentos com cultura de calos e suspensão de células de *Pfaffia glomerata*, permitiram as seguintes conclusões:

.A adição de BAP ao meio de cultura, visando a micropropagação de *P. glomerata*, é vantajosa, pois aumenta consideravelmente, o número de explantes /planta *in vitro*.

.Não houve diferença significativa entre os teores de BAP adicionados (0,25 a 1,5mg/L).

.O melhor crescimento de calos de *P. glomerata*, ocorreu em meios MS modificados, com as seguintes combinações de 2,4-D x CIN (mg/L): 1,0 x 0,5; 1,0 x 1,0; 1,0 x 2,5; 2,5 x 0,1; 2,5 x 1,0; 2,5 x 2,5.

. Os tratamentos 1,0mg/L 2,4-D x 0,5mg/L CIN e 2,5mg/L 2,4-D x 0,1 mg/L CIN resultaram em calos com maiores incrementos de peso fresco(derivados de explantes radiciais).

. O tratamento 1,0mg/L 2,4-D x 0,5mg/L CIN resultou em calos que produziram quantidades maiores de saponinas do que o tratamento 2,5mg/L 2,4-D x 2,5mg/L CIN.

. Houve correlação positiva entre aumento dos níveis de sacarose no meio de cultivo de calos de *P. glomerata*, e a produção de saponinas por estes calos.

. As culturas de células em suspensão, mantidas no escuro, produziram quantidades maiores de saponinas, quando comparadas com cultura de calos .

. Nas culturas de calos, a luz, praticamente não interferiu na produção de saponinas; no entanto, nas suspensões celulares, é um fator desfavorável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.K. & RASTOGI, R.P. Review: Triterpenoid saponins and their genins. **Phytochem.**, **13**: 2623-2645, 1974.
- ALCÂNTARA, M.F.A.; LIMA, V.; ANDRADE, L.H.C.; NASCIMENTO, M. Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. In: **XIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, Fortaleza, 1994.
- ALFERMANN, A.W. & PETERSEN, M. Natural product formation by plant cell biotechnology. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **43**: 199-205, 1995.
- ARENAS, P. & AZORERO, R.M. Plants used as mean of abortion, contraception, sterilization and fecundation by paraguayam indigenous people. **Econ.Bot.**, **31**: 302-306, 1977.
- BAJAJ, Y.P.S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y.P.S. ed. **Biotechnology in agriculture and forestry⁴ Medicinal and aromatic plants I**. Berlin. Springer Verlag. 1988. v.4. p.60-103.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro. LTC Ed. S/A. /EDUSP. 1978. v.I.

- BALANDRIN, M.F. & KLOCKE J.A. Medicinal plants. **Science**, **229**: 1036-1038, 1985.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, **228**:1154-1160, 1985.
- BERLIN, J. & WITTE, L. Metabolism of phenylalanine and cinnamic acid in tobacco cell lines with high and low yields of cinnamoyl putrescines. **J.Nat.Prod.**, **45**:88-93, 1982.
- BERLIN, J. Formation of secondary metabolites in cultured plant cell and its impact on pharmacy. In: BAJAJ, Y.P.S. ed. **Biotechnology in agriculture and forestry4 medicinal and aromatic plantsI**. Berlin. Springer Verlag. 1988. P.37-55
- BUTENKO, R.G. **Plant tissue culture and plant morphogenesis**. Washington.N.S.F. 1968.
- CHANDEL, R.S. & RASTOGI, R.P. Triterpenoid saponins and saponins:1973-1978- review. **Phytochem.**, **19**:1889-1908, 1980.
- CHUNG, A. & STABA, E.J. Effect of precursors on growth and alkaloid production in *Cinchona ledgeriana* leaf-shoot organ cultures. **Planta Med.**, : 206-210, 1988.
- CONSTABEL, F.; RAMBOLD, S.; CHATSON, K.B.; KURZ, W.G.M.; KURTNEY, J.P. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. **Plant cell rep.**, **1**:3-5, 1981.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2a.ed. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian. 1978. V.I, p. 94,95; V.II, p.351 ; V.III, p.814.

CROCOMO, O.J. & MELO, M. Practical aspects of the production of secondary metabolites by plant cell cultures. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. eds. **Biotechnologia para produção vegetal**. Piracicaba, Cebtec/Fealq, 1991. p.373-389.

DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension culture. In: DIXON, R.A. ed. **Plant cell culture- a practical approach**. Oxford. IRL Press Ltd. 1985. p.1-20.

DOMINGUES, X.A. **Métodos de investigación fitoquímica**. México. Limusa. 1973. p.150.

DOUGALL, D.K. Nutrition and metabolism. In: STABA, E.J. ed. **Plant tissues culture as a source of biochemicals**. Boca Raton. CRC Press INC - 1980. p.42.

ELIASSON, U.H. Floral morphology and taxonomic relations among the genera of *Amaranthaceae* in the new world and Hawaiian islands. **Bot.J.Lin.Soc.**, **96**: 235-283, 1988.

ELISABETSKY, E. Pesquisa em plantas medicinais. **Ciência e Cultura**, **39**(8): 697-702, 1987.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of World Health Organi-zation**, **63**(6):965-981, 1985.

- FLICK, C.E.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. **Handbook of plant cell culture**. Nova York. Macmillan Publishing Company. 1986. Cap.2. p.13-67.
- FURUYA, T.; IKUTA, A.; SYONO, K. Alkaloids from callus tissue of *Papaver somniferum*. **Phytochem.**, **11**:3041-3044, 1972.
- FURUYA, T.; YOSHIKAWA, T.; ORIHARA, Y.; ODA, H. Saponin production in cell suspension cultures of *Panax ginseng* **Planta med.**, **48**:83-87, 1983.
- GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 5a.ed. , Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978, Vol.I, p.668.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília. ABCTP/Embrapa/CNPH. 1990. p. 99-169.
- HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. Studies on the production of Digitalis cardenolides by plant tissue culture. **Plant Physiol.**, **69**: 653-656, 1982.
- HANDRO, W. & FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília. ABCTP/ Embrapa/CNPH. 1990. p.203-212.
- HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**. Londres. Cox & Wyman Ltd. 1973. p.113.

- HEINSTEIN, P.F. Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures. **J. Nat. Prod.**, **48**(1): 1-9, 1985.
- HOEKSTRA, S.S.; HARKES, P.A.A.; VERPOORTE, R.; LIBBENGA, K.R. Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. **Plant cell rep.**, **8**: 571-574, 1990.
- HOSTETTMANN, K.; KIZU, H.; TOMOMORI, T. Molluscucidal properties of various saponins. **Planta med.**, **44**: 34-35, 1982.
- JAIN, D.C. & TRIPATHI, A.K. Insect feeding deterrent activity of some saponin glycosides. **Phytotherapy research**, **5**: 139-141, 1991.
- JHA, S.; SAHU, N.P.; MAHATO, S.B. Production on the alkaloids emetine and cepheline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Planta med.**, **54**(6): 504-506, 1988.
- KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin) an antimalarial drug from China. **Science**, **228**: 1049-1055, 1985.
- KNOBLOCH, K.H.; BEUTNAGEL, G.; BERLIN, J. Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of a cinnamoyl putrescines in medium induced cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. **Planta**, **153**: 582-585, 1981.
- LINDSEY, K. & YEOMAN, M.M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. **J. Exp. Bot.**, **34**(145): 1055-1065, 1983.

- MAGALHÃES, P.M.; FIGUEIROA, G.M.; PEREIRA, B.; RODRIGUES, J.A.
Propagação de algumas espécies de ginseng do Brasil. In:
XIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Fortaleza,
1994.
- MAHATO, S.B.; GANGULY, A.N.; SAHU, N.P. Review. steroid
saponins. **Phytochem.**, 21(5): 959-978, 1982.
- MAHATO, S.B.; SARKAR, S.K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins.
Phytochem., 27(10): 3037-3067, 1988.
- MARTIN, S.M. Environmental factors- temperature, aeration
and pH. In: STABA, E.J. ed. **Plant tissue culture as a
source of biochemicals**. Boca Raton. CRC Press. 1980.
p.146
- MAZZANTI, G. & BRAGHIROLI, L. Analgesic antiinflammatory
action of *Pfaffia paniculata*. **Phytotherapy Research**,
8:413-416, 1994.
- MERCK INDEX -An encyclopedia of chemicals, drugs and
biologicals. 11a.ed. Rahway, NJ . Merck & Co, INC. 1989.
p.1328.
- MISAWA, M.; HAYASHI, M.; TAKAYAMA, S. Accumulation of
antineoplastic agents by plant tissue cultures.
In: NEUMANN, K.H.; BARZ, W.; REINHARD, E. **Primary and second-
ary metabolism of plant cell cultures**. Berlin,
Springer-Verlag, 1985. p. 235-246.

- MIZUKAMI, H.; KONOSHIMA, M.; TABATA, M. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus culture. **Phytochem.**, **16**: 1183-1186, 1977.
- MORS, W. Plantas medicinais. **Ciência Hoje**, **1**(3):14-19, 1982.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, **15**: 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **25**:135-166, 1974.
- NAIR, M.S.R.; ACTON, N.; KLAYMAN, D.L. Production of artemisinin in tissue cultures of *Artemisia annua*. **J. Nat. Prod.**, **49**(3):504-507, 1986.
- NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochem.**, **23**(8): 1703-1705, 1984.
- NAMBA, T.; YOSHIZAKI, M.; TOMOMORI, T.; KOBASHI, K.; MITSUI, K.; HASE, J. Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs. **Planta Med.**, **25**(1):28-38, 1974.
- NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. Pfaffoside and nortriterpenoids saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochem.**, **23**(1):139-142, 1984.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; MATSUURA, H. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some CNMR chemical shifts. **Phytochem.**, **26** (9): 2505-2507, 1987.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Three esdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochem.**, **27** (6): 1665-1668, 1988.

OAKENFULL, D. Saponins in food-a review. **Food chemistry**, **7**:19-40, 1981.

OHIRA, K.; IKEDA, M.; OJIMA, K. Thiamine requirements of various plant cells in suspension culture. **Plant & cell Physiol.**, **17**: 583-590, 1976.

OHLSSON, A.B.; BJORK, L.; GATENBECK, S. Effect of light on cardeno-lide production by *Digitalis lanata* tissue cultures. **Phytochem.**, **22**(11): 2447-2450, 1983.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Contribuição para o estudo farmacognóstico do "ginseng brasileiro" *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. **AN. Farm. Quim. S. Paulo**, **20** (1/2): 261-277, 1980.

OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze - O ginseng brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn.**, **1**(1): 86-92, 1986.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, K.M.; AKISUE, G. Constituintes do gênero *Pfaffia*. In: **XI Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, João Pessoa, 1990.

- PAUTHE-DAYDE,D.; ROCHD,M.; HENRY,M. Triterpenoid saponin production in callus and multuple shoot cultures of *Gypsophila* spp. **Phytochem.**, **29**(2): 483-487, 1990.
- PROFUMO,P.; CAVIGLIA,A.M.; GASTALDO,P.; DAMERI,R.M. Aescin content in embryogenic callus and in embryoids from leaf explants of *Aesculus hippocastanum*. **Planta Med.**, **57**:50-52,1991.
- PROFUMO,P.; CAVIGLIA,A.M.; GASTALDO,P. Aescin formation in calli and embryoids from cotyledon and stem plants of *Aesculum hippocastanum*. **J. Pharm. Pharmacol.**,**46**: 924-925, 1994.
- RIBEIRO,P.G.F. & PEREIRA,E.F. Estudo da germinação das sementes de *Pfaffia glomerata*. In: **XIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, Fortaleza, 1994.
- SEABROOK,J.E.A. Laboratory culture. In: STABA,E.J.ed.**Plant tissue culture as a source of biochemicals**. Boca Raton. CRP Press. 1980, p.1-20.
- SEITZ,H.V.; EILERT,U.; LUCA,V.; KURZ,W.G.W. Elicitor mediated induction of phenylalanine ammonia lyase and tryptophan decarboxilase: accumulation of phenols and indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant cell tissue and organ culture**, **18**: 71-78, 1989.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. Iresinoside, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochem.**, **31**(3): 953-956, 1992.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.S.; NISHIGUCHI, Y.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. Pfaffane type nortriterpenoids from *Pfaffia pulvurulenta*. **Phytochem.**, **31**(5): 1737-1740, 1992.

SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, **11**:118-130, 1957.

SPJUT, R.W. Limitations of a random screen: search for new anti-cancer drugs in higher plants. **Econ. Bot.**, **39**(3): 266-288, 1985.

TABATA, M.; MIZUKAMI, H.; HIRAOKA, N.; KONOSHIMA, M. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Phytochem.**, **13**: 927-932, 1974.

TABATA, M. & HIRAOKA, N. Variation of the alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures. **Physiol Plant.**, **38**: 19-23, 1976.

TABATA, M. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H., ed. **Proceedings in life sciences - plant tissue cultures and its biotechnological applications**. Berlin, Springer Verlag, 1977, p.3-16.

- TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; SAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; WADA, Y. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata*. **Tetrahedron Letters**, **24**(10): 1057-1060, 1983.
- TYLER, V.E. Plant drugs in the twenty first century. **Econ. Bot.**, **40**(3):279-288, 1986.
- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R.A. ed. **Plant cell culture, a practical approach**. Oxford. IRL Press. 1985. p.79-105.
- TREASE, G.E. & EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. 12a.ed. Londres, Baillière-Tindall, 1983. p.628/629, 641/643.
- VICKERY, M.L. & VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. Londres. The Macmillan press LTC, 1981. 335p.
- YASAKI, K. & OKUDA, T. Condensed tannin production in callus and suspension cultures of *Cinnamomum cassia*. **Phytochem.** **29** (5): 1559-1562, 1990.
- YEOMAN, M.M. Tissue(callus) cultures. In: STREET, H.E. ed. **Plant tissue and cell culture**. Londres. Blackwell Scientific Publications. 1973. p.51
- ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; STOCKIGT, J.; WEILER, E.W., DEUS, B. Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension culture of *Catharanthus roseus*. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H. eds. **Plant tissue culture and its biotechnological application**. Berlin. Springer Verlag. 1977, p.27-43.