1 01/07/03

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização do metabolismo de
culturas de células em suspensão de
Rauvolfia sellowii Müll. Arg.**

SÉRGIO LUIZ GALDINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR:
Dr. PAULO R. H. MORENO

SÃO PAULO
2002

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20.242

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização do metabolismo de
culturas de células em suspensão de
Rauvolfia sellowii Müll. Arg.**

SÉRGIO LUIZ GALDINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR:

Dr. PAULO R. H. MORENO

SÃO PAULO

2002

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Galdino, Sérgio Luiz
G149c Caracterização do metabolismo de culturas de células em
suspensão de *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. / Sérgio Luiz
Galdino -- São Paulo, 2002.
47p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch

1. Produtos naturais : Química orgânica 2. Célula : Cultura :
Plantas 3. Alcalóides : Química orgânica I. T. II. Moreno,
Paulo Roberto Hrihorowitsch, orientador.

547.7 CDD

**“Caraterização do Metabolismo de
Culturas de Células em Suspensão
de *Rauwolfia sellowii* Müll. Arg.”**

SÉRGIO LUIZ GALDINO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Química – Área: Química Orgânica.

Aprovado por:

Prof. Dr. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. LILIANA MARZORATI
IQ - USP

Profa. Dra. ELFRIEDE MARIANNE BACCHI
FCF – USP

SÃO PAULO
14 DE OUTUBRO 2002.

À Bel, pelo amor e carinho que me dedica.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paulo R. H. Moreno pela orientação, confiança e amizade ao longo deste trabalho.

Ao Professor Dr. Massuo Kato pelo auxílio na manutenção das culturas celulares e por tornar disponível o equipamento para a análise, por cromatografia líquida de alta eficiência, das frações de alcalóides das culturas celulares.

Às colegas Ana Paula, Angélica, Ingrid e Melânia pela amizade e pelas palavras de apoio nas horas difíceis.

À Jacqueline, Karine e Marcos pelo inestimável auxílio e, principalmente, pela amizade.

Aos demais professores, alunos e funcionários do laboratório de produtos naturais e deste instituto, ainda que não citados nominalmente, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Abreviaturas e símbolos.....	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1 O gênero <i>Rauvolfia</i>	4
1.2. Cultura de tecidos.....	7
1.2.1. Composição do meio.....	7
1.2.2. Reguladores de crescimento.....	8
1.2.3. Exposição da cultura a fatores de estresse.....	9
1.2.4. Adição de precursores.....	9
 2. OBJETIVOS.....	 11
 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 12
3.1. Cultura celular.....	12
3.1.1. Curva de crescimento.....	12
3.1.2. Modificações nas condições de cultivo.....	13
3.2. Isolamento de alcalóides.....	13
3.3. Determinação quantitativa dos alcalóides.....	15
3.4. Sistemas cromatográficos.....	16
3.4.1. Camada delgada (CCDC e CCDP).....	16
3.4.2. Cromatografia em coluna rápida (CCR).....	17
3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	18
3.4.3.1. Alcalóides.....	18
3.4.3.2. Açúcares.....	18

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Isolamento de alcalóides.....	19
4.1.1. Meio de cultura.....	19
4.1.2. Biomassa.....	20
4.2. Caracterização da cultura.....	25
4.2.1. Acúmulo de biomassa.....	25
4.2.2. Variação do pH.....	26
4.2.3. Consumo de açúcares.....	27
4.2.4. Produção de alcalóides.....	28
4.3. Modulação da produção de alcalóides.....	31
4.3.1. Adição de precursores.....	32
4.3.2. Adição de eliciador.....	34
4.3.3. Modificação da composição do meio de cultura.....	34
4.3.3.1. Supressão de auxinas.....	34
4.3.3.2. Aumento da concentração de sacarose.....	35
4.3.3.3. Aumento da concentração de mio-inositol.....	37
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7. ANEXO.....	47

RESUMO

Neste trabalho são apresentados os ensaios realizados para a caracterização da cultura de *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. (Apocynaceae). Foram determinados os parâmetros: pH, peso fresco, peso seco, produção de alcalóides, e consumo de açúcares. A curva de crescimento foi similar às observadas para as culturas de células de outras espécies, estendendo-se até o dia 14. As culturas de *R. sellowii* não converteram a sacarose em glicose e frutose no meio de cultura. A sacarose foi absorvida diretamente do meio. A absorção completou-se no dia 22. Não houve mudança significativa no pH do meio durante o desenvolvimento celular.

A vomilenina foi identificada como o alcalóide majoritário. As alterações na produção deste alcalóide foram avaliadas pela modificações nas condições de cultivo, supressão de auxinas, aumento da concentração de sacarose e mio-inositol, adição de extrato de levedura (eliciador biótico), e adição dos precursores triptofano e triptamina. Em todos os casos houve a supressão da produção de vomilenina. Com exceção da adição de precursores, os tratamentos provocaram o acúmulo de substâncias desconhecidas, possivelmente outros alcalóides.

ABSTRACT

This work aimed to characterize the growth parameters of a *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. (Apocynaceae) cell suspension culture. The parameters analyzed were pH variation, biomass accumulation (fresh weight and dry weight), production of alkaloids and sugars uptake. The growth curve was similar to that observed for other plant cells, the culture cycle lasted for 14 days. *R. sellowii* cultures did not converted sucrose into glucose and fructose in the culture medium. Sucrose was directly taken up from the medium. The complete uptake occurred at day 22. There were no significant changes in the medium pH during the cell development.

The major alkaloid accumulated in the cultures was characterized as the vomilenine. The regulation of vomilenine production was also evaluated by changing the culture conditions: depletion of auxins, increase of sucrose and *myo*-inositol concentration, addition elicitor (yeast extract) and precursor feeding (tryptophan and tryptamine). In all the conditions tested, vomilenine production was suppressed. Moreover, with the exception of precursor feeding, all treatments caused the accumulation of unknown substances, possibly alkaloids.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
atm	atmosfera
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CCR	cromatografia em coluna rápida
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
d	dubleto
d.i.	diâmetro interno
dd	duplo dubleto
ddd	duplo duplo dubleto
dt	duplo tripleto
Hz	hertz
J	constante de acoplamento
m	multipeto
MeOH	metanol
mg	miligrama
MHz	megahertz
min.	minuto
p.	página
PAL	enzima fenilalanina amônia liase
picloram	ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RP	fase reversa (reverse phase)
rpm	rotações por minuto
s	singleto
sl	singleto largo
STR	enzima strictosidina sintase
t	tripleto

TDC	enzima triptofano descarboxilase
TR	tempo de retenção
UV	radiação ultravioleta
V	volume
VIS	visível
δ	deslocamento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alcalóides indólicos das classes harmano, bases livres e alcalóides do esporão-do-centeio	1
Figura 2	Precusores dos alcalóides indólico-monoterpênicos	2
Figura 3	Sistema de numeração proposto por LE MEN e TAYLOR	2
Figura 4	Relação biossintética das classes dos alcalóides indólicos monoterpênicos	3
Figura 5	Posição do gênero <i>Rauvolfia</i> na família <i>Apocynaceae</i>	4
Figura 6	Reserpina	5
Figura 7	Metodologia para o isolamento dos alcalóides a partir do meio de cultura	14
Figura 8	Metodologia de isolamento dos alcalóides das células de <i>R. sellowii</i>	15
Figura 9	Metodologia para o isolamento dos alcalóides de meio de cultura e de células para quantificação	17
Figura 10	Espectro de RMN de ^1H de RSC1	23
Figura 11	Espectro de RMN de ^{13}C de RSC1	24
Figura 12	Variação da biomassa durante o crescimento celular de <i>R. sellowii</i>	25
Figura 13	Variação do pH no meio de cultura durante o crescimento de <i>R. sellowii</i>	26
Figura 14	Consumo de frutose, glicose e sacarose, no meio de cultura, durante o crescimento celular	27

Figura 15	Alcalóides totais recuperados ao longo da curva de crescimento	28
Figura 16	Comparação entre os cromatogramas do alcalóide RSC1 (vomilenina) e os alcalóides das células (Etapa 1) no dia zero da curva de crescimento	30
Figura 17	Cromatogramas das frações de alcalóides (extraídos de (C)élulas e de (M)eiio de cultura, nas etapas (1) e (2)), nos dias zero, dois e seis da curva de crescimento de <i>R. sellowii</i>	30
Figura 18	Cromatogramas das frações de alcalóides da cultura controle e dos alcalóides vomilenina e triptamina	32
Figura 19	Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas suplementadas com triptofano (15,3 mg/L) ou triptamina (15,3 mg/L)	33
Figura 20	Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas expostas ao agente estressante extrato de levedura (201,0 mg/L)	34
Figura 21	Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas mantidas sem auxinas	35
Figura 22	Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas mantidas em meio com concentração de sacarose aumentada (120 g/L)	36
Figura 23	Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas mantidas em meio com concentração de mio-inositol aumentada (600 mg/L)	37
Figura 24	Curva padrão para quantificação de frutose, glicose e sacarose	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Gradiente utilizado na CLAE dos alcalóides de <i>R. sellowii</i>	18
Tabela 2	Substâncias isoladas do meio de cultura por CCDP com os sistemas eluentes S1 e S2	19
Tabela 3	Rendimento das frações coletadas na CCR dos alcalóides totais da biomassa	20
Tabela 4	Substâncias isoladas da fração de alcalóides-totais da biomassa por CCR e CCDC	21
Tabela 5	Dados espectrais de RMN de ^1H de RSC1 e vomilenina	22
Tabela 6	Dados espectrais de RMN de ^{13}C de RSC1 e vomilenina	22
Tabela 7	Alcalóides totais do meio de cultura durante a curva de crescimento	29
Tabela 8	Variação da biomassa durante o período de crescimento	31
Tabela 9	Alcalóides totais de suspensões celulares de <i>R. sellowii</i> cultivadas em meios de cultura modificados	31

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais superiores produzem, além dos compostos relacionados ao metabolismo primário, comuns a todos os organismos, substâncias não essenciais para a manutenção do metabolismo celular, genericamente denominadas metabólitos secundários.

Os metabólitos secundários foram considerados compostos sem nenhuma função específica até terem seu envolvimento na atração de agentes polinizadores, nos mecanismos de defesa contra agentes patogênicos e físicos (radiação ultravioleta) demonstrados (HARTMANN, 1991).

Os alcalóides indólicos são um grupo importante de metabólitos secundários. Caracterizam-se pela presença de um núcleo indol, derivado biossinteticamente do aminoácido *L*-triptofano. Esses alcalóides podem ser classificados em quatro classes: bases simples, β -carbolinas, alcalóides do esporão-do-centeio (ergot) e alcalóides indólicos monoterpênicos (SCHRIPSEMA *et al.*, 2002). As bases simples são derivadas do triptofano por descarboxilação, metilação e/ou hidroxilação. A classe das β -carbolinas, também denominada de alcalóides do tipo harmano, caracteriza-se pela presença de um segundo anel heterocíclico de seis membros, enquanto a presença de um sistema de anéis alicíclicos, derivados do dimetil-alil-pirofosfato, é característico dos alcalóides do esporão-do-centeio (Figura 1).

Figura 1. Alcalóides indólicos das classes harmano, bases livres e alcalóides do esporão-do-centeio

A última classe consiste nos alcalóides indólicos monoterpênicos. Essas substâncias têm como precursores a triptamina e a secologanina. A triptamina é produzida nas células vegetais pela descarboxilação do aminoácido *L*-triptofano, reação promovida pela enzima triptofano descarboxilase (TDC). A secologanina é um iridóide derivado do monoterpene geraniol através de uma série de reações oxidativas (Figura 2).

Figura 2. Precursores dos alcalóides indólico-monoterpênicos

A condensação da triptamina com a secologanina, promovida pela enzima strictosidina sintase (STR), resulta na strictosidina, a precursora universal dos alcalóides indólicos monoterpênicos (Figura 4).

Os alcalóides indólicos monoterpênicos foram organizados em três classes:

- Classe I : ioimbinóide
- Classe II : iboga
- Classe III: aspidosperma

O sistema de numeração atualmente em uso foi proposto por LE MEN e TAYLOR (1965) com base na biogênese dos alcalóides, tendo como referência o alcalóide ioimbina (Figura 3).

Figura 3. Sistema de numeração proposto por LE MEN e TAYLOR (1965)

Esta classificação foi revista por KISAKÜREK e HESSE (1980) e VAN BEEK (1984), que estabeleceu onze classes de alcalóides indólicos com diversas subclasses. A relação biossintética entre as onze classes propostas está representada na figura 4.

Figura 4. Relação biossintética das classes dos alcalóides indólicos monoterpênicos

São conhecidos mais de 2.000 alcalóides indólicos monoterpênicos e derivados (AERTS e VERPOORTE, 1992), provenientes principalmente de espécies de Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae. O número de alcalóides de interesse comercial, no entanto, limita-se a cerca de trinta. Dentre estes listam-se aqueles produzidos por espécies de *Rauvolfia*: ajmalina, rescinamina, reserpina e ioimbina (VERPOORTE e HEIJDEN, 1991).

1.1. O gênero *Rauvolfia*

O gênero *Rauvolfia* (ENDRESS e BRUYNS, 2000) pertence à família Apocynaceae, uma das três principais famílias em que são encontrados os alcalóides indólicos monoterpênicos. Um esquema de sua posição taxonômica está representado na figura 5.

<u>Famílias</u>	<u>Subfamílias</u>	<u>Tribos</u>	<u>Gêneros</u>
Apocynaceae	Rauvolfioideae	Vinceae	<i>Rauvolfia</i>
	Apocynoideae	Alstonieae	<i>Amsonia</i>
	Asclepiadoideae	Alyxieae	<i>Catharanthus</i>
	Periplocoideae	Carisseae	<i>Kopsia</i>
	Secamonoideae	Hunterieae	<i>Neisosperma</i>
		Melodineae	<i>Ochrosia</i>
		Plumerieae	<i>Petchia</i>
		Tabernaemontaneae	<i>Vinca</i>
		Willughbeieae	

Figura 5. Posição do gênero *Rauvolfia* na família Apocynaceae (ENDRESS e BRUYNS, 2000)

São descritas 128 espécies para o gênero de hábito arbóreo ou arbustivo, distribuídas pelas regiões tropicais do planeta (RIZZINI e MORS, 1995).

Várias espécies de *Rauvolfia* são utilizadas na medicina popular. Os registros mais antigos de uso sistemático de plantas deste gênero são da Índia e datam de aproximadamente 3000 anos. As raízes de *Rauvolfia serpentina*, então denominadas de raízes Sarpaghanda, eram empregadas no tratamento de febres, mordidas de cobra e insanidade (STÖCKIGT, 1993).

Ainda que muito utilizada na Índia e nos países árabes, a *R. serpentina* só atraiu a atenção dos povos ocidentais após a Idade Média. O interesse por suas propriedades medicinais levou a Companhia das Índias Ocidentais a enviar George Eberhardt Rumpf, professor de botânica do Medicinal Garden de Amsterdã, em busca de outras plantas com potencial uso medicinal. Em 1705, Charles Plumier classificou esta espécie na família

Apocynaceae, em um gênero denominado *Rauvolfia* em homenagem ao médico e botânico alemão Leonhardt Rauwolf (STÖCKIGT, 1993).

A confirmação do valor terapêutico da *R. serpentina*, na década de 1930, deu início à grande atividade de pesquisa nas áreas da química e farmacologia. A pesquisa farmacológica resultou na prescrição das raízes como sedativo e no tratamento da epilepsia e insanidade.

A análise detalhada dos extratos de raízes levou ao isolamento de seis alcalóides indólicos, dentre os quais a ajmalina (SIDDIQUI e SIDDIQUI, 1932).

A descoberta das atividades sedativa e anti-hipertensiva da reserpina (Figura 6) por MÜLLER *et al.* (1952) gerou uma grande demanda de raízes de *R. serpentina*. O esgotamento dos estoques indianos deu início, quase que simultaneamente, à busca de outras espécies de *Rauvolfia* que pudessem ser empregadas como fonte alternativa para reserpina e às pesquisas para o estabelecimento de condições adequadas para o cultivo extensivo das plantas e o cultivo *in vitro* de células e tecidos (STÖCKIGT, 1993).

Figura 6. Reserpina

As espécies que apresentaram rendimento em reserpina comparáveis ao da *R. serpentina* (0,05% a 0,2%) foram a africana *R. vomitoria* Afzel, com 0,014%, e a sul-americana *R. tetraphylla* L., com 0,04% - 0,17% (RIZZINI e MORS, 1995).

A reserpina também é encontrada em algumas das espécies brasileiras do gênero *Rauvolfia*. No Brasil são encontradas dezesseis espécies do gênero *Rauvolfia* (RIZZINI e MORS, 1995). Dentre elas destacam-se:

***R. sellowii* M. Arg** - Popularmente, é denominada de Casca-d'anta e Jasmin-grado. Planta de porte arbóreo, chega a atingir 15 metros de altura. É encontrada nas matas litorâneas de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro. Foi a primeira espécie do gênero *Rauvolfia* estudada no Brasil e é a única explorada comercialmente. Não apresenta a reserpina. De suas folhas, utilizadas na medicina popular como anti-hipertensivo, já foram extraídos e isolados os alcalóides sellowina, raucafrinolina, perakina, vomilenina, 12-demetoxitabernulosina, picrinina, 19 α ,20 α -epoxi-akuamicina (BATISTA *et al.*, 1996). Da casca de suas raízes foram extraídos reserpilina, sarpagina, lochnerina, β -ioimbina, harmano (BELEM-PINHEIRO *et al.*, 1988);

***R. ligustrina* R&S** - (sin. *R. ternifolia* H.B.K.): Apresenta-se como um pequeno arbusto campestre ou subarbusto. De fácil cultivo, é encontrado em Pernambuco, Ceará, Maranhão, Pará, Bolívia, Colômbia e Antilhas. Contém vinte alcalóides, dentre os quais a reserpina (0,03%) (RIZZINI e MORS, 1995).

***R. grandiflora* Mart** - É uma árvoreta (5-6 m) das matas montanhosas do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco. Contém 0,08% de reserpina (RIZZINI e MORS, 1995).

***R. pentaphylla* Ducke** – Essa espécie amazônica contém 0,45% de reserpina (RIZZINI e MORS, 1995).

As dificuldades encontradas no cultivo, tanto em casas de vegetação como no campo, e o lento crescimento das plantas estimularam botânicos e fisiologistas a estabelecer as condições para o cultivo *in vitro* de células e tecidos.

A obtenção dos alcalóides ajmalina, ajmalicina e serpentina de cultura de calos confirmou a viabilidade da utilização dessas culturas celulares como fonte dos alcalóides de *Rauvolfia*, ainda que suas baixas produtividades inviabilizem aplicações industriais (STÖCKIGT, 1993).

1.2. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos fundamenta-se na possibilidade de as células multiplicarem-se e formarem calos, em condições de cultivo adequadas, independentemente dos órgãos dos quais tenham sido removidas. Esses calos são formados por células não-diferenciadas, pouco associadas. As culturas celulares podem ser mantidas sob crescimento contínuo em meio de cultivo semi-sólido ou em meio líquido. A adição de hormônios e outras substâncias essenciais ao crescimento celular pode induzir o processo de diferenciação, originando órgãos (raízes, folhas etc.) e, eventualmente, uma planta completa (SAMUELSSON, 1992).

A baixa produtividade é um dos fatores limitantes da utilização industrial das culturas de tecidos para a obtenção de alcalóides. De modo geral, a produtividade das culturas de tecidos é muito inferior à das plantas. As tentativas de contornar essa limitação levaram ao estabelecimento de diversas estratégias de modificação das condições de cultivo, como detalhado a seguir.

1.2.1. Composição do meio

A otimização da composição do meio de cultura foi uma estratégia muito empregada. Foram estudados os efeitos da concentração de fosfato, nitrogênio, sacarose e outros nutrientes na produção de alcalóides e biomassa. O aumento da concentração de sacarose em culturas de *Catharanthus roseus* levou ao aumento da produção de biomassa e de alcalóides. Por sua vez, o aumento das concentrações de nitrogênio e de fosfato resultou apenas no aumento da produção de biomassa sem alteração da produção de alcalóides (KNOBLOCH e BERLIN, 1980).

Com o objetivo de estabelecer as condições ótimas para a produção de triptamina e ajmalicina, SCHLATMANN *et al.* (1992) estudaram o efeito da alteração simultânea da concentração de fosfato, amônio, glicose e nitrato na produtividade de culturas em suspensão de *C. roseus*. A variação da concentração do açúcar mostrou-se o fator mais importante, com concentração ótima acima de 500 mmol/L. Outro fator importante foi a

proporção entre NO_3^- e NH_4^+ . A produção de ajmalicina foi otimizada (10,36 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco) com concentrações de amônio e fosfato próximas de zero e 12 mmol/L de nitrato. A produção de triptamina foi mais elevada com baixas concentrações de glicose e nitrato e altas concentrações de fosfato e amônio.

Uma variante dessa metodologia foi o aumento da produção de alcalóides pelo cultivo em duas etapas. Na primeira etapa as células foram cultivadas em meio favorável ao aumento da biomassa (meio de crescimento). Após obter o aumento da biomassa, induziu-se o aumento da produção de alcalóides pela transferência das células para um meio de cultura indutor da síntese de alcalóides (meio de indução) (VERPOORTE *et al.*, 1999).

1.2.2. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento afetam o crescimento, a diferenciação celular e, conseqüentemente, o metabolismo secundário. A influência da concentração de auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno na produção de alcalóides em *C. roseus* foi muito estudada (HEIJDEN *et al.*, 1989; LOUNASMA e GALAMBOS, 1989; GANAPATHI e KARGI, 1990).

As auxinas, indutoras da divisão celular, diminuem a produção de alcalóides. A adição de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e de outras auxinas causaram a supressão da transcrição dos genes das enzimas triptofano descarboxilase (*tdc*) e estrictosidina sintase (*str*). A supressão, mais pronunciada para *tdc* do que para *str*, foi atribuída à maior estabilidade do RNA mensageiro da *str* (MORENO, 1994).

As citocininas são associadas ao alongamento celular. Sua influência na produção de alcalóides mostrou-se dependente da concentração e da linhagem celular empregadas. As citocininas foram capazes de aumentar a produção de alcalóides em células cultivadas sem auxinas (KODJA *et al.*, 1989; DECENDIT *et al.*, 1992).

1.2.3. Exposição da cultura a fatores de estresse

A exposição da cultura a diferentes agentes estressantes desencadeou a produção de alcalóides em várias linhagens de *C. roseus*. Este aumento foi observado com a exposição das células a choque osmótico (SMITH *et al.*, 1987), irradiação com UV (HEIJDEN *et al.*, 1989) e pela adição de sais inorgânicos, inclusive aqueles de metais pesados (SMITH *et al.*, 1987; TALLEVI e DiCOSMO, 1988; BACKER-ROYER *et al.*, 1990) e de homogenatos fúngicos.

O emprego de homogenatos fúngicos em *C. roseus* levou à produção de alcalóides e compostos fenólicos, por indução da atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) (SEITZ *et al.*, 1989). A indução de alcalóides, no entanto, pode ser afetada pela concentração de homogenato utilizada. Baixas concentrações de homogenato de *Pythium vexans* resultaram em aumento da produção de ajmalicina e síntese *de novo* de catarantina, sem alteração da concentração de serpentina. O emprego de altas concentrações do homogenato reduziu em oito vezes a produção de ajmalicina e inibiu a biossíntese da catarantina (NEF *et al.*, 1991).

O homogenato fúngico também pode ter influência no mecanismo de exportação dos alcalóides das células. Após a eliciação, a maior parte dos alcalóides foi encontrada no meio de cultura (NEF *et al.*, 1991).

1.2.4. Adição de precursores

Outra metodologia empregada para aumentar a produção de alcalóides indólicos foi a adição de precursores. Foram empregadas duas abordagens: a adição dos precursores ao meio de cultura e a adição de substâncias capazes de interferir no seu metabolismo.

Por fazer a conexão entre o metabolismo primário e a síntese dos alcalóides, convertendo triptofano em triptamina, a triptofano descarboxilase foi considerada um possível sítio de regulação da biossíntese. A adição de triptofano somente aumentou a concentração de triptamina, sem afetar a produção de alcalóides indólicos (FACCHINI e DiCOSMOS, 1991; KARGI e GANAPATHI, 1991). A adição de outros precursores foi mais bem sucedida.

MORENO *et al.* (1993) obtiveram aumento da produção de ajmalicina e strictosidina pela adição de secologanina, loganina e ácido logânico, precursores da porção monoterpênica dos alcalóides indólicos. NAUDASCHER *et al.* (1990) reportou o aumento de duas vezes na produção de alcalóides pela adição de 25 μ moles a 50 μ moles de secologanina na fase de crescimento. A eficiência do processo, entretanto, mostrou-se limitada à capacidade de absorção dos precursores, variando com o estágio de desenvolvimento das células (NAUDASCHER *et al.*, 1989).

2. OBJETIVOS

A cultura de células em suspensão de *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. foi obtida e caracterizada por RECH *et al.* (1998).

Em nosso laboratório, no entanto, essa cultura apresentou-se bastante oxidada (escura), com as células associadas em grandes aglomerados, dificultando a separação, por filtração, da biomassa a ser utilizada como inóculo.

Com o objetivo de melhorar o crescimento e a aparência geral da suspensão celular, experimentamos diversas modificações na composição do meio de cultura. Obtivemos uma cultura com bom crescimento, mais clara e com aglomerados celulares pequenos, ao substituímos a auxina ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) pela auxina ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram).

O presente estudo teve por objetivo caracterizar esta nova cultura celular. Os parâmetros utilizados foram: consumo de açúcares, acúmulo de massa celular e produção de alcalóides. A viabilidade de indução da produção de alcalóides por modificação da composição do meio de cultura, adição de precursores e eliciadores também foi estudada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura celular

As suspensões celulares foram mantidas em meio líquido Gamborg (GAMBORG *et al.*, 1968), suplementado pelo ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (1 mg/L), ácido nicotínico (1,0 mg/L), mio-inositol (100 mg/L), piridoxina (1,0 mg/L), tiamina (10 mg/L), sacarose (30 g/L), cinetina (0,2 mg/L). O pH foi ajustado entre 5,7 e 5,9.

O meio líquido foi substituído a cada 14 dias, após incubação a 25°C, em agitador orbital (100 rpm), sob iluminação constante (1.500 lux).

3.1.1. Curva de crescimento

Observou-se, a partir de ensaios prévios (não apresentados), que o maior crescimento celular foi obtido com inóculo de 10,00 g de células frescas, em erlenmeyers de 250 mL e 50 mL de meio. As culturas foram transferidas para meio fresco a cada 14 dias.

As curvas de crescimento foram determinadas, em duplicata, com inóculos homogêneos. Foram inoculadas massas de células entre 9,40 e 11,10 g.

As amostras foram coletadas após a inoculação (dia 0) e após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 26 e 34 dias de cultivo. A cada coleta foram determinados a massa celular (peso fresco) e o pH do meio de cultura, após filtração em funil de Büchner.

As células foram liofilizadas para a determinação do peso seco e armazenadas em dessecador, ao abrigo da luz, para posterior quantificação dos alcalóides. As amostras de meio de cultura foram armazenadas a -20°C para quantificação de açúcares e de alcalóides.

3.1.2. Modificações nas condições de cultivo

Nos estudos de modificação da composição do meio de cultura foram investigados os efeitos da remoção da auxina e o aumento das concentrações de sacarose (120 g/L) e mio-inositol (600 mg/L). A influência da adição de precursores foi avaliada pela adição de *L*-triptofano (15,3 mg/L) e triptamina (15,3 mg/L). Como agente estresse foi empregado o extrato de levedura (201,0 mg/L).

Como controle foram utilizadas suspensões celulares cultivadas nas condições descritas no item 3.1.

3.2. Isolamento de alcalóides

As células e o meio de cultura foram analisados separadamente.

As substâncias graxas eventualmente presentes em 400 mL de meio de cultura, com pH ajustado para 2,0 pela adição de ácido fosfórico 0,1 mol/L, foram removidas por quatro extrações com 100 mL de hexano. Após a alcalinização da fase aquosa (pH 10,0) pela adição de hidróxido de amônio 0,6 mol/L, os alcalóides foram repetidamente extraídos com 100 mL de diclorometano, até obter-se reação negativa no teste para alcalóides com o reagente de Dragendorff (FARNSWORTH *et al.*, 1962).

As fases de diclorometano foram reunidas e evaporadas à secura em evaporador rotatório, obtendo-se a fração de alcalóides totais do meio de cultura (Figura 7).

As células frescas (200 g) foram extraídas, por três vezes, com 150 mL de metanol em homogeneizador. Após a separação dos resíduos celulares por filtração em funil de Büchner, os extratos metanólicos foram reunidos e o solvente removido em evaporador rotatório.

O extrato metanólico seco foi ressuspendido em 50 mL de ácido fosfórico 0,1 mol/L e novamente filtrado. O resíduo foi submetido ao mesmo tratamento por três vezes e os filtrados foram reunidos.

Os alcalóides foram isolados da fase aquosa ácida por procedimento análogo ao empregado para o meio de cultura (Figura 8).

Figura 7. Metodologia para o isolamento dos alcalóides a partir do meio de cultura

Os alcalóides do meio de cultura foram isolados por Camada Delgada Preparativa (CCDP), como descrito no item 3.4.1. A fração de alcalóides totais obtidas da biomassa foi submetida à Cromatografia em Coluna Rápida (CCR), como descrito no item 3.4.2, e as frações coletadas purificadas por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), como descrito no item 3.4.1. As substâncias recuperadas foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) (Bruker DRX 500 MHz) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN de ^{13}C) (Bruker DRX 125 MHz), em CDCl_3 .

Figura 8. Metodologia de isolamento dos alcalóides das células de *R. sellowii*

3.3. Determinação quantitativa dos alcalóides

Os alcalóides da biomassa e do meio de cultura foram quantificados segundo modificação da metodologia descrita por SCHRIPSEMA e VERPOOTE (1992).

Os alcalóides foram extraídos de 2,00 mL de meio de cultura ou de 50,0 mg de células liofilizadas, às quais se adicionou, previamente, 0,50 mL de água destilada.

Ensaio preliminares (dados não apresentados), monitorados por CLAE, como descrito no item 3.4.3.1, evidenciaram a completa extração dos alcalóides após cinco extrações.

A primeira etapa de extração consistiu na adição de 3,00 mL de diclorometano, homogeneização (30 segundos em vórtex), centrifugação (1.800 rpm, 5 minutos) e coleta da fase diclorometano.

As fases diclorometano foram reunidas e, após a remoção do solvente, a massa da fração de alcalóides-totais recuperada foi determinada.

A segunda etapa da extração da triptamina foi semelhante à primeira, mas antecedida pela adição de 0,50 mL de hidróxido de sódio 0,6 mol/L à biomassa ou ao meio de cultura. As fases diclorometano de cinco extrações, em cada uma das etapas, foram reunidas e, após a remoção do solvente, a massa da fração de alcalóides-totais recuperada foi determinada.

As análises das frações de alcalóides-totais foram realizadas por CLAE após a solubilização em 500 µL de metanol.

A metodologia de extração dos alcalóides para quantificação está representado na figura 9 (etapas 1 e 2).

3.4. Sistemas cromatográficos

3.4.1. Camada delgada (CCDC e CCDP)

A análise da composição da fração de alcalóides provenientes das células e do meio de cultura foi realizada em gel de sílica 60 PF₂₅₄ (Merck), com espessura de 1,0 mm. Para purificação, empregou-se a mesma fase estacionária, com espessura de 0,5 mm.

As análises foram realizadas em cubas cromatográficas saturadas com vapores de amônia, empregando-se dois sistemas de eluentes:

Sistema 1 (S1): clorofórmio / metanol (9:1 V/V).

Sistema 2 (S2): acetato de etila / metanol (9:1 V/V).

As placas cromatográficas foram visualizadas com luz ultravioleta (UV) 254 nm e 356 nm e reveladas com solução do reativo de Dragendorff.

Figura 9. Metodologia para o isolamento dos alcalóides de meio de cultura e de células para quantificação

3.4.2. Cromatografia em coluna rápida (CCR)

Empregaram-se pré-coluna (47 mm x 20 mm) e coluna (110 mm x 20 mm), ambas de vidro, com fase estacionária de gel de sílica 60 para cromatografia, com partículas de tamanho de 0,040 a 0,063 mm (Merck), previamente lavada com acetato de etila e seca em estufa a 50°C. A cromatografia foi desenvolvida sob pressão de gás nitrogênio (1 atm).

A eluição foi realizada com gradiente de diclorometano e metanol. O aumento da polaridade ocorreu pela adição de metanol: 0, 10, 20, 40, 50 e 100% (V/V). Foram recolhidas 21 frações de 50 mL.

3.4.3. Cromatografia líquida de alfa eficiência (CLAE)

3.4.3.1. Alcalóides

As análises foram realizadas em aparelho Shimadzu, modelo LC-10, equipado com bomba ternária, detector UV-VIS de comprimento de onda variável e injetor automático.

A cromatografia foi desenvolvida em coluna LichroCart LiChrospher 60 RP-select B (5 μ m, 125 x 4 di mm) e monitorada em 280 nm. Como sistema de eluente utilizou-se gradiente de acetonitrila e solução aquosa de KH_2PO_4 20 mmol/L, pH 4,0, (Tabela 1), com fluxo de eluente de 1,5 mL/min.

Tabela 1. Gradiente utilizado na CLAE dos alcalóides de *R. sellowi*.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	KH_2PO_4 , 20 mmol/L (%)
0	10	90
2	10	90
6	20	80
7	20	80
11	25	75
12	25	75
16	30	70
17	30	70
18	35	65
19	35	65
29	100	0
32	100	0
35	10	90

3.4.3.2. Açúcares

Para a determinação da concentração de frutose, glicose e sacarose no meio de cultura, durante o crescimento celular, empregou-se bomba Shimadzu LC-10AD, injetor manual Rheodyne® 7725i com alça de injeção de 20 μ L e detector de índice de refração Shimadzu RID-10A. A temperatura da célula de detecção foi programada para 40°C.

A eluição, em sistema isocrático, foi realizada com solução acetonitrila / água (9:1 V/V), fluxo de 1,5 mL/min, em coluna LiChrosorb NH_2 (7 μ m, 250 x 4 d.i. mm, Merck).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 2,90 kg de células frescas e 3,00 L de meio de cultura foram obtidos, respectivamente, 464,0 mg (0,016%) e 63,0 mg (2,1 %, m/V) de alcalóides totais. A produtividade das culturas de células em suspensão de *R. sellowii*, ao serem inicialmente caracterizadas por RECH *et al.* (1998), foram comparáveis à da planta adulta: 1,28% (BATISTA *et al.*, 1996). A redução da produtividade observada pode ser consequência do “envelhecimento” da cultura.

As culturas de tecidos, de modo geral, apresentam baixa produtividade de alcalóides. Em plântulas regeneradas a partir de calos de *R. serpentina* foram encontrados rendimentos de 0,88% em relação ao peso seco, um valor intermediário entre os observados em raízes (1,28%) e folhas (0,63%) de plantas adultas no campo (ROJA *et al.* ,1987).

4.1. Isolamento de alcalóides

4.1.1. Meio de cultura

A análise da fração de alcalóides totais provenientes do meio de cultura por CCDC, com o sistema eluente S1, evidenciou a presença de duas substâncias. Através de purificação por CDDP, com os sistemas de eluentes S1 e S2, recuperou-se 1,5 mg de uma substância, à qual atribuiu-se o código RSM1 (Tabela 2). A pequena quantidade do material isolado foi insuficiente para o registro de RMN de ^1H e ^{13}C e sua identificação.

Tabela 2. Substâncias isoladas do meio de cultura por CDDP com os sistemas eluentes S1 e S2

CÓDIGO	MASSA (mg)	R _f (S1)	R _f (S2)
RSM1	1,5	0,62	0,48
RSM2	traços	0,84	0,64

4.1.2. Biomassa

A fração de alcalóides totais obtida da biomassa (464,0 mg) foi submetida à CCR. O sistema eluente utilizado e as massas de alcalóides recuperadas a partir de cada fração estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Rendimento das frações coletadas na CCR dos alcalóides totais da biomassa

MeOH (%)	FRAÇÕES	MASSA (mg)
0	1	7,0
	2	124,3
10	3	2,0
	4	57,1
20	5	42,0
	6	32,4
	7	21,6
	8	17,8
	9	10,3
40	10	6,7
	11	1,1
	12	1,7
	13	1,2
	14	1,6
50	15	1,5
	16	1,5
	17	1,7
	18	1,3
	19	2,5
100	20	2,5
	21	3,3
	22	2,7

Da massa total aplicada foram recuperados 343,8 mg, totalizando 74,1% de recuperação.

A análise das frações por CCDC demonstrou que somente as frações 2, 4, 5, 6, 7 e 8 continham alcalóides. Estas frações foram submetidas a CCDP para isolamento de seus componentes. Os resultados obtidos com relação à purificação dos alcalóides estão apresentados na tabela 4.

A concordância dos valores de R_f das substâncias RSM1 e RSC2, nos sistemas eluentes S1 e S2, sugere tratar-se da mesma substância.

Apenas três bandas, denominadas RSC1, RSC2 e RSC3, foram isoladas em quantidade suficiente para registro de RMN de ^1H e ^{13}C .

Tabela 4. Substâncias isoladas das diferentes frações obtidas por CCR e CCDC

Fração da CCR	CÓDIGO	MASSA (mg)	R _f (S1)	R _f (S2)
fração 2	RSC1	18,4	0,75	0,45
	RSC4	—	0,88	0,71
fração 4	RSC2	5,0	0,62	0,48
frações 4 e 5	RSC5	—	0,55	0,26
fração 5	RSC6	—	0,74	0,35
frações 5 e 6	RSC3	5,3	0,50	0,32
fração 7	RSC8	—	0,18	n
frações 7 e 8	RSC7	1,7	0,35	n

(n) Compostos que não apresentaram boa resolução no sistema eluente.

Para as frações RSC2 e RSC3 foram encontrados sinais característicos de alcalóides indólicos ainda em mistura. Devido à grande proporção das impurezas presentes, a análise espectral foi inviabilizada.

Os dados obtidos com o espectro de RMN de ^1H (Figura 10) da fração majoritária RSC1 na região de hidrogênios aromáticos foram condizentes para um anel do tipo indolenina não substituído (LIBOT *et al.*, 1980; VERPOORTE, 1986; SCHRIPSEMA e VERPOORTE, 1991; BATISTA *et al.*, 1996). O conjunto dos sinais nas demais regiões, nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 11), foram similares aos valores encontrados na literatura para o alcalóide vomilenina (BATISTA *et al.*, 1996).

Os dados espectrais do alcalóide majoritário RSC1 estão resumidos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Dados espectrais de RMN de ^1H de RSC1 e vomilenina (BATISTA *et al.*, 1996)

H	RSC1	Vomilenina
	δ (J, Hz)	δ (J, Hz)
3	4,34 sl	4,41 sl
5	2,46 sl	2,46 dd (5,7; 6,1)
6	2,77 dd (12,1 , 4,9)	2,80 dd (12,2; 4,8)
	1,70 dd (7,0 , 1,5)	1,72 dd (6,9; 1,5)
9	7,45 d (7,4)	7,47 d (7,8)
10	7,23 dt (7,5 , 0,9)	7,25 ddd (7,5; 7,3; 1,0)
11	7,41 dt (7,7 , 1,2)	7,42 ddd (7,7; 7,6; 1,3)
12	7,63 d (7,7)	7,64 d (7,6)
14	1,96 s	1,95 d
16	3,29 sl	3,33 sl
17	4,99 s	4,99 d
18	1,26 s	1,25 s
19	3,92 sl	3,90 sl
21	5,03 sl	5,13 sl
OCOCH ₃	2,17 s	2,18 s

Tabela 6. Dados espectrais de RMN de ^{13}C de RSC1 e vomilenina (Batista *et al.*, 1996)

Carbono	RSC1	Vomilenina
	δ (J, Hz)	δ (J, Hz)
2	182,4	181,5
3	54,3	54,1
5	49,2	49,1
6	36,6	36,4
7	65,2	64,5
8	136,3	136,0
9	123,8	123,8
10	125,7	125,8
11	128,8	128,9
12	121,2	121,3
13	156,5	156,5
14	26,3	26,3
15	28,3	28,3
16	49,2	49,0
17		79,6
18	13,1	13,2
19	119,7	120,0
20		128,5
21		82,5
OCOCH ₃	21,1	21,1
OCOCH ₃	169,9	169,9

4.2. Caracterização da cultura

4.2.1. Acúmulo de biomassa

O tamanho do inóculo constitui um fator determinante na produtividade das culturas de células em suspensão. Inóculos muito pequenos podem gerar pequenas quantidades de alcalóides, tornando as culturas economicamente inviáveis. Entretanto, o emprego de inóculos maiores (4:10, célula / volume de meio de cultura) em culturas de *C. roseus* não apresentou o correspondente aumento de produtividade esperado (MORENO *et al.*, 1993).

Nas culturas de *R. sellowii*, a razão de inóculo empregada (2:10) não permitiu observar uma fase *lag*. Após a inoculação as células iniciaram imediatamente a fase de crescimento exponencial. A fase estacionária estendeu-se do dia 12 ao dia 26, a partir do qual iniciou-se uma fase de senescência (Figura 12).

Figura 12. Variação da biomassa durante o crescimento celular de *R. sellowii*

A taxa de crescimento observada possibilitou, no prazo de 14 dias, triplicar a massa celular inicialmente inoculada.

A comparação entre as curvas obtidas para peso fresco e para peso seco evidencia que ambas atingiram o crescimento máximo por volta do 14º dia. Em outras culturas celulares, geralmente observa-se o máximo na curva de peso fresco alguns dias após o máximo da curva de peso seco. Essa defasagem é atribuída à elongação celular decorrente do aumento dos vacúolos (MORENO *et al.*, 1996; COSTANTIN, 2001).

Na cultura em suspensão de *R. sellowii*, a sincronia observada entre o máximo da curva de peso seco e de peso fresco sugere que o aumento do volume vacuolar tenha ocorrido simultaneamente ao aumento da massa seca das células.

4.2.2. Variação do pH

O pH do meio de cultura foi inicialmente ajustado entre 5,7 e 5,9. O pH elevou-se de 5,8 até 6,6 em 16 dias de cultivo, após uma redução inicial para pH 5,7. A redução inicial de pH é freqüentemente observada e atribuída ao vazamento do conteúdo vacuolar, decorrente do choque osmótico causado pela transferência das células (LOPES *et al.*, 2000).

É importante ressaltar que a amplitude da variação do pH, da inoculação à fase estacionária, foi inferior a uma unidade, evidenciando a regulação do pH pelas células (Figura 13).

Figura 13. Variação do pH no meio de cultura durante o crescimento de *R. sellowii*

4.2.3. Consumo de açúcares

As curvas de consumo de frutose, glicose e sacarose estão representadas na figura 14. As curvas padrão utilizadas para a quantificação encontram-se no item 7.1.

A concentração de sacarose diminuiu, a partir da inoculação, até o dia quatro. Simultaneamente, as concentrações de glicose e frutose aumentaram discretamente, permanecendo praticamente constantes até o dia 14. Após o dia oito a concentração de sacarose diminuiu continuamente até desaparecer do meio de cultura. A partir do dia 20, não foi mais detectado nenhum dos três açúcares.

Figura 14. Consumo de frutose, glicose e sacarose, no meio de cultura, durante o crescimento celular

Em culturas celulares de outras espécies vegetais [*Rauvolfia serpentina* (LUTTERBACH e STÖCKIGT, 1994), *Psychotria carthagenensis* (LOPES *et al.*, 2000), *Piper cernuum*, (COSTANTIN, 2001)] foi observada a hidrólise rápida e total da sacarose logo nas primeiras horas de cultivo (*P. cernuum*, 48 h; *R. serpentina*, 34 h), atribuída à presença de enzima invertase ácida. Em células vegetais são conhecidas as formas da enzima solúveis no citoplasma e as formas ligadas à parede celular (KNOBLOCH *et al.*, 1982; LEE *et al.*, 1988).

O padrão de consumo de sacarose observado foi semelhante ao descrito inicialmente por RECH *et al.* (1998) para as suspensões de *R. sellowii*. A baixa taxa de hidrólise sugere a presença de enzima invertase com baixa atividade, provavelmente ligada à parede celular. Enquanto outras espécies vegetais absorvem, preferencialmente, as hexoses geradas pela hidrólise da sacarose (LUTHERBACH E STÖCKIGT, 1994; COSTANTIN, 2001), a *R. sellowii* capta preferencialmente a sacarose, enquanto a frutose e a glicose são absorvidas do meio após seu esgotamento.

4.2.4. Produção de alcalóides

O acúmulo de alcalóides atingiu um valor máximo entre os dias 12 e 14, coincidindo com o início da fase estacionária (Figura 15).

Figura 15. Alcalóides totais recuperados ao longo da curva de crescimento

A redução inicial na quantidade de alcalóides presentes na biomassa pode ser atribuída à exportação dos mesmos para o meio de cultura devido à alteração do pH e ao choque osmótico (NEUMANN *et al.*, 1983), decorrentes da transferência das células para o novo meio de cultura. A alteração do pH do meio de cultura resulta na redução do gradiente de prótons estabelecido com os vacúolos – especializados no armazenamento de alcalóides– e, conseqüentemente, na transferência dos mesmos para o meio de cultura. A alteração do pH – redução e, posteriormente, elevação –

foi empregada para aumentar a quantidade de alcalóides recuperados a partir do meio de cultura, após a prévia separação da biomassa, em culturas de células em suspensão de *Catharanthus roseus* (PAYNE *et al.*, 1988; ASADA E SHULER, 1989).

A análise por CLAE da composição dos alcalóides produzidos pela cultura de células demonstrou a presença de uma substância majoritária, identificada como vomilenina por comparação com o padrão isolado (Figura 16).

Toda a vomilenina presente nas células é transportada para o meio de cultura nos dois primeiros dias de cultivo. A produção *de novo* deste alcalóide teve início após o sexto dia. Neste período foi observada a redução da quantidade de vomilenina presente no meio. A redução da quantidade de vomilenina pode estar relacionada à atividade de enzimas peroxidases, também exportadas dos vacúolos, durante o choque osmótico inicial (BARZ, 1975). Os cromatogramas obtidos são apresentados na figura 17. Diferentemente do observado em culturas de *C. roseus* (MORENO *et al.*, 1996), as células de *R. sellowii* não apresentaram acúmulo de triptamina em nenhum ponto da curva de crescimento.

A quantidade de alcalóides extraídos do meio de cultura (Tabela 7) foi muito menor que a da biomassa. Os resultados obtidos apresentaram um grande erro experimental, tornando-se, portanto, não conclusivos.

Tabela 7. Alcalóides totais do meio de cultura durante a curva de crescimento

TEMPO (dias)	ALCALÓIDES TOTAIS ($\mu\text{g/mL}$)
0	64 $\pm$ 90
2	21 $\pm$ 30
4	85 $\pm$ 60
6	43 $\pm$ 60
8	43 $\pm$ 60
10	21 $\pm$ 30
12	85 $\pm$ 120
14	0
16	43 $\pm$ 0
18	43 $\pm$ 0
22	21 $\pm$ 30
26	128 $\pm$ 60
34	106 $\pm$ 90

Figura 16. Comparação entre os cromatogramas do alcalóide RSC1 (vomilenina, TR = 13,0 min) e os alcalóides das células (Etapa 1) no dia zero da curva de crescimento

Figura 17. Cromatogramas das frações de alcalóides (extraídos de (C)élulas e de (M)euio de cultura, nas etapas (1) e (2)), nos dias zero, dois e seis, da curva de crescimento de *R. sellowii*

4.3. Modulação da produção de alcalóides

As variações de biomassa observadas no cultivo da *R. sellowii*, nas condições ensaiadas, e a massa das frações alcalóides totais recuperadas estão disponíveis nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8. Variação da biomassa durante o período de crescimento

Condição	MASSAS INOCULADAS		MASSAS RECUPERADAS	
	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Controle	10,76	0,7253	13,88	1,3657
Sem auxina	11,36	0,7657	16,48	1,7370
Sacarose (120 g/L)	11,00	0,7415	10,44	2,2630
Mio-inositol (600 mg/L)	11,20	0,7549	20,16	1,8537
Extrato de levedura (201,0 mg/L)	11,36	0,7657	24,00	2,1154
Triptofano (15,3 mg/L)	11,20	0,7549	8,96	0,9327
Triptamina (15,3 mg/L)	11,68	0,7873	8,80	0,9302

Tabela 9. Alcalóides totais de suspensões celulares de *R. sellowii* cultivadas em meios de cultura modificados.

Condição	BIOMASSA	MEIO DE CULTURA
	Alcalóides totais (mg/g peso seco)	Alcalóides totais (µg/L)
Controle	22,3	550
Triptofano (15,3 mg/L)	10,5	325
Triptamina (15,3 mg/L)	13,4	275
Extrato de levedura (201,0 mg/L)	26,4	450
Sem auxina	40,1	137
Sacarose (120 g/L)	14,3	175
Mio-inositol (600 mg/L)	24,8	162

4.3.1. Adição de precursores

A importância da disponibilidade de triptofano para a biossíntese dos alcalóides é inquestionável, como demonstraram os ensaios de marcação isotópica por adição de 3-¹³C-triptofano (SCOTT *et al.*, 1980). Nos ensaios que realizamos, a adição de triptofano ou de triptamina resultaram em acúmulo de biomassa e frações de alcalóides totais inferiores aos observados para o controle (Tabela 8 e 9, Figura 18). Ao serem analisados por CLAE, as frações de alcalóides totais não evidenciaram a presença de vomilenina ou quantidades apreciáveis de qualquer outra substância. A adição de triptofano, diferentemente do observado em *C. roseus* (SCOTT *et al.*, 1980; MÉRILLON *et al.*, 1986; FACCHINI e DiCOSMO, 1991) não resultou em acúmulo de triptamina. Estas observações poderiam sugerir que a enzima triptofano descarboxilase (TDC) atuasse como fator limitante na produção de alcalóides nas culturas de *R. sellowii*. Entretanto, a adição de triptamina também não levou ao aumento na produção de alcalóides, apesar de ser completamente absorvida pelas células (Figura 19). Estes resultados sugerem que a TDC não tenha função reguladora ou não seja a única enzima limitante desta via biossintética.

Figura 18. Cromatogramas das frações de alcalóides da cultura controle e dos alcalóides vomilenina e triptamina

Em *R. serpentina*, demonstrou-se que a produção de raucafricina é afetada pela disponibilidade de triptofano no meio de cultura (SCHÜBEL *et al.*, 1989). Contudo, a disponibilidade deste precursor não induziu a produção de alcalóides em *C. roseus*. Em outros ensaios com a mesma

espécie, a adição de triptofano mostrou-se irrelevante (KARGI e GANAPATHI, 1991) ou foi capaz de aumentar (ZENK *et al.*, 1977) ou reduzir (KNOBLOCH e BERLIN, 1980) a produção de alcalóides. Em outros ensaios obteve-se apenas o aumento de produção de triptamina, sem influência na produção de outros alcalóides (MÉRILLON *et al.*, 1986; FACCHINI e DiCOSMO, 1991). Uma possível explicação para essa diversidade de respostas à adição desses precursores pode estar no estágio de desenvolvimento da célula, por ocasião da oferta do precursor. A adição de triptofano em culturas de *C. roseus* na fase de crescimento exponencial levou a resultados completamente diversos daqueles observados para a fase estacionária, na qual foi constatado um aumento expressivo na produção de alcalóides (MORGAN e SHANKS, 2000). A supressão da síntese de vomilenina nos ensaios com *R. sellowii* confirma a dificuldade da generalização das conclusões obtidas a partir dos estudos com outras espécies, ainda que pertencentes à mesma família ou ao mesmo gênero.

Figura 19. Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas suplementadas com triptofano (15,3 mg/L) ou triptamina (15,3 mg/L)

4.3.2. Adição de eliciador

A adição de extrato de levedura como agente eliciador na metade do ciclo de crescimento das culturas de *R. sellowii* não causou aumento da produção de vomilenina. De fato, este alcalóide foi completamente suprimido tanto das células como do meio de cultura (FIGURA 20). Paralelamente ao desaparecimento da vomilenina, duas outras substâncias desconhecidas tiveram suas produções intensamente induzidas nas células. O processo de estresse também não causou aumento no acúmulo de triptamina nas células ou no meio de cultura (FIGURA 20). Em culturas de *C. roseus* a atividade da TDC foi fortemente induzida pela adição de eliciadores bióticos (SEITZ *et al.*, 1989; MORENO *et al.*, 1996)

Figura 20. Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas expostas ao agente estressante extrato de levedura (201,0 mg/L)

4.3.3. Modificação da composição do meio de cultura

4.3.3.1. Supressão de auxinas

A modificação da composição do meio de cultura é uma das abordagens mais utilizadas com o objetivo de aumentar a produção de alcalóides em culturas de células em suspensão (VERPOORTE *et al.* 1998). O cultivo de *R. sellowii* na ausência de auxinas foi, dentre os fatores testados, a modificação que possibilitou a maior produção de alcalóides (Tabela 9). A ausência de auxinas também suprimiu a produção de

vomilenina e induziu o acúmulo de substâncias desconhecidas. A produção de triptamina também não foi observada neste tratamento (Figura 21).

Figura 21. Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas mantidas sem auxinas

Em culturas de *R. serpentina*, a produção de alcalóides foi bastante dependente da presença de hormônios (KAUKHOVA *et al.*, 1981). A auxina 2,4-D é freqüentemente empregada nos cultivos *in vitro* devido à eficiência na indução e na multiplicação de calos. Entretanto, sua presença mostrou-se inibidora da produção de ajmalicina, em culturas de *R. serpentina*, enquanto a cinetina mostrou-se necessária (OTHA e YATAZAWA, 1979; KNOBLOCH *et al.*, 1982). A simples transferência de células de *R. serpentina* para meio desprovido de 2,4-D aumentou seis vezes a produção de ajmalicina e serpentina (MORRIS, 1986).

4.3.3.2. Aumento da concentração de sacarose

O aumento da concentração de sacarose resultou em pequena diminuição da massa fresca e grande aumento da massa seca das células, sugerindo maior freqüência de divisão celular e/ou indução do acúmulo de amido (SCHLATMANN *et al.*, 1997). Os rendimentos em alcalóides totais foram inferiores ao observado para as culturas controle. O aumento da concentração do açúcar também diminuiu o transporte de alcalóides para o meio de cultura. (Tabela 8 e 9). Este procedimento suprimiu a produção de vomilenina e induziu o acúmulo de substâncias desconhecidas, possivelmente

as mesmas observadas com o eliciador biótico. A produção de triptamina também não foi observada neste tratamento (Figura 22). Em *C. roseus*, o aumento da concentração de açúcar aumentou a produção de triptamina (SCHLATMANN *et al.* 1992).

Figura 22. Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas mantidas em meio com concentração de sacarose aumentada (120 g/L)

O aumento da concentração de sacarose nos meios de cultura frequentemente levou a resultados conflitantes quanto ao aumento da biomassa e à produção de alcalóides (SCRAGG *et al.*, 1987; SMITH *et al.*, 1987; SEVON *et al.*, 1992). KUNAKH e ALKHIMOVA (1989) constataram o aumento de massa seca e a redução na produção de alcalóides, enquanto SCHÜBEL *et al.* (1989) observaram o aumento de ambos.

O desaparecimento da vomilenina das células de *R. sellowii* cultivadas sob concentração aumentada de sacarose pode estar relacionado à inibição da enzima raucafricina-O- β -D-glucosidase. Em *Rauvolfia spp*, a enzima atua na conversão da raucafricina (vomilenina- β -D-glicopiranosídeo) em vomilenina, por remoção de resíduo de glicose. Sua atividade poderia ser reduzida devido ao aumento da concentração intracelular de glicose, como sugerem os ensaios de inibição, *in vitro*, da enzima (SCHÜBEL e STÖCKIGT, 1986). Conseqüentemente, a biossíntese da vomilenina seria suprimida e, simultaneamente, haveria o acúmulo dos intermediários da rota biossintética. SCHÜBEL *et al.* (1989) demonstraram a possibilidade de aumento da produção de raucafricina através do controle da concentração e

do tipo de açúcar utilizado na cultura. A sacarose possibilitou rendimento de raucafricina maior do que o obtido com glicose ou galactose, com concentração ótima entre 100 g/L e 150 g/L.

4.3.3.3. Aumento da concentração de mio-inositol

A adição de mio-inositol também resultou em apreciável aumento no acúmulo de biomassa (Tabela 8). O rendimento dos alcalóides totais na biomassa foi comparável ao do controle (Tabela 9). Contudo, a análise cromatográfica dos alcalóides demonstrou a supressão da vomilenina e o acúmulo de pelo menos duas substâncias desconhecidas nas células (Figura 23). O transporte de alcalóides para o meio foi comparável aos dos tratamentos anteriores, sendo menor do que o encontrado nas culturas de controle (Tabela 9). Em outros experimentos com *R. serpentina*, SCHÜBEL *et al.* (1989) foram capazes de promover uma leve modulação na produção de raucafricina pela variação da concentração de mio-inositol, sendo a concentração ideal igual à empregada neste experimento com *R. sellowii*.

O mio-inositol é um elemento importante na modulação do crescimento de culturas de células de várias espécies vegetais. É provável que o mio-inositol adicionado à cultura de células seja convertido em fosfatidilinositóis e incorporado às membranas celulares. Assim, juntamente com outros inositol-fosfatos, induziriam o aumento da concentração de Ca^{2+} e, conseqüentemente, a ativação de calmodulinas e quinases envolvidas na ativação de enzimas reguladoras (ENDRESS, 1994; GASPAR *et al.*, 1996).

Figura 23. Cromatogramas das frações de alcalóides das culturas mantidas em meio com concentração de mio-inositol aumentada (600 mg/L)

5. CONCLUSÃO

O perfil da curva de crescimento obtido para a cultura em suspensão de células de *Rauvolfia sellowii*, caracterizado pelo acúmulo de massa fresca e seca, foi compatível com aqueles descritos para outras espécies da família Apocynaceae (SCHULTE *et al.*, 2000). A cultura atingiu a fase estacionária 14 dias após o inóculo, com o pH variando menos de uma unidade ao longo de todo o período de crescimento da cultura.

Demonstrou-se que, diferentemente do que ocorre em outras espécies vegetais, as células em suspensão de *R. sellowii* captam a sacarose preferencialmente à frutose e à glicose (LUTHERBACH E STÖCKIGT, 1994; COSTANTIN, 2001), sugerindo baixa atividade da enzima invertase.

A máxima produção de alcalóides foi observada no início da fase estacionária (dias 12 e 14). A cultura de células de *R. sellowii*, em nosso laboratório, apresentou produtividade (0,016%, na biomassa) inferior à originalmente obtida por RECH *et al.* (1998) (1,28%, na biomassa). O alcalóide majoritariamente produzido e acumulado nas células foi caracterizado como vomilenina. As reduzidas massas das frações de alcalóides provenientes de amostras do meio de cultura sugerem reduzido transporte de alcalóides para este compartimento.

Todas as tentativas de modulação da produção de alcalóides testadas (supressão de auxinas, aumento das concentrações de sacarose e mio-inositol, a adição dos precursores triptofano e triptamina, e estresse biótico) provocaram a supressão da biossíntese de vomilenina. Entretanto, na maioria dos casos foi observada uma alteração no perfil cromatográfico do extrato de alcalóides. O surgimento de outras substâncias e o desaparecimento da vomilenina poderiam evidenciar alterações nas rotas biossintéticas envolvidas e/ou acúmulo de possíveis intermediários deste alcalóide. O isolamento e a identificação dessas substâncias são

necessários para estabelecer uma correlação com a biossíntese da vomilenina.

Ainda que a enzima triptofano descarboxilase (TDC) seja extremamente importante na biossíntese de alcalóides indólicos monoterpênicos, as adições de triptofano e triptamina não evidenciaram seu envolvimento como fator limitante na produção dos alcalóides em *R. sellowii*.

Até o momento, todas as tentativas de induzir a formação da vomilenina na cultura de células de *R. sellowii* não foram bem-sucedidas. Faz-se necessária a avaliação de outros fatores, como a eliminação total dos reguladores de crescimento, a exposição à luz ultravioleta e a adição de jasmonato, loganina e secologanina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERTS, R.J., VERPOORTE, R. The influence of tryptophan and tryptamine feeding and light on alkaloid biosynthesis in *Cinchona* seedlings. *Planta Med.* v.58, p.150-152.1992.
- ASADA, M., SHULER, M.L. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption *in situ*, elicitors and alginate immobilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol* v.30, p.475-481, 1989.
- BACKER-ROYER, C. de, VANNEREAU, A., DURET, S., VILLAVIGNES, R., COSSNON, L. Action de métaux lourds Cu et Cd sur des cellules de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*: adaptation et production alcaloïdique. *Les Colloq de l'NRA* v.51, p. 247-251, 1990.
- Barz, W. (1975) Abbau von Aromastoffen und heterozyklischen Pflanzeninhaltsstoffen durch Zellsuspensionskulturen, *Planta Med Suppl.* Thieme Verlag, Stuttgart, p.128. *Apud*: ENDRESS, R. **Plant Cell Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.62-63.
- BATISTA, C.V.F., SCHRIPEMA, J., VERPOORTE, R., RECH, S.B., HENRIQUES, A.T. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. *Phytochemistry*, v.41,n.3, p.969-973. 1996.
- BELEM-PINHEIRO, M.L., ROCHA, A.F.I., LECLERCQ, J.Q., WAUTERS, J.N., ANGENOT, L. Alkaloids of *Rauwolfia sellowii* from amazonia. *J. Pharm. Belg.*, v.43, n.5, p.379-381, 1988.
- COSTANTIN, M.B. Metabolismo secundário de tecidos diferenciados e suspensões celulares de *Piper cernuum* Vell. São Paulo, 2001. 130p. (Tese de Doutorado – Instituto de Química – USP).
- DECENDIT, A., LIU, D., OUELHAZI, L., DOIREAU, P., MÉRILLON, J.M., RIDEAU, M. Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures: the factor affecting the cytokinin response. *Plant Cell Rep* v.11, p.400-403, 1992.
- ENDRESS, R. **Plant Cell Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1994, 353p.
- ENDRESS, M.E., BRUYNS, P.V. A revised classification of the *Apocynaceae* S.L. *The Botanical Review* v.66, n.1, p.1-56, 2000.

- FACCHINI, P.J., DiCOSMOS, F. Secondary metabolite biosynthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don immobilized by adhesion to glass fibers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.35, p.382-393, 1991.
- FARNSWORTH, N. R., PILEWSKI, N.A., DRAUS, F. J. Studies on false-positive alkaloids reactions with Dragendorff's reagent. *Lloydia*, v. 25, p. 312-319, 1962.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, v.50, p.151-158, 1968.
- GANAPATHI, G., KARGI, F. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). *J. Exp. Bot.* v.41, p.259-267, 1990.
- GASPAR, T., KEVERS, C., PENEL, C., GREPPIN, H., REID, D.M., THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, v. 32, p. 272-289, 1996.
- Hartmann, T; 1991. Alkaloids. In G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds., *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*, Second edition, Volume I: The chemical participants, pp. 70-121. Academic Press, San Diego. *Apud* MEIJER, A.H., VERPOORTE, R., HOGE, J.H.C. Regulation of Enzymes and Genes Involved in Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Research sp. iss.* v.3, p. 145-164, 1993.
- HEIJDEN, R., VERPOORTE, R., HARKES, P.A.A. *Tabernaemontana* spp.: in vitro production of indole and biogenetically related alkaloids. In BAJAJ, Y.P.S. (ed), **Biotechnology in agriculture and forestry 7: medicinal and aromatic plants II**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. cap. 28, p. 506-523.
- KARGI, F., GANAPATHI, B. Effects of precursor stimulating agents on formation of indole alkaloids by *C. roseus* in a biofilm reactor. *Enzyme Microb. Technol.* v.13, p.643-647, 1991.
- KAUKHOVA, I.E., VOLLOSOVICH, A.G., TSIGANOV, V.A. Nutrient medium selection for submerged culturing of *Rauwolfia serpentina* Benth. tissues. *Rast Resur.*, v.17, p.217-224, 1981.
- KISAKÜREK, M.V., HESSE, M. Chemotaxonomic studies of the *Apocynaceae*, *Loganiaceae* and *Rubiaceae*, with reference to indole alkaloids. In: PHILLIPSON, J.D., ZENK, M.H. (eds) **Indole and Biogenetically Related Alkaloids**. London; New York; Toronto; Sydney; San Francisco: Academic Press, 1980, 379p.

- KNOBLOCH, K.H., BERLIN, J. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Z. Naturforsch.*, v.35c, p.551-556, 1980.
- KNOBLOCH, K.H., BAST, G., BERLIN, J. Medium and light induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* v. 21, p. 591-594, 1982.
- KODJA, J.P., LIU, D., MÉRILLON, J.M., ANDREAU, F., RIDEAU, M., CHÉNIEUX, J.C. Stimulation par les cytokinines de l'accumulation d'alcaloïdes indoliques dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* G.Don. *C R Acad Sci Par Sér III* v.309, p.453-458, 1989.
- KUNAKH, V.A., ALKHIMOVA, E.G. *Rauwolfia serpentina*: *In vitro* culture and the production of ajmaline. In BAJAJ, Y.P.S. (ed), *Biotechnology in agriculture and forestry 7: medicinal and aromatica plants II*. Berlin: Springer-Verlag, 1989. cap. 22, p. 398-416.
- LEE, S.L., REPORTER, M., HSU, S.N., CORBIN, J.L., LULI, G., BURKHUSE, P.L. LICHTFIELD, J.H. The lipid composition and conversion of tryptamine to Nb-acetyltryptamine in a *Catharanthus roseus* cell line without indole alkaloids. *J. Indust. Microbiol.* v. 3, p.293-297, 1988
- LE MEN, J., TAYLOR, W.I. A uniform numbering system for indole alkaloids. *Experientia*, v.21, p.508-510, 1965.
- LIBOT, F., KUNESCH, N., POISOON, J. Structure complete de la raucaffrinoline et filiation avec la vomilenine. *Phytochemistry*, v.19, p. 989-991, 1980.
- LOPES, S.O., MORENO, P.R.H., HENRIQUES, A.T. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. *Enz. Microbial. Technol.*, v.26, p.259-264, 2000.
- LOUNASMAA, M., GALAMBOS, J. Indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. In: Herz W, Grisebach H, Kirby GW, Tamm Ch (Eds) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Wien-New York: Springer-Verlag, 1989. v.55, p.89-114.
- LUTTERBACH, R., STÖCKIGT, J. *In vivo* investigation of plant-cell metabolism by means of natural abundance ¹³C-NMR spectroscopy. *Helvetica Chimica Acta*, v.77, p.2153-2161, 1994.
- MÉRILLON, J.M., DOIREAU, P., GUILLOT, A., CHÉNIEUX, J.C., RIDEAU, M. Indole alkaloid accumulation and tryptophan decarboxylase activity in *Catharanthus roseus* cells cultured in three different media. *Plant Cell Rep.* v.5, p.23-26, 1986.

- MORENO, P.R.H., SCHLATMANN, J.E., HEIJDEN, R., GULIK, W.M. HOOPEN, H.J.G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J.J. Induction of ajmalicine formation and related enzyme activities in *Catharanthus roseus*: effect of inoculum density. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 39, p; 42-47, 1993.
- MORENO, P.R.H. Influence of stress factors on the secondary metabolism in suspension cultured *Catharanthus roseus* cell. Leiden: Leiden University Leiden: Leiden University, 1994. 155p. (Ph.D. Thesis).
- MORENO, P.R.H., POULSEN, C., HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures. *Enzyme Microb Technol.*, v.18, p.99-107, 1996.
- MORGAN, J.A., SHANKS, J.V. Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *J. Biotechnol.*, v.79, p. 137-145, 2000.
- MORRIS, P. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus* – comparison of production media. *Planta Med.* v.52, p. 121-126, 1986.
- MÜLLER, J., SCHLITTLER, E., BEIN, H.J., Reserpin, der sedative Wirkstoff aus *Rauwolfia serpentina* Benth. *Experientia*, v.8, p.338, 1952.
- NAUDASCHER, R., DOIREAU, P., GUILLOT, A., THIERSAULT, M. Time-course on the use of loganin by *Catharanthus roseus* cell cultures *in vitro*. *J. Plant Physiol.* v.135, p. 366-368, 1989.
- NAUDASCHER, R., DOIREAU, P., THIERSAULT, M., GUILLOT, A., MÉRILLON, J.M., CHÉNIEUX, J.C. Influence de la disponibilité em précurseurs sur l'accumulation alcaloïdique dans les cellules de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*. Comparaison entre suspensions em phase de croissance et suspensions em phase stationaire. *Les Colloq de l'NRA* v.51, p.307-309, 1990.
- NEF, C., RIO B., CHRESTIN, H. Induction of catharanthine synthesis and stimulin of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant Cell Rep.*, v.10, p.26-29, 1991.
- NEUMANN, D., KRAUS, G., HEIKE, M., GRÖGER, D. Indole alkaloid formation and storage in cell suspension cultures of *C. roseus*. *Planta Med.* v.48, p.20-23, 1983.

- OHTA, S., YATAZAWA, M. Growth and alkaloid production in callus, tissues of *Rauwolfia serpentina*. *Agric. Biol. Chem.* v.43, p.2297-2303, 1979.
- PAYNE, G.F., PAYNE, N.N., SHULER, M.L., ASADA, M. *In situ* adsorption for enhanced alkaloid production by *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Lett.* v.10, p.187-192, 1988.
- RECH, S.B., BATISTA, C.V.F., SCHRIPSEMA, J., VERPOORTE, R., HENRIQUES, A.T. Cell cultures of *Rauwolfia sellowii*: growth and alkaloid production. *Plant Cell Tiss Org Cult*, v.54, n.1, p.61-63, 1998.
- RIZZINI, C.T., MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2.ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda, 1995. p.91-92.
- ROJA, P.C., SIPAHIMALANI, A.T., HEBLE, M.R. CHADHA, M.S. Multiple shoot cultures of *Rauwolfia serpentina*: growth and alkaloid production. *J. Natural Products*, v. 50, n. 5, p. 872-875, 1987.
- SAMUELSSON, G., **Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy**. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press, 1992, 320p.
- SCHLATMANN, J.E., HOOPEN, H.J.G., HEIJNEN, J.J. Optimization of the medium composition for alkaloid production by *Catharanthus roseus* using statistical experimental designs. *Med Fac Landbouw Univ Gent* v.57, p.1567-1569, 1992.
- SCHLATMANN, J.E., MORENO, P.R.H., VINKE, J.L., HOOPEN, H.J.G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J.J. Gaseous metabolites and the ajmalicine production rate in high density cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Enzyme Microb Technol* , v. 20, p. 107-115, 1997.
- SCHRIPSEMA, J., VERPOORTE, R. Rapid identification of trace amounts of indole alkaloids: analysis of the aromatic pattern from the ¹H-NMR spectrum. In: RAHMAN, A. (ed) *Studies in Natural Products Chemistry*. Amsterdam: Elsevier. 1991. v. 9: structure and chemistry (part B), p. 163-199.
- SCHRIPSEMA, J., VERPOORTE, R., Search for factors related to the indole alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata*. *Planta Med.* v.58, p.245-249, 1992.
- SCHRIPSEMA, J., DAGNINO, D., GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., eds. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Santa Catarina: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina; Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. cap.31, p.689-716.

- SCHÜBEL, H., STÖCKIGT, J. Partial purification and characterization of raucaffricine β -D-glucosidase from plant cell-suspension cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Helvetica Chimica Acta*, v. 69, p. 538-547, 1986.
- SCHÜBEL, H., RUYTER, C.M., STÖCKIGT, J. Improved production of raucaffricine by cultivated *Rauwolfia* cells. *Phytochemistry*, v. 28, n. 2, p.491-494. 1989.
- SCHULTE, A.E., DURÁN, E.M.L., HEIJDEN, R., VERPOORTE, R., Mevalonate kinase activity in *Catharanthus roseus* plants and suspension cultured cell. *Plant Science*, v. 150, p. 59-69, 2000.
- SCOTT, A.I., MIZUKAMI, H., HIRATA, T., LEE, S.L. Formation of catharanthine, akuammicine and vindoline in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Phytochemistry*, v. 19, p.488-489. 1980.
- SCRAGG, A.H., ASHTON, S., YORK, A., STEPAN-SRKISSIAN, G., GREY, D. Growth of *Catharanthus roseus* suspension for maximum biomass and alkaloids accumulation. *Enzyme Microb. Technol.* v.12, p. 292-298, 1987.
- SEITZ, H.U., EILERT, U., De LUCA, V., KURZ, W.G.W., Elicitor-mediated induction of phenylalanine ammonia lyase and tryptophan decarboxylase: accumulation of phenols and indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* v.18, p. 71-78, 1989.
- SEVÓN, N., VARJONEN, T., HILTUNEN, R., CALDENTEY, M.O. Effect of sucrose, nitrogen, and copper on the growth and alkaloid production of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Planta Med.* v. 58, suppl. iss. 1, p. A609. 1992.
- SIDDIQUI, S., SIDDIQUI, R.H. v.9, 539 (1932). *Apud* STÖCKIGT, J. Biosynthesis in *Rauwolfia serpentina* - modern aspects of na old medicinal plant. In: CORDEL, G.A. ed. **The alkaloids: chemistry and pharmacology**. New York; London: Academic Press, 1993. v. 47, cap 2, p. 115-172.
- SMITH, J.L., QUESNEL, A.A., SMART N.J., MISAWA, M., Kurz, W.G.W. The development of single-stage growth and indole alkaloid production medium for *Catharanthus roseus* (L.) G Don suspension cultures. *Biotechnol Bioeng* v.9, p. 466-469, 1987.
- STÖCKIGT, J. Biosynthesis in *Rauwolfia serpentina*- modern aspects of na old medicinal plant. In: CORDEL, G.A. ed. **The alkaloids: chemistry and pharmacology**. New York; London: Academic Press, 1993. v. 47, cap 2, p. 115-172.

- TALLEVI, S.G., DiCOSMO, F. Stimulation of indole alkaloid content in vanadium-treated *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Planta Med.*, p. 149-152, 1988.
- VAN BEEK, T.A. Pharmacognostical studies of some *Tabernaemontana* species. Leiden: Leiden University, 1984. 161p.(Ph.D. Thesis).
- VERPOORTE, R. Methods for the structure elucidation of alkaloids, *J.Natural Products*, v. 49, n. 1, p. 1-25, 1986.
- VERPOORTE, R., HEIJDEN, R. Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. In: BROSSI, A. ed. **The alkaloids: chemistry and pharmacology**. New York; London: Academic Press; Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 1991. v. 40, cap 1, p. 1-187.
- VERPOORTE, R., HEIJDEN, R., MEMELINK, J., Plant biotechnology and the production of alkaloids: prospect of metabolic engineering. In: CORDEL, G.A. ed. **The alkaloids: chemistry and biology**. New York; London: Academic Press, 1998. v. 50, cap 12, p. 453-508.
- VERPOORTE, R., HEIJDEN, R., HOOPEN, H.J.G., MEMELINK, J. Metabolic engeneering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemical. *Biotechnol Letters*, v. 21, p. 467-479, 1999.
- ZENK, M.H., EI-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, D. Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspensions cultures of *Catharanthus roseus*. In: Barz W, Reinhard E, Zenk MH (eds) **Plant tissue culture and its biotechnological application**, 1977(pp 27-44). Springer-Verlag, Berlin.

7. Anexo

7.1. Curvas de calibração de frutose, glicose e sacarose para a caracterização da cultura de *R. sellowii*

Figura 24. Curva padrão para quantificação de frutose, glicose e sacarose