UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo das alterações da parede celular durante ativação de
mecanismos de defesa em *Momordica charantia* como fator de
produção de metabólitos secundários bioativos**

Vitor Francisco dos Santos

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo das alterações da parede celular durante ativação de
mecanismos de defesa em *Momordica charantia* como fator de
produção de metabólitos secundários bioativos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientado: Vitor Francisco dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação Biociências Aplicadas à Farmácia em 26/09/2014. A versão final se encontra
na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto /USP**

Ribeirão Preto

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santos, Vitor Francisco dos

Estudo das alterações da parede celular durante ativação de mecanismos de defesa em *Momordica charantia* como fator de produção de metabólitos secundários bioativos. Ribeirão Preto, 2014

145 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Uyemura, Sergio Akira

1. *Momordica charantia* L. 2. Metabólitos secundários. 3. Bioquímica de Carboidratos. 4. Ácido Salicílico. 5. Elicitor. 6. Resposta de Hipersensibilidade. 7. Triterpenos. 8. Química de Produtos Naturais e Sintéticos. 9. Parede celular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Francisco dos Santos

Estudo das alterações da parede celular durante ativação de mecanismos defesa em *Momordica charantia* como fator de produção de metabólitos secundários bioativos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências

Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pelo apoio concedido para a realização deste Trabalho.

Agradeço aos meus pais (Tiago dos Santos e Creuza dos Reis da Silva Santos) pelo apoio e encorajamento me dado durante todo o tempo.

Às minhas tias Lázara Maria da Silva, Cremilda Aparecida da Silva e Cléa Barbosa pelo apoio e incentivo me dado desde criança que, sem sombras de dúvidas, foram essenciais para que eu almejasse e alcançasse esta etapa.

À Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia por me introduzir no universo da pesquisa desde o ano de 2006, pela cumplicidade, companheirismo, por me orientar por todos estes anos em diversos projetos, de onde pude ter aprendizados que levarei comigo por toda vida e que foram essenciais e cruciais para o desenvolvimento deste Projeto de Mestrado. Meus eternos agradecimentos!

Ao Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura, por todos os momentos de atenção, conversas, conselhos e por sempre me dar aquele animo para sempre seguir em frente. Muitíssimo Obrigado!

À Prof^a Dr^a Hosana Maria Debonsi, que tenho grande admiração por ser um ser humano incrível e bondosa, pela grande ajuda e atenção dadas sempre, por abrir as portas de seu laboratório integralmente para mim e me (re) despertar o gosto pela química orgânica e análise orgânica, ferramentas essenciais e importantíssimas estas para o desenvolvimento deste Trabalho.

À Prof^a Dr^a Simone de Pádua Teixeira por ceder o Laboratório de Farmacobotânica para a realização dos experimentos envolvendo a preparação e inclusão do material celular e ao seu técnico Edimárcio pelo carisma e boa convivência durante todo este período.

Aos Profs. Drs. da Disciplina de Bioquímica: Carolina Aires (pelo carinho, atenção, pelas boas e produtivas conversas), Augusto César Cropanese Spadaro (pela admiração, carinho, excelentes conversas, humildade e exemplo de ser humano em que eu espelho e tenho como exemplo a seguir para toda minha vida), Yara Maria Lucisano Valim (pela admiração, carinho, pelo exemplo de vida me dado sempre e por nossas constantes e frequentes conversas onde sempre pudemos nos identificar ainda mais e compartilhar nossas visões do mundo), Carlos Curti (pela admiração e respeito), Luciana Alberici (pelo carinho, boas conversas, pelas parcerias já realizadas e pela admiração, tanto como professora/ pesquisadora e como pessoa).

À Profª Drª Maria de Lurdes Bianchi (minha querida Dilú) por toda atenção, carinho, ajuda e cumplicidade mútuos e quem eu muito admiro.

À Prof Drª Sonia Maria Vilella Bueno (EERP) por quem eu tenho grande admiração, respeito e carinho e que nos mostra a responsabilidade, desafios e principalmente o amor na formação docente e que todos os ensinamentos levarei comigo para toda eternidade. Sou grato todos os dias por tê-la presente em minha vida!

A querida Raquel da Silva Costa pela grande ajuda, humildade, meiguice e ensinamentos me passados em relação às técnicas de incorporação e inclusão do material e preparação do material celular.

Aos eternos amigos Roberta de Mello, José Franciraldo, Verônica Paviani, Wagner de Souza (Wagninho), Viviane Gumiero e Amanda Cavalheiro. Muito Obrigado pelos ensinamentos e pelo convívio incrível que sempre existiu entre nós no laboratório!

Ao querido Agnaldo Fernando Baldo da Silva. Por todo apoio dado em todos os momentos, seja no desenvolvimento e execução deste trabalho, seja por estar sempre ao meu lado para comemorar as conquistas e descobertas ou para me dar aquele ânimo e não me deixar desmotivado quando as nossas previsões/ expectativas não davam certo e pela ajuda incondicional sempre.

Ao Otávio Beraldi (Elvis/ Alfred), Eleonora Oliveira (Lê), Oscar Andres (Lazarento), Lucas Zavarize (Zava), João Paulo Cinegaglia (Jota), Juliano Condi (Lenda), Léo Fogaça, Matheus de Godoy Perim (Gordo) e Guilherme Victor (D. Flor) por dividir as angústias, felicidades, alegrias e por entenderem os meus constantes e frequentes momentos de reclusão resultantes das etapas de desenvolvimento deste trabalho. Vocês são muito importantes para mim. Um abraço do Zim!

Ao estimado Henrique Theodoro pela atenção dada sempre a todos nós pós-graduandos do Programa de Biociências Aplicadas À Farmácia e por sempre estar disposto e sempre de prontidão para a ajudar-nos.

Aos queridos amigos do laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (QOAM), Lorene Armostrong, Ezequiane Machado, Olivia Maciel, Gabriel Pavão, Rafael de Felício, Ana Paula e Ana Lígia, pelos frequentes momentos de diversão e pelos aprendizado e ensinamentos constantes, agradeço muito a todos!

A todos amigos do laboratório de Farmacobotânica pela atenção e ensinamentos passados.

À Ana Cristina Morseli Polizello por toda ajuda, conselhos, pelo carinho incondicional, onde, sempre que eu precisei, preciso e precisarei estive e estará sempre à disposição em nos ajudar e pelas boas conversas sempre divertidas e recheadas de boas risadas!

Ao Alcides Silva Pereira e toda sua família, pelo carinho incondicional me dado desde sempre, pelas conversas, conselhos, com quem sempre tive a liberdade de me desabafar e contar sobre meus anseios e vontades.

À Nadir Mazzucato e ao Rogerio Castania pela grande amizade, pelos momentos que só foram de alegria, boas conversas, risadas e bons conselhos.

À Ieda Razaboni Prado por todo o carinho, por sua surpreendente fonte de conhecimento sempre compartilhada e por sua essencial e crucial ajuda e força de vontade sem a qual nunca conseguiríamos “ressuscitar” o HPLC.

À Ana Elisa, nossa querida Aninha, pela atenção, ajuda, carinho e competência sempre mostrada para com todos.

À querida Denise Damasceno, por toda atenção dada, por todo o carinho, pela dedicação integral para com todos e por sempre estar disposta e de prontidão para nos ajudar.

A minha querida e estimada Angélica (Gelly) e sua família Sergio e Bela. Gelly, desde quando eu te conheci no ano de 2009 você tem sido uma pessoa muito especial e importante em minha vida. Deixo aqui registrado minha admiração e carinho. Muito Obrigado por tudo, pelos momentos de diversão e pelas alegrias. Como dizemos aqui na FCFRP: “ Quem tem Gelly, tem tudo e muito mais!”

Às queridíssimas Evanira Machado e Luzia de Paula Rêgo por todas as acolhidas, pelas belas receptividades e momentos de alegrias me dados todos os dias aqui na FCFRP.

Aos estimados Profs. Drs. Silvia Berg, Marcos Câmara de Castro, Eliana Sulpício e Carlos Sulpício, que sempre acompanharam e vivenciaram esta etapa de minha formação e pelo incentivo sempre dado.

À amizade gerada e mantida por todos estes anos: Lucineia Martins, Francine Souza, Tiago Araújo, André Estevão, Célia Meirelles, Cristiano Henrique, Waldir Ferverça e Luiz Aparecido. Muito Obrigado por tudo.

Aos estimados amigos Gisela Alves Romani, Maria Oliveira e João(zinho) Lourenço de Barros pelos momentos de alegria sempre existentes!

À Márcia Polillo, Gabrielle Polillo, Marcele Polillo, Gil Hefko (*in memorian*), Danilo Neves e Danilinho Neves, vocês são muito importantes para mim e sempre estiveram presentes em minha vida dando apoio e alegrias!

À Thereza Bento da Silva e Pedro Martin por toda consideração, admiração e carinho existente!

Aos estimados amigos Pós Graduandos do Laboratório de Bioquímica: Larissa Marchi, Andréa Figueiredo, Everton de Oliveira Lima dos Santos, Micássio Andrade, Ana Paula Brandi, Camila, Lamartine Melo, Amanda, Valéria, Bruno, Flávia, Felipe Zucolotto.

Ao amigo pós graduando Igor Sampaio e todos os demais amigos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia do Exercício sob responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira (Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto- EEERP) por toda ajuda, ensinamentos e apoio dado em relação às técnicas de Western Blott e testes biológicos

Aos queridas Amigas Estagiárias do Laboratório de Bioquímica Ângela Santos, Giulia Iossi, Mayara Almeida, Tatiane Vicentini e aos grandes Amigos Rodolfo da Silva Gomes e Renan Santanelli. Todos vocês são muito especiais para mim, onde ao mesmo tempo que compartilhamos os conhecimentos, aprendemos muito uns com os outros.

À minha velha e queridíssima Amiga Ingrid Pontes, por quem eu tenho grande admiração e estima, onde, desde todo o sempre podemos compartilhar nossos anseios, vontades, sonhos e realizações um com o outro. Você tem um futuro brilhante menina, e eu estarei lá, perto de você, para ver isso acontecer.

À minha estimadíssima amiga Luciana Ceribelli. Se você não está por perto algo está faltando, se você está presente alegrias, risadas e boas conversas é o que não falta. “Tem alguém aí? ” Muito Obrigado por tudo!

À querida e divertida amiga (como dizemos de infância) Regina Anquena por todos os momentos de diversão e pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Química Orgânica: Simone Cavalcante, Evelin, Paulinha Valim, Rafael Soldi, Dayana Rubio, Rodolfo, Carla Derigge, Fernanda e Rafela Marcucci e Adegmar Lage.

À técnica Daniela Ricardo Engracia Caluz pela extrema dedicação e atenção.

Ao Amigo Denner Knupp Bastos pela grande amizade.

Aos novos Amigos que conseqüentemente se tornaram presente desde o início desta etapa e que com toda certeza estaremos presentes até o resto de nossas vidas. Airton Junior, Leonardo Rodrigues, Thiago Bonardi e Rodrigo Fenner Bertani, MUITÍSSIMO Obrigado por tudo!

Ao Marcos Paulo da Silva e à Dalila Ferreira que em tão pouco tempo já fizeram toda a diferença e apareceram em minha vida neste finalzinho de etapa para me darem mais forças e seguir confiante até o final. MUITÍSSIMO Obrigado!

Caso tenha me esquecido de citar alguém, deixo aqui minhas desculpas e sintam(m)-se agradecido(s)/ homenageado(s) aqui!

The image shows a musical score for four voices (Soprano, Alto, Tenor, and Bass) in 4/4 time. The key signature has one sharp (F#). The lyrics are 'Peace, peace, peace I leave with you'. The score includes dynamic markings: *pp* (pianissimo) and *dolce* (sweetly) for the first two measures, and *p* (piano) for the last two measures. The lyrics are written below each staff, with the words 'Peace, peace, peace' on the first three measures and 'I leave with you' on the last two measures. The lyrics are repeated for each voice part.

pp dolce *p*
Peace, peace, peace I leave with you,
pp *p*
Peace, peace, peace I leave with you,
pp *p*
Peace, peace, I leave with you,
pp *p*
Peace, peace, I leave with you,

Peace, I leave with you

John 14, 27
Knut Nystedt

RESUMO

SANTOS, V. F. **Estudo das alterações da parede celular durante ativação de mecanismos de defesa em *Momordica charantia* como fator de produção de metabólitos secundários bioativos**. 2014. 119f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Momordica charantia é uma espécie de planta pertencente à família Cucurbitaceae. No Brasil, é conhecida pelo nome popular de Melão de São Caetano. É encontrada em grande parte do globo terrestre, sendo que no Brasil é observada nas regiões litorâneas e principalmente nas regiões do interior do país. Escolhemos o estudo com *Momordica charantia* devido suas propriedades terapêuticas conhecidas serem de grande interesse. Ela vem ganhando cada vez mais reconhecimento através de pesquisas científicas realizadas, visto que, já é utilizada a milhares de anos através da cultura popular. Tais pesquisas têm confirmado e entendido cada vez mais as propriedades medicamentosas desta planta e os mecanismos responsáveis por tais funções nesta espécie, sendo as propriedades antidiabéticas, antivirais e anticancerígenas as de maior destaque. Os experimentos realizados em torno da *Momordica charantia*, na busca destes compostos foram todos realizados utilizando extratos retirados dos próprios tecidos já diferenciados na planta adulta (sementes, folhas, raízes e frutos). Neste trabalho, foi realizado a pesquisa de metabólitos secundários produzidos pela cultura de células em suspensão de *Momordica charantia* durante a fase de crescimento desta e após a realização de ensaios de elicitação com Ácido Salicílico (AS). Nosso laboratório vem se dedicando aos estudos da composição da parede celular vegetal e suas alterações, bem como dos mecanismos de defesa empregados pelas células em suspensão em condições de estresse biótico e abiótico. O ácido salicílico é um dos hormônios vegetais envolvido em vários mecanismos de respostas que envolve o estresse vegetal e de desenvolvimento da planta tais como o de garantir resistência a patógenos por exemplo. Quando ocorre algum processo de infecção ou lesivo para a planta, ocorre um aumento na concentração de AS no interior da planta. Esse aumento leva a ativação de certas vias metabólicas que culminam na produção de metabólitos secundários e na degradação, fragmentação ou espessamento da parede celular. Como reposta dos ensaios de elicitação realizados podemos comprovar os efeitos do AS mediados na produção de metabólitos secundários que foram aumentados conforme a concentração de AS. Foi utilizado para os ensaios de elicitação AS nas concentrações de 0,5 , 1,0 e 5 mmol/L. Para o monitoramento da cultura e averiguação da efetividade dos ensaios de elicitação foi utilizado a monitoria através da dosagem de proteínas totais, compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais tanto liberados para o meio extracelular quanto produzidos no meio intracelular. Foi determinado as variações dos componentes da parede celular durante a fase de crescimento e após os ensaios de elicitação onde foi comprovado que quanto maior a concentração de AS, maiores são os fragmentos de açúcares fragmentados da parede celular. Foi evidenciado também a presença de triterpenos na cultura celular (em comparação com os padrões isolados da planta), tanto na fase de crescimento e também após a indução com os ensaios de elicitação com AS.

Palavras-chave: 1. *Momordica charantia* L. 2. Metabólitos secundários. 3. Bioquímica de Carboidratos. 4. Ácido Salicílico. 5. Elicitor. 6. Resposta de Hipersensibilidade. 7. Triterpenos. 8. Química de Produtos Naturais e Sintéticos 9. Parede celular

ABSTRACT

SANTOS, V. F. **Study of cell wall changes during activation of defense mechanisms in *Momordica charantia* as factor of production of bioactive secondary metabolites** 2014. 119F. Thesis (MS). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Momordica charantia is a plant from the Cucurbitaceae family. In Brazil, it is known by the popular name of Melão de São Caetano. It is found across the whole world, and in Brazil it can be found in coastal and interior regions of the country. The aim to study *Momordica charantia* is due to its known therapeutic properties that are already used for thousands of years through popular culture. The studies have confirmed and understood various drug-like properties of this plant and the mechanisms responsible for such functions in this species, such as antidiabetic, antiviral and anticancer properties. The researches with *Momordica charantia* were all performed using extracts obtained from seeds, leaves, roots and fruit. In this work, the isolation and characterization of metabolites as standards from leaves and stems of *Momordica charantia* was performed. The research of secondary metabolites produced in cell culture suspension of *Momordica charantia* without elicitor or after elicitation with salicylic acid (SA) was conducted. Salicylic acid is a plant hormone involved in various mechanisms of responses. When the plant suffers an infection or injury, it is followed by an increase in AS concentration. This increase leads to activation of certain metabolic pathways that culminate in the production of secondary metabolites and degradation, fragmentation or cell wall thickening. AS was utilized for the elicitation experiments at 0.5, 1.0 and 5 mmol/L. For the monitoring of plant cell culture, it was determinate the total protein, phenolic compounds and reducing sugars content, into the extra and intra cellular medium. Where it was verified that AS modulates the production of these molecules in culture. After this, we determined the variation in the oligosaccharides in the extracellular medium obtained in the presence or absence of AS. It was observed the degree of polymerization of oligosaccharides higher when increase AS concentration in the medium. In conclusion, this study can demonstrate the effects of SA on the production of secondary metabolites in plant cell culture, which were increased as the concentration of AS increased. The presence of triterpenes in cell culture was confirmed to compare the molecules obtained from culture with that isolated from plant standards.

Keywords: 1. *Momordica charantia* L. 2. Secondary metabolites. 3. Carbohydrate Biochemistry. 4. Salicylic acid. 5. Elicitor. 6. Hypersensitive Response. 7. Triterpenes. 8. Chemistry of Natural and Synthetic Products 9. Plant Cell Wall

RESUMEN

SANTOS, V.F. **Estudio de los cambios de la pared celular durante la activación de mecanismos de defensa en *Momordica charantia* como la producción de factor de metabolitos secundarios bioactivos.** 2014 119F. Tesis (MS). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Momordica charantia es una especie de planta perteneciente a la familia de las cucurbitáceas. En Brasil, es conocido por el nombre popular de Melon de São Caetano. Se encuentra en gran parte del mundo, y en Brasil se encuentra en regiones costeras y en especial en las regiones del interior del país. Hemos elegido para estudiar *Momordica charantia* debido a sus propiedades terapéuticas conocidas son de gran interés. Ella está ganando más reconocimiento a través de la investigación científica llevada a cabo desde el que ya se utiliza desde hace miles de años a través de la cultura popular. Estos estudios han confirmado y entendido más y más propiedades similares a los medicamentos de esta planta y los mecanismos responsables de dichas funciones en esta especie, con las propiedades antidiabético, antivirales y anticancerígenas los más prominentes. Los experimentos llevados a cabo alrededor de la *Momordica charantia* en busca de estos compuestos fueron realizados usando extractos tomados de los propios tejidos ya diferenciadas en la planta adulta (semillas, hojas, raíces y frutos). En este trabajo, se llevó a cabo la investigación de los metabolitos secundarios producidos por el cultivo de células en suspensión de *Momordica charantia* durante esta fase de crecimiento y después de probar elicitación con ácido salicílico (SA). Nuestro laboratorio se ha dedicado al estudio de la composición de la pared celular vegetal y sus modificaciones, así como los mecanismos de defensa utilizados por las células en suspensión bajo condiciones de estrés biótico y abiótico. El ácido salicílico es un hormonas vegetales implicados en diversos mecanismos de respuestas que implican desarrollo de la planta y estrés de la planta tales como para garantizar la resistencia a los patógenos, por ejemplo. Cuando se produce un proceso de infección o lesión a la planta, un incremento en la concentración de AS dentro de la planta se produce. Este aumento conduce a la activación de ciertas rutas metabólicas que culminan en la producción de metabolitos secundarios y la degradación, la fragmentación o engrosamiento de la pared celular. Como respuesta elicitación de las pruebas realizadas se demuestra los efectos de la producción de AS-mediada de metabolitos secundarios que se aumentó a medida que la concentración de AS. Fue utilizado para probar la obtención AS a concentraciones de 0,5, 1,0 y 5 mmol / L. Para la monitorización de la cultura y la investigación de la eficacia de la vigilancia de elicitación pruebas fue utilizado por la dosis de proteína total, compuestos fenólicos totales y azúcares reductores totales tanto libera en el medio extracelular como la producida intracelularmente. Las variaciones de los componentes de la pared celular durante la fase de crecimiento y después de los ensayos de educación donde se comprobó que cuanto mayor es la concentración de AS, el más grande de los fragmentos de los azúcares de la pared celular fragmentados se determinaron. La presencia de triterpenos en cultivo celular (comparado con los estándares de plantas aislados), tanto en la fase de crecimiento y también después de los ensayos de inducción de elicitación con AS también se demostró.

Palabras clave: 1. *Momordica charantia* L. 2. Metabolitos Secundarios. 3 Bioquímica de los Carbohidratos. 4. Ácido salicílico. 5. Elicitor. 6 Respuesta de Hipersensibilidad. 7. Triterpenos. 8. Química de Productos Naturales y Sintéticos 9. Pared celulares.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos de <i>Momordica charantia</i> a) Fruto em processo de maturação b) Fruto maduro.....	01
Figura 2: Via de biossíntese de esteróis e triterpenos.....	04
Figura 3. Estrutura de compostos glicosídicos isolados a partir da fração butanólica particionada da fração metanólica das folhas de <i>Momordica charantia</i> que possuem propriedades anticancerígenas contra melanoma.....	06
Figura 4. Estrutura de triterpenóides isolados a partir da planta <i>Momordica</i> <i>charantia</i> com propriedades antidiabéticas, antivirais e antitumorais.....	09
Figura 5. Estrutura de triterpenos e açúcares isolados a partir do extrato metanólico obtido da espécie <i>Momordica charantia</i>	10
Figura 6. Esquema de alguns aspectos da arquitetura, regulação hormonal e compreensão da parede celular vegetal.....	15
Figura 7. Representação Molecular do ácido salicílico.....	18
Figura 8. Esquema do processo de extração dos metabólitos secundários presentes na planta <i>Momordica charantia</i>	32
Figura 9. Esquema do processo de extração dos metabólitos secundários presentes na cultura celular de <i>Momordica charantia</i>	33
Figura 10. Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular, sem a utilização de elicitor, na cultura celular de <i>Momordica</i> <i>charantia</i> durante 30 dias.....	40
Figura 11. Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L, em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	41
Figura 12. Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L, em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	42

Figura 13. Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L, em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	43
Figura 14. Comparação dos resultados da quantificação de proteínas totais produzidas no meio intracelular com as diferentes concentrações de AS.....	44
Figura 12. Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L, em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	42
 Figura 13. Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L, em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	 43
Figura 14. Comparação dos resultados da quantificação de proteínas totais produzidas no meio intracelular com as diferentes concentrações de AS.....	44
Figura 15. Variação da concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular, sem utilização de elicitor, na cultura de células de <i>Momordica charantia</i> durante 30 dias.....	46
Figura 16. Variação da concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	47
Figura 17. Variação da concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	48
Figura 18. Variação da concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	49
Figura 19. Comparação dos resultados da quantificação de proteínas totais liberadas para o meio extracelular avaliando todos os ensaios de elicitação.....	50

Figura 20. Variação da concentração de Açúcares redutores Totais presentes na fração intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L de AS em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	52
Figura 21. Variação da concentração de açúcares redutores totais presentes na fração intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L de AS em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	53
Figura 22. Variação da concentração de açúcares redutores totais presentes na fração intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L de AS em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	54
Figura 23. Comparação dos resultados da quantificação de açúcares redutores totais produzidos no meio intracelular entre todos os ensaios de elicitação.....	55
Figura 24. Comparação dos valores médios obtidos dos testes de elicitação com as na quantificação de açúcares redutores totais na fração intracelular.....	56
Figura 25. Variação da concentração de Açúcares Redutores Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L de AS em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	57
Figura 26. Variação da concentração de açúcares redutores totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L de AS em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	58
Figura 27. Variação da concentração de Açúcares Redutores Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	59
Figura 28. Comparação dos valores médios obtidos dos testes de elicitação com as na quantificação de açúcares redutores totais liberados para a fração extracelular.....	61
Figura 29. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais produzidos no meio intracelular durante a fase de desenvolvimento da cultura de <i>Momordica charantia</i>	63
Figura 30. Quantificação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	64

Figura 31. Quantificação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	65
Figura 32. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais produzidos no meio intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L mediado em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	66
Figura 33. Comparação dos resultados da quantificação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular entre todos os ensaios de elicitação.....	67
Figura 34. Quantificação de compostos fenólicos totais liberados para o meio extracelular no experimento controle da cultura celular de <i>Momordica charantia</i> ..	68
Figura 35. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L mediado em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	69
Figura 36. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1 mmol/L mediado em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	70
Figura 37. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L mediado em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	71
Figura 38. Comparação dos resultados da quantificação de compostos fenólicos totais liberados para o meio extracelular entre todos os ensaios de elicitação.....	72
Figura 39. Comparação dos valores médios obtidos dos testes de elicitação com as na quantificação de compostos fenólicos totais produzidos na fração intracelular.....	74
Figura 40. Comparação dos valores médios obtidos dos testes de elicitação com as na quantificação de compostos fenólicos totais liberados para a fração extracelular.....	75

Figura 41. Cromatografia em papel das frações liberadas para o meio extracelular em cultura de <i>Momordica charantia</i> durante a fase de desenvolvimento da cultura celular. Revelação com Nitrato de Prata Alcalino.....	80
Figura 42. Cromatografia em papel das frações liberadas para o meio extracelular em cultura de <i>Momordica charantia</i> quando elicitadas com AS na concentração de 0,5 mmol/L.....	81
Figura 43. Cromatografia em papel das frações liberadas para o meio extracelular em cultura de <i>Momordica charantia</i> quando elicitadas com AS na concentração de 1,0 mmol/L.....	82
Figura 44. Cromatografia em papel das frações liberadas para o meio extracelular em cultura de <i>Momordica charantia</i> quando elicitadas com AS na concentração de 5,0 mmol/L	83
Figura 45. Efeito do AS na indução da produção de metabólitos secundários em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio MS.....	23
Tabela 2. Gradiente de polaridade crescente utilizado na CLV para particionamento do extrato metanólico obtido na extração das folhas e caules de <i>Momordica charantia</i>	30
Tabela 3. Avaliação por HPLC dos padrões de açúcares utilizados para a determinação dos fragmentos da parede celular liberados para o meio extracelular mediante os ensaios de elicitação utilizando o AS.....	34
Tabela 4. Avaliação por HPLC dos padrões de açúcares utilizados para a determinação dos fragmentos da parede celular liberados para o meio extracelular mediante os ensaios de elicitação utilizando o AS.....	76
Tabela 5. Percentagem relativa dos fragmentos da parede celular liberados em testes de elicitação utilizando o AS nas concentrações de 0,5 mmol/L e 1,0 mmol/L.....	77
Tabela 6. Percentagem relativa dos fragmentos da parede celular liberados em testes de elicitação utilizando o AS nas concentrações de 5 mmol/L.....	78
Tabela 7. Massas obtidas a partir das frações resultantes da CLV.....	84
Tabela 8. Massas obtidas após análise preparativa em HPLC da fração E obtida em CLV.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
BSA	Soro albumina bovina
BuOH	Butanol
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
MeOH	Metanol
UV	Ultravioleta
XXXGol	Heptassacarídeo Reduzido de Xiloglucana

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO

1) <i>Momordica charantia</i> L.	1
1.1) Triterpenos.....	2
1.2) Propriedades anticancerígenas Relatadas na Espécie <i>Momordica charantia</i>	5
1.3) Propriedades antivirais atribuídas à espécie <i>Momordica charantia</i>	6
1.4) Propriedades hipoglicemiantes dos metabólitos isolados a partir da espécie <i>Momordica charantia</i>	7
2) Diabetes Mellitus.....	11
3) Cultura de células vegetais, produção de metabólitos secundários e biofármacos.....	12
4) Parede celular vegetal.....	14
5) Elicitores.....	16
5.1) Ácido salicílico.....	18

2- OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral.....	20
2.2) Objetivos específicos.....	20

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Equipamentos.....	21
3.2.1) Reagentes.....	22
3.2.2) Solventes.....	22
3.3) Softwares.....	22

3.4) Realização dos experimentos.....	22
3.5) Cultura celular de <i>Momordica charantia</i>	23
3.6) Contagem e viabilidade celular.....	24
3.7) Ensaio de elicitação.....	24
3.8.1) Isolamento da parede celular e meio intracelular (MI)	25
3.8.2) Isolamento da parede Celular e fração intracelular (FI).....	26
3.9) Dosagem dos componentes presentes na fração intracelular e dos componentes liberados para o meio extracelular durante ensaios de elicitação com AS.	25
3.9.1) Quantificação de proteínas totais presente nas frações extra e intracelulares em cultura de células de <i>Momordica charantia</i> durante ensaios de elicitação AS.....	26
3.9.2) Quantificação de açúcares redutores presente nas frações extra e intracelulares em cultura de células de <i>Momordica charantia</i> durante ensaios de elicitação com AS.....	27
3.9.3) Quantificação dos compostos fenólicos presente nas frações extra e intracelulares em cultura de células de <i>Momordica charantia</i> durante ensaios de elicitação AS.....	28
3.10) Isolamento, determinação e caracterização dos metabólitos secundários presentes na planta <i>Momordica charantia</i> para a obtenção de padrões.....	28
3.11) Extração e obtenção de metabólitos provenientes da cultura celular de <i>Momordica charantia</i>	33
3.12) Determinação das variações dos componentes da parede celular da cultura de células de <i>Momordica charantia</i> quando elicitadas com AS.....	34
3.12.1) Determinação das variações dos componentes da parede celular da cultura de células de <i>Momordica charantia</i> quando elicitadas com AS por cromatografia em papel.....	35
3.14) Condições de isolamento dos metabólitos secundários obtidos na planta <i>Momordica charantia</i> e na cultura de células.....	35
3.15) Identificação e Elucidação Estrutural dos Metabólitos Isolados	36
3.16) Hidrólise ácida e identificação dos açúcares para a análise dos triterpenos presentes na espécie de planta <i>Momordica charantia</i>	36

3.17) Acetilação de Wolfrom e Thompson.....	37
---	----

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Padronização das condições experimentais utilizando células de <i>Momordica charantia</i>	38
4.1.1) Avaliação do efeito do AS sobre as proteínas totais.....	38
4.1.2) Efeito do AS sobre o Teor de açúcares redutores.....	51
4.1.3) Efeito do AS sobre o Teor de compostos fenólicos totais.....	62
4.2) Determinação das variações dos componentes da parede celular da cultura de células de <i>Momordica charantia</i> quando elicitadas com AS.....	75
4.3) Determinação das variações dos componentes da parede celular da cultura de células de <i>Momordica charantia</i> quando elicitadas com AS por cromatografia em papel.....	79
4.4) Obtenção e caracterização dos padrões de metabólitos secundários.....	83
4.5) Moléculas obtidas e propostas a partir dos padrões obtidos das folhas de <i>Momordica charantia</i> (Frações B ₃ e E ₁₋₇)	87
4.6) Efeito do AS mediado na produção de metabólitos secundários em cultura de células de <i>Momordica charantia</i>	91
5- CONCLUSÕES	92
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
7- ANEXOS	110

1- INTRODUÇÃO

1) *Momordica charantia* L.

A *Momordica charantia* é uma espécie de planta pertencente à família Cucurbitaceae. No Brasil, é conhecida pelo nome popular de Melão de São Caetano devido ao fato de ter sido introduzida no País por escravos que vieram da África e se estabeleceram na região de Mariana no estado de Minas Gerais, onde as plantas foram cultivadas ao redor da capela de São Caetano (NEGRI, 2005). Atualmente é encontrada em grande parte do globo terrestre, sendo que no Brasil é facilmente observada nas regiões litorâneas e principalmente nas regiões do interior (FANG et al., 2011).

É uma planta que cresce sobre algum suporte (cercas, muros ou outras plantas) onde cada vinha (ramo) possui cerca de cinco metros e suas folhas que apresentam de três até sete lobos se distanciam entre si de 4 até 12 centímetros. Cada planta apresenta flores macho e fêmeas separadas. Os frutos (**Figuras 1 a e b**) possuem uma verruga exterior distinta e uma forma oblonga. Estes são ocos na secção transversal, com uma camada relativamente fina em torno de uma cavidade central preenchido com sementes grandes. Quando o fruto está completamente maduro, ele fica laranja e mole, e se divide em segmentos que enrolam para trás dramaticamente para expor as sementes cobertas revestidas por uma camada de pectina vermelho brilhante (TROPICAL PLANT DATABASE, acessado dia 18/05/2014).

Figura 1: Frutos de *Momordica charantia* a) Fruto em processo de maturação; b) Fruto maduro (Fotos: Vitor Francisco dos Santos 07/2012)

A espécie *Momordica charantia* é utilizada comumente como ingrediente culinário em alguns países, principalmente na Ásia (SINGH, 2011). Porém, ela é conhecida mundialmente como planta medicinal, sendo utilizada no tratamento de diversas desordens como: laxativo, anti-helmíntico, cálculos renais, adjuvante no tratamento anti-hiperglicêmico (FANG et al., 2007; AGARWAL e KAMAL, 2003; AGARWAL e KAMAL, 2004; YAO et al., 2011).

Na revisão da literatura observa-se que três propriedades são amplamente descritas e estudadas na espécie *Momordica charantia*: propriedade hipoglicemiante (a maioria), antiviral e anticancerígena. Esses efeitos são atribuídos, principalmente, a uma classe de metabólitos secundários que são os triterpenos (WANG, 2012).

1.1) Triterpenos

Os triterpenos são um dos mais numerosos e diversos compostos dentre os produtos naturais com atividade biológica ativa que estão presente em plantas. Hoje, se tem mais de 30.000 triterpenos identificados (MALINOWSKA et al., 2013; THIMMAPPA et al., 2014).

Os esteróis e os triterpenos são isoprenóides que são sintetizados pela via do mevalonato. Os esteróis são compostos importantes presentes nas membranas celulares e possuem um papel na transdução de sinais na planta, semelhante ao papel exercido pelos hormônios esteróides em humanos. Porém, os triterpenos não são considerados essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, muitas vezes eles são encontrados na forma não modificada simples e acumulam-se juntamente com carboidratos e outras macromoléculas (THIMMAPPA et al., 2014; HILL e CONNOLLY, 2013).

A via metabólica que culmina na formação de esteróides e triterpenos se inicia com a condensação de uma unidade de isopentenil difosfato e dimetilalil difosfato que após a condensação formam o farnesil pirofosfato. Este processo de condensação ocorre graças a enzima farnesil pirofosfato sintase.

O farnesil pirofosfato é convertido em esqualeno através da enzima esqualeno sintase. A ciclização de esqualeno (em bactérias) ou 2,3-oxidoesqualeno (em fungos, animais e planta) em esterol ou em compostos derivados de triterpenos é uma das reações enzimáticas mais complexas conhecidas na via de formação de terpenos. Para efeitos desta análise, podemos fazer uma distinção entre os esteróis e triterpenos com base na forma em que estas moléculas são sintetizadas. Na biossíntese de esteróis, o 2,3-oxidoesqualeno é ciclizado para o lanosterol (em fungos e animais) ou cicloartenol (em plantas), através da conformação cadeira-barco-cadeira (CBC). Na biossíntese de triterpenos, em contraste, este substrato é dobrado em uma conformação cadeira-cadeira-cadeira (CCC) - antes de ciclização em uma enorme variedade de triterpenos de diversos tipos de esqueletos, dos quais a β -amirina é mostrada como um exemplo na **Figura 2** (POLLIER et al., 2013; MALINOWSKA et al., 2013; THIMMAPPA et al., 2014).

Figura 2: Via de biossíntese de esteróis e triterpenos. Os esteróis e os triterpenos são sintetizados através do ácido melavônico. (FPS) farnesil pirofosfato sintase; (SQS) esqualeno sintase; (SQE) esqualeno monooxigenase ou epoxidase; SHC, esqualeno-hopeno ciclase; (LAS) lanosterol sintase; (CAS) cicloartenol sintase; (CPQ) cucurbitadienol sintase; (BAS) β-amirina sintase; (CBC) cadeia-barco-cadeia; (CCC) cadeia-cadeia-cadeia (Adaptado de HILL e CONNOLLY, 2013).

1.2) Propriedades Anticancerígenas Relatadas na Espécie *Momordica charantia*

O extrato bruto das folhas de *Momordica charantia*, bem como compostos isolados a partir de diversas partes desta espécie de planta, tem despertado o interesse por influenciar nos mecanismos que ocorrem no desenvolvimento de certos tipos de câncer, como o melanoma, câncer prostático, carcinoma nasofaríngeo, câncer pulmonar, neuroblastoma, câncer adenocortical entre outros (FANG et al. 2001, ZHANG et al. 2012; PITCHAKARN et al. 2012), gerando resultados benéficos.

Entre os compostos isolados a classe dos triterpenos tem demonstrado potente atividade antitumoral contra câncer de próstata *in vitro* e *in vivo* (PITCHAKARN et al., 2010 b). ZHANG e colaboradores (2012) isolaram dezesseis triterpenos provenientes das folhas de *Momordica charantia* (**Figura 4**) que apresentaram atividade antitumoral contra papiloma induzido. Dados da literatura descrevem o efeito de componentes do extrato metanólico proveniente das folhas de *Momordica charantia* (WANG et al., 2012).

Na espécie *Momordica charantia* foi isolado uma lectina tipo II (classe de proteínas que tem capacidade de aglutinar hemácias através de sua afinidade com carboidratos), chamada de MCL (*Momordica charantia* Lectin), a partir de extratos das folhas de *Momordica charantia* a qual tem mostrado atuação contra carcinoma nasofaríngeo (FANG et al., 2011) e em outros tipos de câncer, tanto *in vitro* como *in vivo* (TAN et al., 2011).

KIKUCHI et al. (2012) determinaram a estrutura de oito compostos glicosídicos (**Figura 3**) isolados a partir da fração solúvel em butanol obtida da fração metanólica do extrato das folhas de *Momordica charantia*. Esses compostos foram testados em cultura celular de melanoma. Foi observado que todos estes compostos desencadearam mecanismos que culminaram na inibição do desenvolvimento destas células ou na eliminação deste tipo celular quando já desenvolvido.

Figura 3: Estrutura de compostos glicosídicos isolados a partir da fração butanólica particionada da fração metanólica das folhas de *Momordica charantia* que possuem propriedades anticancerígenas contra melanoma (KIKUCHI et al., 2012). **1)** hex-3-en-1-ol 1-O-β-D-glucopiranosídeo; **2)** benzil álcool 1-O-[α-L-arabinopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo]; **3)** (6S,9R) - Roseosídeo; **4)** 3-oxo-α-ionol-9-O-β-D-glucopiranosídeo; **5)** (4ξ) -α-terpineol-8-O-[α-L-arabinopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo]; **6)** sacranosídeo A (mirtenol 10-O-[α-L-arabinopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo]; **7)** mirtenol 10-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-; **8)** mirtenol 10-O-β-D-glucopiranosídeo.

1.3) Propriedades Antivirais Atribuídas à Espécie *Momordica charantia*

Dentre os compostos com propriedades antivirais, foi caracterizado o composto α-momorcarina, que é uma proteína inativadora de ribossomos (RIP- Ribosome-inactivating proteins), que pertence a uma família de proteínas encontrada em plantas que tem a capacidade de interromper a biossíntese de proteínas em certos vírus. O composto α-momorcarina tem mostrado atividade na inibição da replicação viral do vírus da hepatite B, onde os mecanismos da transcrição do DNA deste vírus ficam comprometidos (YAO et al., 2011). Também foi encontrada em plantas da espécie *Momordica charantia* uma proteína chamada de MAP30, também conhecida como proteína momordica anti HIV que além de

propriedades antitumorais, apresentou propriedades inibitórias do processo infeccioso do vírus HIV (MENG et al., 2012).

Foi isolada uma proteína a partir de sementes maduras de *Momordica charantia* e foi realizado diversos testes contra o vírus da Influenza. Ficou demonstrado que esta proteína possui atividade antiviral eficaz para uma diversidade de subtipos de influenza A, incluindo o H1N1, H3N2 e H5N1. Assim, esta proteína vegetal detém um grande potencial para o desenvolvimento de um agente terapêutico eficaz contra várias e até novos subtipos emergentes da influenza A, como H7N9, que foi introduzido e encontrado primeiramente na China e que pode se espalhar para demais partes do globo no ano de 2014 (PONGTHANAPISITH et al. 2013).

1.4) Propriedades hipoglicemiante dos metabólitos isolados a partir da espécie *Momordica charantia*

As propriedades hipoglicemiantes relatadas pela cultura popular quando do uso de *Momordica charantia* estão sendo cada vez mais evidenciadas e comprovadas através de pesquisas científicas nas quais diversos mecanismos já foram estabelecidos e esclarecidos (VIRDI et al., 2003; NEGRI, 2005).

Os primeiros achados científicos em relação à propriedade hipoglicêmica da *Momordica charantia* foram relatados nas décadas de 70 e 80 por Whelinda et al. que comprovaram a melhora significativa da tolerância à glucose em pacientes com diabetes (FANG et al., 2011). A partir desta evidência, houve um relativo aumento em pesquisas envolvendo a espécie *Momordica charantia* tentando esclarecer os mecanismos responsáveis por esta atividade hipoglicêmica.

No ano de 1981, um grupo de pesquisadores indianos purificou a partir de extratos de *Momordica charantia*, um polipeptídeo, chamado de Polipeptídeo-P, com 166 aminoácidos o qual foi confirmado como um potente agente hipoglicêmico (VIRDI et al., 2003; FANG et al., 2011).

Em 2003, foi demonstrado que o extrato obtido a partir de frutos verdes de *Momordica charantia* continuava a exercer um efeito hipoglicêmico, mesmo quando a maioria de células β das ilhotas pancreáticas foram destruídas, indicando um fenômeno insulinoimético direto (VIRDI et al., 2003).

Aproximadamente 230 compostos foram isolados a partir de sementes, pericarpo, planta íntegra e partes aéreas (SING, 2011). Esses compostos têm sido classificados em diferentes classes como: proteínas, lipídios, carboidratos, compostos inorgânicos, triterpenos, fenilpropanóides, carotenóides, esteróides, alcalóides, monoterpenos, alquenos, alcanos com 5C ou mais carbonos e outros compostos com estruturas ainda não definidas. Dentre estes compostos isolados, os mais abundantes são **proteínas** e **triterpenos** com capacidade hipoglicemiante (SING 2011; TAN et al., 2008).

A grande maioria destes terpenos está bem caracterizada quimicamente e se apresentam como potenciais fármacos para o tratamento da diabetes. Entre os quais podemos citar a Momorcarina que é uma saponina (um terpenoide glicosilado), a Momordicina e os Momordicosídeos (TAN et al., 2008; FANG et al., 2011).

Tan e colaboradores (2008) isolaram, purificaram e caracterizaram a estrutura química de 10 terpenóides a partir de tecidos de *Momordica charantia* (**Figura 3**). Após esta caracterização, foram realizados testes biológicos para verificar a eficácia destes compostos orgânicos isolados em relação às propriedades hipoglicemiantes e contra obesidade (TAN et al., 2008; FANG et al., 2011).

Destes terpenos, os classificados como momordicosídeos Q, R, S e T (compostos 2, 3, 5 e 6; **Figura 3**) e karavilosídeo XI (composto 1; **Figura 3**) que é um triterpeno glicosilado encontrado nos tecidos de *Momordica charantia* e de outras plantas pertencentes à família Cucurbitaceae (TOSHIHIRO et al., 2007), tiveram uma ação significativa em relação à ação hipoglicemiante (TAN et al., 2011). O momordicosídeo T demonstrou uma melhoria em relação à intolerância à glucose (TAN et al., 2008).

O momordicosídeo S (composto 5) estimulou os receptores GLUT-4 aumentando a captação de glucose tanto *in vitro* como *in vivo* (TAN et al., 2008; FANG et al., 2011), ação esta mediada por AMPK (AMP quinase). Por possuírem estas propriedades antidiabéticas, este conjunto de terpenóides são vistos como promissores para o tratamento de resistência à insulina e obesidade (CHENG et al., 2008; TAN et al., 2008; SING, 2011).

A partir da extração metanólica das folhas de *Momordica charantia*, Zhang et. al. (2012) isolaram 17 triterpenos (**Figura 4**) que demonstraram propriedades antidiabéticas, antitumorais e antivirais.

Figura 4: Estrutura de triterpenóides isolados a partir da planta *Momordica charantia* com propriedades antidiabéticas, antivirais e antitumorais (TAN et al., 2011). **1)** Karavilosídeo XI; **2)** Momordicosídeo Q; **3)** Momordicosídeo R; **4)** Aglicona; **5)** Momordicosídeo S; **6)** Momordicosídeo T; **7)** Momordicosídeo B; **8)** Aglicona; **9)** Momordicosídeo A; **10)** Momordicosídeo B.

Figura 5: Estrutura de triterpenos e açúcares isolados a partir do extrato metanólico obtido da espécie *Momordica charantia* (ZHANG et al., 2012). **1)** (23E)-3 β ,25-diidroxi-7 β -metoxicucurbita-5,23-dien-19-al **2)** (23E)-3 β ,7 β -diidroxi-25-metoxicucurbita-5,23-dien-19-al **3)** (23E)-3 β -hidroxi-7 β ,25 dimetoxicucurbita-5,23-dien-19-al **4)** momordicosídeo L **5)** momordicosídeo K **6)** (23S*)-3 β -hidroxi-7 β ,23-dimetoxicucurbita-5,24-dien-19-al **7)** (23R*)-23-O-metilmomordicina IV **8)** (25)-26-hidroximomordicosídeo L **9)** 25-oxo-27-normomordicosídeo L **10)** kuguaglicosídeo C **11)** karavilagenina D **12)** 25-O-metilkaravilagenina D **13)** karavilosídeo VI **14)** (19R,23E)-5 β ,19-epoxi-19-metoxicucurbita-6,23-diene-3 β ,25-diol **15)** goyaglicosídeo-a **16-** goyaglicosídeo- b **17-** momordicosídeo G

2) Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus, anteriormente considerada uma doença de menor importância para a saúde mundial, vem tomando seu lugar como uma das principais ameaças para a saúde humana no século XXI. Esse fato se dá pelo rápido aumento da incidência mundial desta doença, em que no ano de 2000, havia cerca de 151 milhões de pessoas com diabetes mellitus e no ano de 2010 já se encontrava 221 milhões de pessoas (NEGRI, 2005; ZIMMET, 2001; WILD et al., 2004). De acordo com esta estimativa, é esperado que no ano de 2025, haja mais de 300 milhões de pessoas com esta patologia (WILD, 2004; ZIMMET, 2001; TAN et al., 2011).

A ocorrência de diabetes mellitus tipo 2 é associado a disfunção das células β das ilhotas pancreáticas e à resistência ao hormônio insulina, que resulta na ineficácia da insulina de baixar os níveis sanguíneos de glucose através da supressão da glucose hepática e estimulação da utilização da glucose no músculo estriado esquelético e nos tecidos adiposos (FANG et al., 2011; ZIMET, 2001; NEGRI, 2005; BLUM et al., 2011). Como consequência, esta doença causa morbidade substancial, mortalidade, complicações hepáticas e representa um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (BLUM et al., 2011), além de ter complicações secundárias que afetam os olhos, rins, nervos e artérias (VIRDI et al., 2003).

Além do uso de insulina para o tratamento de diabetes tipo 2, outras abordagens para o controle da hiperglicemia incluem o uso de análogos de amilina que regulam o esvaziamento gástrico e inibidores de α -glicosidases intestinais como arcabose, miglitol e voglibiose que levam ao retardamento da hiperglicemia pós-prandial. Também são comumente utilizados no tratamento de diabetes ou resistência à insulina as sulfonilureias, a classe de drogas mais amplamente utilizadas, que atuam sobre o fechamento dos canais dependentes de ATP e Metformina, um antibiótico que limita a absorção de glucose no intestino. Todas estas drogas causam certos efeitos, tais como crises hipoglicêmicas, problemas hepáticos, ganho de peso, retenção de líquidos, acidoses láticas, diarreias e falência cardíaca (VIRDI et al., 2003; TAN et al., 2008).

As plantas medicinais que já eram utilizadas a centenas ou milhares de anos vêm ganhando cada vez mais representatividade tanto farmacologicamente quanto experimentalmente como adjuvantes no tratamento de diversas desordens e

doenças, incluindo o diabetes, bem como são uma alternativa para se evitar os efeitos colaterais citados com o uso prologando de drogas sintéticas, o que vem gerando resultados positivos que sugerem a um aumento no uso de medicamentos naturais para com esta finalidade (VIRDI et al., 2003; NEGRI, 2005).

3) Cultura de células vegetais, produção de metabólitos secundários e biofármacos

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica amplamente utilizada. Como um sistema experimental, a cultura de células e de tecidos de plantas fornece uma série de vantagens sobre os estudos com plantas íntegras, incluindo: a geração em quantidade de material necessário para os estudos, células indiferenciadas, estado de desenvolvimento das células relativamente uniforme, ausência da interferência de microrganismos; e o mais importante, o ciclo vegetativo reduzido (FUMAGALI et al., 2008).

Metabólitos secundários são sumariamente definidos como compostos pouco abundantes, com uma frequência inferior a 1% do carbono total, ou pelo fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicos. Nos organismos vivos, metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento, ao contrário dos produtos de metabolismo primário. Isso não significa que eles não são importantes. Eles se relacionam com as plantas e com os componentes do seu ecossistema, ou seja, o ambiente físico (biotopo) e a comunidade vivo (biocenose), sendo, assim, indispensável para a sobrevivência da espécie (IRITI e FAORO, 2009).

Nas plantas, a diversidade química determinou seu sucesso evolutivo. As plantas não são capazes de evitar o agravamento das condições ambientais. Consequentemente, ao contrário dos animais, as plantas desenvolveram um número enorme de metabólitos secundários para superar qualquer perigo, embora a maioria deles são espécie-específicos. Isto implica que o número real de metabólitos secundários em uma dada espécie é muito mais limitado. O papel funcional destes fitoquímicos vão desde a ecologia à defesa, melhorar a proteção contra os estresses

bióticos e abióticos, além de estar envolvido em papéis ecológicos como atrativos ou repelentes, para polinizadores entre outras (IRITI e FAORO, 2009; FUMAGALI et al., 2008).

Geralmente, os precursores de vias metabólicas secundárias são resultantes do metabolismo primário. Portanto, um fator de estresse grave ou de longa duração poderia induzir uma mudança excessiva entre o metabolismo primário e secundário, consequentemente, um desvio de recursos disponíveis essenciais de crescimento para defesa (IRITI e FAORO, 2009).

Os metabólitos secundários mais abundantes que são isolados normalmente em plantas, cultura de células e tecidos são os alcalóides, antraquinonas, antocianinas, flavonóides, saponinas e triterpenos (SRIVASTAVA e SRIVASTAVA, 2007).

O desenvolvimento nas técnicas analíticas no século XX como, por exemplo, os diversos tipos de cromatografia e o advento da espectrometria, permitiram um maior isolamento e caracterização destes componentes (FUMAGALI et al., 2008; CROTEAU et al., 2000).

As culturas de células de plantas podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos secundários e de biofármacos dentro de um período de cultivo de poucas semanas. Isto é muito favorável em relação à produção na planta, para as quais o espaço de tempo para o acúmulo destes metabólitos pode variar de uma estação para outra em plantas anuais ou em diversos anos no caso das plantas perianuais. Dependendo das espécies de plantas, métodos agrícolas tradicionais exigem frequentemente meses a anos, para se obter uma cultura.

Além disso, os níveis de metabólitos secundários de plantas são afetados por muitos fatores em que alguns podem ser controlados, como o controle hídrico durante o desenvolvimento da planta, e muitos outros que podem interferir de maneira não prevista, tais como quantidade de radiação solar e temperatura por exemplo. Nas culturas de células de plantas estes fatores são minimizados ao máximo pois pode-se manter, bem como as condições de experimento que otimizem a obtenção destes metabólitos que resulta no aumento das taxas de biossíntese, facilitando grandemente os estudos (CROTEAU et al., 2000; SRIVASTAVA e SRIVASTAVA, 2007).

A cultura de tecidos vegetais utilizadas para a pesquisa de metabólitos e biofármacos é realizada a partir de um explante que é um fragmento de tecido vivo da planta (pode ser um fragmento de folha, caule ou raiz que pode ter sido colocado no meio de cultura ou que foi germinado de uma semente no próprio meio), que passa por um processo de desinfecção previamente e que é inoculado em meio de cultura (ANDRADE, 2002; SANTOS, 2010), onde se faz o balanço de nutrientes e controle hormonal a fim de manter este tecido em um estado de desdiferenciação do explante, de modo que em determinado período de tempo todas as células se encontre em um mesmo estágio de desenvolvimento (ANDRADE, 2002; FUMAGALI *et al*, 2008).

O maior desafio da produção de metabólitos secundários de plantas de culturas em suspensão de células é que estes metabolitos são normalmente produzidos por células especializadas e/ou em estágios de desenvolvimento diferentes. Alguns compostos não são sintetizados se as células permanecerem indiferenciadas (FUMAGALI *et al.*, 2008; SRIVASTAVA e SRIVASTAVA, 2007).

Na cultura de células em suspensão, quando comparada à cinética de crescimento celular a qual é usualmente uma curva exponencial, a maioria dos metabólitos secundários é produzida durante a fase de platô (FUMAGALI *et al.*, 2008).

4) Parede Celular Vegetal

A parede celular vegetal (**Figura 6**) é responsável por garantir a forma da célula, atua como um mecanismo efetivo que previne a expansão excessiva e o rompimento da célula devido à pressão hidrostática, portanto, garantindo proteção à célula, participa do transporte celular, do armazenamento, da sinalização e do reconhecimento entre diferentes tipos celulares e serve como uma matriz extracelular que interage com as proteínas de superfície, propiciando informações sobre o desenvolvimento (KNOX, 1992; HAYOT *et al.*, 2012).

Em alguns casos, as moléculas derivadas das paredes celulares também podem atuar como sinalizadores para informar à célula sobre condições ambientais,

como a presença de patógenos, sendo este um aspecto muito importante na defesa das plantas contra microrganismos invasores, onde podem estar associadas às **Aposições da Parede Celular** (Cell Wall Appositions – CWA), que são estruturas presentes da constituição da parede celular (polissacarídeos e proteínas associadas a esta porção) que são depositadas na parede celular diante da infecção por algum agente danoso ou microrganismo presente em contato com a parede celular (LEROUX et al. , 2011; DE SOUZA, 2007; HAYOT et al. 2012). Também pode ocorrer a degradação da parede celular mediante um processo infeccioso na planta por microrganismos (geralmente fungos) que possuem a enzima celulase que catalisa a degradação das ligações glicosídicas β (1-4) presentes na celulose, que é o principal constituinte da parede celular vegetal (MA et al., 2014).

Figura 6: Esquema de alguns aspectos da arquitetura, regulação hormonal e compreensão da parede celular vegetal. **A)** A composição polissacarídica da parede celular primária é constituída em sua maioria por celulose, xiloglucana e pectina. As setas azuis mostram os pontos de interação biomecânica onde a xiloglucana atua em adesão entre uma pequena porção de duas miofibrilas de celulose adjacentes. **B)** Representação das proteínas, dos complexos proteicos e genes responsáveis pela formação da parede celular vegetal e manutenção da parede celular (BASHLINE et al. 2014)

5) Elicitores

As plantas são continuamente expostas à patógenos e para combatê-los, elas desenvolveram em seus processos evolutivos uma variedade de mecanismos contra estes agentes danosos à elas. Destes agentes lesivos para a planta podemos citar como exemplo: insetos, herbívoros e a radiação excessiva. Estes compostos que têm a capacidade de desencadear mecanismos químicos de defesa na planta são chamados de **elicitores** ou **eliciadores** (DE LORENZO, 2014; YOSHINAGA, 2014).

Os elicitores são divididos em duas classes: a) fontes abióticas: metais pesados, luz ultravioleta; b) origem biológicas: por exemplo, parede celular de fungos, enzimas microbianas entre outros (HOLOPAINE *et al*, 2009; LIMA, 2009). O reconhecimento planta- patógeno ocorre normalmente pela interação de uma molécula elicitora do patógeno ou da planta e de um receptor proteico presente na membrana celular da planta (SUZUKI, 1999; LIMA, 2009).

Os elicitores são compostos de estruturas químicas muito diversificadas, que quando em contato com a planta, possuem a capacidade de estimular uma cascata de sinais que irá resultar na ativação de diversos mecanismos de defesa (MONTESANO, 2003; DE MELLO, 2009; DE SOUZA, 2007). Como consequência os elicitores podem causar na planta eventos como a degradação da parede celular vegetal ou levar a um espessamento desta e ativação de vias metabólicas que resultam no aumentam da produção de metabólitos secundários na planta, como por exemplo os terpenóides (SEIDL-ADAMS *et al.*, 2014).

Após o reconhecimento de um patógeno invasor, as plantas respondem por induzir respostas de defesa complexas, o papel central neste processo é interpretado por hormônios vegetais. Esses hormônios sinalizam a percepção da ameaça por meio de uma rede de sinalização. A espinha dorsal desta rede é formada por vias de sinalização reguladas por ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). Outros hormônios, como o ácido abscísico (ABA), as giberelinas (GA), auxinas, citocininas e brassinosteróides também têm sido mostrados como

moléculas para modular a sinalização de defesa (NOVÁKOVÁ et al., 2014; PIERTERSE et al., 2012).

Dentre os mecanismos de defesa da planta, observa-se além da produção, o acúmulo de AS nos locais onde estas respostas de defesa estão ocorrendo. O AS atua na regulação da expressão de genes que codificam proteínas e enzimas com efeitos metabólicos cuja função é a de defesa da planta contra os diferentes agentes, como por exemplo mediante a infecção por vírus nos tecidos internos das plantas (MALAMY et al., 1990; ENGELBERT et al. 2011).

A morte celular programada (PCD) é um evento comum em quase todos os seres vivos. Este processo tem sido extensivamente estudado em animais, onde é chamada de apoptose, mas são bem menos conhecidos os mecanismos da PCD em células vegetais. O AS tem importante efeito no estresse oxidativo e nas respostas de hipersensibilidade (RH) em células vegetais, sendo que estes dois mecanismos de defesa envolvem também uma via para a ativação da CPD em células vegetais (GARCIA-HEREDIA, et al. 2008).

Altos níveis do ácido salicílico também têm mostrado a capacidade de produção de H_2O_2 , lipídio peroxidação e danos oxidativos que juntos acabam culminando na CPD (GARCIAHEREDIA, et al. 2008; ENGELERTH, 2008; TRUJILLO- VILLANUEVA et al., 2012), sendo esta uma molécula que garante uma resposta evidente nos experimentos empregados, pois mesmo em baixas concentrações o AS já possui a capacidade de desencadear mecanismos de resistência mediado em culturas celulares (DE SOUZA, 2005).

5.1) Ácido Salicílico

O ácido salicílico (AS) (**Figura 7**) é encontrado distribuído amplamente nas folhas e órgãos reprodutivos das plantas. É sintetizado a partir da via dos fenilpropanóides no citoplasma partindo da *L*-fenilalanina que irá originar o ácido *trans*-cinâmico por ação da fenilalanina-amônia-liase (PAL) e pela via do isocorismato que ocorre no cloroplasto onde o corismato é convertido em isocorismato por ação da isocorismato sintase (ICS) (SAN VICENTE, 2011; ŠAŠEK et al. 2014).

A conversão do ácido *trans*-cinâmico a ácido benzóico pode envolver o mecanismo de β -oxidação sintetizando substâncias intermediárias antes de formar o ácido benzóico. O ácido benzóico é convertido em ácido salicílico através da ação da enzima ácido benzóico-2-hidroxilase (KERBAUY, 2012).

Figura 7: Representação molecular do ácido salicílico.

O ácido salicílico é um metabólito envolvido em vários mecanismos de respostas que envolve o estresse vegetal e de desenvolvimento da planta tais como o de garantir resistência a patógenos, florescimento, termogênese, senescência e respostas medidas por danos abióticos. Está envolvido também em mecanismos de formação de sementes e em um tipo de morte celular que não está associada com a resposta de hipersensibilidade (SAN VICENTE et al., 2011; YAN e DONG, 2014).

O AS pode contribuir na manutenção da homeostase celular. Um mecanismo bem descrito é o da regulação das enzimas com atividade antioxidante e indução de uma via respiratória alternativa e regulação da expressão gênica por induzir uma RNA polimerase dependente de RNA. Isso é importante para o silenciamento gênico pós-transcricional (SLAYMARKER et al., 2002; XIE et al., 2002).

O AS atua como um sinal imunológico em plantas, onde esta molécula deve ser capaz de se ligar a alvos celulares ou receptores a fim de ativar eventos de sinalização. Esta ideia aponta para grandes esforços nos últimos 20 anos para identificar o(s) receptor(es) de AS em plantas. Slaymayer e colaboradores (2002) descobriram um potencial receptor de AS através do isolamento de proteínas expressas na presença de AS (SABP's) usando abordagens bioquímicas. O SABP identificado pela primeira vez foi a catalase presente em folhas de tabaco (CHEN, 1993). No entanto, Ruffer et al. (1995) apresentou provas contra a ligação específica de AS para catalase presente em plantas. Eles descobriram que as catalases de fungos e animais poderia hiperestimar a produção de AS nos tecidos vegetais. Outros estudos mostraram que AS pode ligar-se a enzimas que contêm ferro, tais como aconitase, lipoxidase e peroxidase (RUFFER et al., 1995). Estas enzimas evidenciam alvos celulares gerais do AS, mas são improváveis alvos específicos de AS em plantas (DE SOUZA, 2005; YAN e DONG, 2014).

2- OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi padronizar a cultura de células de *Momordica charantia*, como fonte de metabólitos secundários bioativos, utilizando os compostos obtidos a partir de folhas como padrões.

2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São os objetivos específicos deste trabalho:

- 1) Padronização dos ensaios de elicitação na cultura celular de *Momordica charantia* utilizando como agente elicitor o ácido salicílico (AS);
- 2) Caracterização estrutural dos açúcares liberados no meio extracelular na cultura de células de *Momordica charantia* durante a fase de crescimento da cultura e durante os ensaios de elicitação;
- 3) Isolamento e purificação dos metabólitos secundários obtidos a partir das folhas de *Momordica charantia*;
- 4) Caracterização estrutural dos “momordicosídeos” obtidos a partir das folhas de *Momordica charantia*;
- 5) Determinação das condições para isolamento e purificação dos metabólitos secundários (momordicosídeos) obtidos de *Momordica charantia* após elicitação com AS;
- 6) Caracterização estrutural dos (momordicosídeos) obtidos da cultura de células de *Momordica charantia* após elicitação com AS.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Equipamentos

- Agitador Magnético (MARCONI ® MA089)
- Autoclave 4B Luperco (PHOENIX®)
- Balança analítica (SHIMADZU LIBROR® AEL-40SM)
- Capela de Fluxo Familiar (ENGELAB®)
- Câmara de Neubauer (BIOBLOCK®)
- Centrífuga 5810R (Eppendorf®)
- Espectrofotômetro (DU® BECKMAN)
- Leitor de Microplacas modelo ELISA (SIGMA® DIAGNOSTICS)
- Microscópio Ótico (OLYMPUS CH2)
- Rotaevaporador BUCHI® R-210 Vacum controller V-850 Heating Bath B-491Recirculating Chiller F-100
- HPLC SHIMATZU® Dioide Array Detector SPD- M10AVP DGU-14^a SPD M10A SCL- 16AVP
- Polytrom (IKA® T25 DIGITAL ULTRA- TURRAX®)
- Ultrassom (ULTRACLEANER 1400 UNIQUE®)
- RMN BRUKER DRX 400 E BRUKER DRX 500
- Polarímetro Digital (JASCO® P-2000)
- Ponto de Fusão FISATORM® Mod 431 Série 1237344 60 Hz 50W

3.2.1) Reagentes

Todos os reagentes e sílicas utilizados foram da marca SIGMA-ALDRICH®, exceto o reagente BioRad Protein Assay da marca BIORAD®.

3.2.2) Solventes

Os solventes utilizados para a extração foram das marcas SYNTH® e para o uso em HPLC foram da marca MERCK®.

3.3) Softwares

Foram utilizados os softwares Graph Prism 5 for Windows para a avaliação estatísticas, o software ChemBioDraw Ultra 13.0.2.3021 para construção e determinação molecular dos compostos isolados, o software ACD LABS Processor Academic Edition 12.01 para avaliação e análises dos espectros de ressonância magnética e correlações e o Software Class- VP Versão 6.14 SP2B para a análise e manipulação dos dados obtidos por HPLC.

3.4) Realização dos experimentos

Todos os experimentos apresentados nesta dissertação foram realizados no laboratório de Bioquímica Vegetal sob responsabilidade e orientação da Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia e no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho-NPPNS sob responsabilidade e orientação da Profa. Dra. Hosana Maria Deboni. Ambos laboratórios são localizados na FCFRP-USP.

3.5) Cultura Celular de *Momordica charantia*

Foram utilizadas células de *Momordica charantia* cuja cultura foi padronizada no laboratório de cultura de células Vegetal da FCFRP-DFQ. As células foram cultivadas em meio MURASHIGE e SKOOG (MS) (**Tabela 1**) (MURASHIGE e SKOOG, 1962),,. suplementado com reguladores de crescimento, 2,4-D 1,5 mg/L e cinetina 1mg/L; 30 g/L de sacarose e gelificante (Phytigel 2g/L), em pH 5,8. As células foram mantidas em sala de cultura à 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, iluminação de 2000 lux. Quando cultivadas em meio líquido, sem Phytigel permaneceram sob agitação orbital de 75 rpm. As subculturas foram realizadas com intervalos de 30 dias.

Tabela 1: Composição do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Macronutrientes (mg/mL)		Micronutrientes (mg/mL)	
KH ₄ NO ₃	165	MnSO ₄ .7 H ₂ O	1,838
KNO ₃	190	H ₃ BO ₃	0,62
CaCl ₂ . 2H ₂ O	44	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,0025
KH ₂ PO ₄	17	CoCl . 6 H ₂ O	0,0025
MgSO ₄ . 7H ₂ O	37	NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0,025
Na ₂ -EDTA.7H ₂ O	3,73	KI	0,0025
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,72	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0025

3.6) Contagem e Viabilidade Celular

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer com utilização de microscópio óptico (aumento de 10X) tendo sua viabilidade testada através do corante azul de Evans (KANAI e EDWARDS, 1973). Foram adicionados 20,0 µL de azul de Evans a 1% (m/v) a 200,0 µL de suspensão celular, e a porcentagem de células viáveis foi determinada pelo número de células não coradas (viáveis) para cada 100 células contadas. Para a realização dos experimentos foi levada em consideração uma viabilidade mínima de 90%.

3.7) Ensaio de Elicitação

Os ensaios de elicitação foram realizados em frascos tipo Erlenmeyer, que continham 24 mL de meio MS suplementados de maneira igual para o desenvolvimento da cultura celular (30 g/L de sacarose e hormônios 2,4-D na concentração de 1,5 mg/L e cinetina na concentração de 1mg/L) foram utilizadas concentrações de 0,5; 1,0 e 5 mmol/L de ácido salicílico como elicitor ou água milli-Q nos testes controles, no volume de 1 mL, sempre adicionados no meio líquido. Foi adicionado 0,5 g de células por frasco tipo Erlenmeyer. Este sistema foi mantido idêntico no escuro para evitar o efeito elicitor da luz por 30 dias, sendo recolhidas amostras do sistema a cada 5 dias.

Cada ensaio de elicitação foi realizado em triplicata e a reação foi interrompida colocando as amostras em gelo. As amostras foram recuperadas por decantação e o sobrenadante (meio extracelular) foi recolhido (25 mL) para a posterior análise dos compostos extracelulares totais liberados pelas células para o meio extracelular durante o ensaio de elicitação.

À porção celular decantada, foi adicionado 10 mL do tampão Tris HCl (50 mmol/L, pH 7,2) para que ocorresse a suspensão do material celular que foi utilizado

para posterior ensaios enzimáticos, estudos da composição da parede celular, ensaios microscópicos e dosagens dos compostos produzidos na fração intracelular.

3.8) Isolamento da parede Celular e meio intracelular (MI)

As células decantadas foram lavadas 4 vezes com tampão Tris-HCl (50 mmol/L 4, pH 7,2). Em seguida 5,0 mL das células com o mesmo tampão foram mantidas em banho de gelo e foram rompidas em sistema Polytron com pulso de 500 Watts e 2500 rpm, 5 vezes por 50 segundos cada em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante (meio intracelular) foi recolhido para dosagens dos componentes presentes nesta fração e a parede celular foi recolhida para a análise da sua composição.

As células de *Momordica charantia* obtidos da cultura em suspensão, devido à característica de desenvolvimento desta, tende a crescer em formas de aglomerados celulares, optamos por realizar os ensaios de elicitação utilizando uma massa definida ao invés do número de células como era então utilizado no laboratório.

Os grumos celulares formados foram macerados suavemente para promover a separação do material para se realizar o teste de viabilidade celular. Após a separação dos aglomerados celulares, as células apresentaram entre 97- 98,5% de viabilidade. Para a realização dos experimentos, ficou padronizado a utilização de 0,5 g de células para cada ensaio de elicitação que possui em torno de 1×10^6 células viáveis em 24 mL de meio MS.

Os ensaios de elicitação foram realizados em erlenmeyers, que continham 0,5 g de células em 24 mL de meio MS suplementados de maneira igual com 30 g/L de

sacarose, 2,4-D 1,5 mg/L e cinetina 1mg/L. Foram utilizadas concentrações de 0,5; 1,0 e 5 mmol/L de ácido salicílico como elicitor ou água milli-Q nos testes controles, no volume de 1 mL, sempre adicionados no meio líquido. O experimento foi realizado durante 30 dias no escuro para evitar o efeito elicitor da luz, sendo retirados 3 erlens a cada 5 dias

A reação foi interrompida colocando as amostras em gelo. As células foram recuperadas por decantação e o sobrenadante (meio extracelular) foi recolhido (20 mL) para análise posterior dos compostos liberados pelas células para o meio extracelular durante o ensaio de elicitação.

3.8) Isolamento da parede Celular e fração intracelular (FI)

As células decantadas foram lavadas 4 vezes com tampão Tris-HCl (50 mmol/L 4, pH 7,2). A seguir as células foram ressuspensas em 5,0 mL do mesmo tampão, foram mantidas em banho de gelo e rompidas em sistema Polytron com pulso de 500 Watts e 2500 rpm, 5 vezes por 50 segundos. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C.

O sobrenadante (fração intracelular) foi recolhido para dosagens dos componentes presentes nesta fração e a parede celular foi recolhida para a análise da sua composição.

3.9) Dosagem dos componentes presentes na fração intracelular (FI) e dos componentes liberados para o meio extracelular durante ensaios de elicitação com AS.

O monitoramento dos componentes liberados, tanto da fração intracelular quanto da fração extracelular, pela cultura de células de *Momordica charantia* foi realizado através das dosagens de proteína, açúcares redutores e compostos fenólicos.

3.9.1) Quantificação de proteínas totais presentes nas frações extra e intracelulares em cultura de células de *Momordica charantia* durante ensaios de elicitación AS

A quantificação de proteínas totais foi realizada segundo o método de Bradford (1976) onde fez-se uso de micro ensaios em placa. Utilizou-se albumina bovina (BSA) como padrão, nas concentrações que variaram de 2,5 a 25 µg/mL, para a confecção da curva analítica.

A técnica consistiu em reagir (em triplicata) 160 µL do controle (água mili-Q), padrão ou amostra com 40 µL do reagente de (de Coomassie Brillant Blue G-250. A mistura (200 µL) foi homogeneizada e após 5 minutos a absorbância foi medida a 600nm em leitor de microplaca modelo ELISA (SIGMA® DIAGNOSTICS).

3.9.2) Quantificação de açúcares redutores presentes nas frações extra e intracelulares em cultura de células de *Momordica charantia* durante ensaios de elicitación com AS

Para a dosagem dos açúcares redutores totais utilizou-se a quantificação pelo método de ferricianeto proposto por Kidby e Davidson (1973). Foi feita uma curva de calibração utilizando solução de galactose (5 até 250 µg/mL). Foram adicionados em tubos de ensaio 100 µL do controle (água milli-Q), padrão ou amostra e 3 mL do reagente de ferricianeto de potássio em meio alcalino. Esta mistura foi aquecida a 100 °C por 7 minutos. Após este período , resfriou-se os tubos em banho de gelo e realizou a leitura em 420 nm.

3.9.3) Quantificação dos compostos fenólicos presentes nas frações extra e intracelulares em cultura de células de *Momordica charantia* durante ensaios de elicitação AS

As quantificações dos compostos fenólicos totais foram realizadas de acordo com o método de Slinkard e Singleton (1977), com leituras efetuadas a 725 nm. Foi utilizado padrão de ácido gálico para a confecção de curva analítica, nas concentrações de 100 até 1000 mmol/L. Adicionou-se 50 µL de padrão, controle (água milli-Q) ou amostra com 50 µL de solução de ácido acético glacial 7% e 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:5 (v/v). Após a mistura destes esperou-se 3 minutos e adicionou 50 µL de solução de carbonato dissódico (Na₂CO₃) saturada e 800 µL de água milli-Q.

O meio reacional foi mantido em repouso no escuro por 90 minutos e depois realizou-se a leitura. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.11) Isolamento, determinação e caracterização dos metabólitos secundários presentes na planta *Momordica charantia* para a obtenção de padrões

A etapa de obtenção dos metabólitos secundários foi realizada em parceria, nos laboratórios da Profa. Dra. Carem G. Vargas Rechia – Bioquímica-FCFRP e da Profa. Dra. Hosana M. Deboni – NPPNS/DFQ-FCFRP.

Foi realizado primeiramente, a obtenção e caracterização dos metabólitos secundários a obtidos a partir das folhas e caules de *Momordica charantia*, os quais serviram como padrões para a busca/identificação de metabólitos bioativos na cultura celular. A extração para identificação e caracterização dos triterpenos foi realizada de acordo com TAN et al. 2008 e ZHANG et. al. 2012 a.

Foram coletadas separadamente folhas e caules de *Momordica charantia* nos meses de maio/junho de 2013 e em agosto de 2013 no *campus* da USP em Ribeirão Preto e na cidade de Itaú de Minas. O material vegetal foi separado em caules e

folhas e secos. A massa de partida foi de 3 kg de folhas secas e 1 kg de caules secos. Estes, após a secagem foram pulverizados.

Foi realizado uma primeira extração com metanol (4L/1kg) a temperatura ambiente (3 vezes, 3 dias), onde se obteve o extrato bruto. Este por sua vez foi ressuspendido em água e extraído com acetato de etila (AcOEt). A fração com acetato de etila foi particionada entre n-hexano/metanol/H₂O na proporção de 19:19:1 v/v/v. A fração contendo Metanol + H₂O foi concentrada e a fração aquosa foi reservada para a obtenção de açúcares e glicoconjugados (**Figura 8**).

A fração Metanólica foi recolhida e particionada através da **Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV)** em gradiente de polaridade utilizando como fase móvel n-hexano → acetato de etila → metanol, gerando 9 frações utilizando o gradiente descrito abaixo e fase estacionária Silica Pore Size 60 Å, 40-63 µm Technical Grade (**Tabela 2**).

Tabela 2: Gradiente de polaridade crescente utilizado na CLV para particionamento do extrato metanólico obtido na extração das folhas e caules de *Momordica charantia*.

FRAÇÃO	HEXANO/AcOEt (v/v)	AcOEt/ MeOH (v/v)
A	1:0	_____
B	7:3	_____
C	1:1	_____
D	1:4	_____
E	_____	1:0
F	_____	4:1
G	_____	1:1
H	_____	1:4
I	_____	0:1

Após o particionamento em CLV, as frações foram pesadas e submetidas a uma prévia análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de emissão de Hidrogênio RMN ^1H , onde as amostras preparadas foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e analisadas na frequência de 400 MHz e 500 MHz.

3.12) Extração e obtenção de metabólitos provenientes da cultura celular de *Momordica charantia*

A pesquisa de metabólitos secundários a partir da cultura de células foi realizada em células, elicitadas ou não com AS, recolhidas a cada 5 dias no período de 30 dias, utilizando um inóculo inicial de 15 g de células em 400 mL de meio de cultura MS. Esse sistema foi mantido no escuro para eliminar o efeito elicitor da luz.

As células foram decantadas e retirado o sobrenadante. Em seguida foram congeladas com nitrogênio líquido, e maceradas para promover o rompimento da parede celular. Os metabólitos foram extraídos exaustivamente com diclorometano (DCM):MeOH (2:1 v/v) com trocas da fase móvel a cada 30 minutos por 1 hora e 18h. O material foi concentrado até a secagem. A seguir foi ressuspensionado em 5 mL DCM:MeOH (2:1 v/v) e foi realizado um *clean-up* diretamente em uma coluna C18 (ODS) para a retenção de compostos apolares (ácido graxos, óleos e pigmentos) e posteriormente pesado. Os extratos foram analisados em Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A partir dos resultados obtidos na CCD, os extratos ou foram separados mais uma vez utilizando um gradiente polar em Sílica C18 (ODS) ou separados diretamente por meio de HPLC (**Figura 9**).

Para a detecção dos compostos, o extrato foi submetido aos sistemas de separação em HPLC idênticos aos padrões obtidos e esperados na cultura. Os metabólitos obtidos tiveram suas estruturas confirmadas após análises em espectros de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C), espectros de RMN bidimensionais e de massas.

Figura 8: Esquema do processo de extração dos metabólitos secundários presentes nas partes aéreas de *Momordica charantia*

Figura 9: Esquema do processo de extração dos metabólitos secundários presentes na cultura celular de *Momordica charantia*

3.13) Avaliação do grau de polimerização dos carboidratos da fração extracelular obtida a partir da cultura de células de *Momordica charantia* elicitadas com AS

3.13.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A determinação das variações dos componentes da parede celular da cultura de células de *Momordica charantia* após os ensaios de elicitação foi determinada por HPLC onde as frações extracelulares foram filtradas em membranas de ultrafiltração (10 kDa). Cada fração (50 μ L) foi injetada em coluna de fase reversa C-18

(Bondpack 25 x 0,46 cm), fase móvel composta por H₂O e fluxo de 0,7 mL/min. A detecção das amostras foi realizada por índice de refração sob atenuação de 16x.

As amostras foram analisadas em triplicata. Para a determinação do material analisado foi utilizado padrões apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Padrões de carboidratos utilizados para a avaliação dos fragmentos encontrados na fração extracelular após os ensaios de elicitação com AS em diferentes concentrações.

CARBOIDRATO	GRAU DE POLIMERIZAÇÃO
Xilose	Monossacarídeo
Glucose	Monossacarídeo
Frutose	Monossacarídeo
Sacarose	Dissacarídeo
Estaquiose	Tetrassacarídeo
Maltotetraose	Tetrassacarídeo
Maltopentose	Pentassacarídeo
XXXGol	Heptassacarídeo

* Padrão cedido pela Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, isolado a partir do tegumento de jatobá (*Hymenaea courbaril*).

3.13.2) CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Para a determinação de possíveis fragmentos de oligossacarídeos liberados durante os ensaios de elicitação com AS, foi utilizado a técnica de cromatografia em papel utilizando como fase estacionária papel Watchman nº 1 e como fase móvel Benzeno/ n-Butanol/ Piridina/ H₂O (1:5:5:3 v/v/v/v) com 4 eluições proposta por TREVELIAN e colaboradores (1950)

A revelação do material foi realizada utilizando nitrato de prata alcalino (HOUGH et al., 1950) que consistiu em revelar o papel Watchman nº 1 primeiramente em solução de nitrato de prata (AgNO₃) em acetona (1 mL de solução saturada de AgNO₃ em água e acetona q.s.p. 500 mL). Após a secagem desta, o papel Watchman nº 1 foi mergulhado em solução de hidróxido de sódio (NaOH) em etanol (EtOH) (10 mL de NaOH a 40% em água e EtOH q.s.p. 500 mL) e posteriormente o papel foi seco em vapor de água. Após a secagem em vapor de água, o papel foi mergulhado em solução de tiosulfato de sódio a 10%.

3.14) Condições de isolamento dos metabólitos secundários obtidos na planta *Momordica charantia* e na cultura de células.

As frações **B**, **E** obtidas em CLV foram respectivamente:

B) Foi eluída em Hexano/ AcOEt 1:1 (v/v) cromatografada em Sílica (50g) com gradiente de Hexano/ AcOEt 19:1 até 0:1 (v/v) e que resultou em 5 frações (Fr B₁- Fr B₅).

E) Esta fração foi eluída em AcOEt e cromatografada em coluna empacotada C-18 (100g) utilizando o gradiente de H₂O/ MeOH 7:3; 3:2; 1:1; 2:3; 3:7; 1:4; 1:9; 0:1 (v/v) que resultou em 8 frações (**Fr E₁- Fr E₈**).

Frações B e E

B) A fração Fr B₃ (98 mg) foi submetida a cromatografia em coluna utilizando ODS (10 g) como suporte e como fase móvel gradiente de MeOH/ H₂O (3:7, 2:3; 1:1, 3:2, 7:1 e 9:1), de onde se obteve a fração Fr B₃ purificada (18 mg). Esta fração foi submetida a análises por meio de HPLC com o sistema MeOH/ H₂O (90:10) Coluna ODS –II 5 µm (25 cm x 10 mm) fluxo 2 ml/min

E) Esta fração foi eluída em AcOEt e submetida a cromatografia em coluna empacotada C-18 (100g) utilizando o gradiente de H₂O/ MeOH (7:3; 3:2; 1:1; 2:3; 3:7; 1:4; 1:9; 0:1) que resultou em 8 frações (**Fr E₁- Fr E₈**). A fração **E₇** (728 mg) foi submetida a análises em escala analítica utilizando HPLC com gradiente exploratório de Acetonitrila (ACN) (5% até 100%) H₂O (5) Coluna ODS –II 5 µm (25 cm x 10 mm) fluxo 2 ml/m

3.15) Identificação e Elucidação Estrutural dos Metabólitos Isolados

A elucidação das moléculas dos compostos isolados foi realizada com o auxílio de buscas em bancos de dados contendo informações referentes a dados espectroscópicos e espectrométricos, como por exemplo, utilizando **Dictionary of Natural Products** ou **Scifinder**. As estruturas foram determinadas através das análises espectroscópicas utilizando dados de RMN uni (¹H e ¹³C); bidimensionais (correlações COSY, HMBC e HMQC) além de experimentos de DEPT- 135°.

3.16) Hidrólise ácida e identificação dos açúcares para a análise dos triterpenos presentes na espécie de planta *Momordica charantia*

Foi utilizado 2 mg de compostos isolados por HPLC. A hidrólise consistiu em solubilizar o material em 1 mL de água e depois foi acrescentado 1 mL de ácido

trifluoracético (CF_3COOH) na concentração de 2 mol/L. O material foi mantido em tubos hermeticamente fechados por 3 horas sob aquecimento a 100 °C. Após este período o material foi diluído em água até completar o volume de 15 mL e foi extraído com AcOEt (3 x 3 mL). A fração de AcOEt foi lavada mais uma vez com água e foi rotaevaporada até a secura, onde continha as agliconas.

A fração aquosa foi concentrada até a secura adicionando gradativamente MeOH para remover o excesso de ácido. Esta fração aquosa que continha os açúcares hidrolisados foram analisadas por HPLC utilizando o fluxo de 1 ml/min (Coluna bio-Sil C18 HL 90-5 S 250x 4,6 mm, 5µm) e comparado com os padrões de açúcares analisados previamente.

3.17) Acetilação de Wolfrom e Thompson

A fração de acetato de etila que continham as agliconas foram rotaevaporadas até a secura. Estas foram ressuspensas em 1mL de piridina. A esta solução foi adicionada 1mL de anidrido acético em tubos hermeticamente fechados para que ocorresse o processo de acetilação por 18 horas, em temperatura ambiente.

A reação foi interrompida adicionando gelo picado dentro dos tubos. Foi adicionado 2 mL de clorofórmio, com agitação ocasional para a extração dos acetatos de alditóis por 2 horas.

O material foi lavado com sulfato de cobre (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) para eliminar o excesso de piridina e as amostras presentes na fase clorofórmica foram transferidas para tubos de hemólise e foram seca

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção *in vitro* de metabolitos secundários é influenciada pela composição do meio, tipo elicitor, condições de cultura e outros parâmetros críticos, permitindo a modulação dos níveis de um ou mais compostos (FERRI et al. 2011). Para examinar a produção, regulação e liberação destes metabólitos (primários e secundários), foi realizado um monitoramento utilizando a dosagem de proteínas totais, açúcares redutores totais e compostos fenólicos totais para, além do entendimento da produção destes durante o desenvolvimento da cultura celular de *Momordica charantia*, buscar o melhor tempo para a obtenção dos metabólitos secundários produzidos na cultura celular, já que a produção e liberação destes estão diretamente associados aos efeitos de elicitor de defesa, que em nosso trabalho foi o ácido salicílico.

4.1) Padronização das condições de cultura celular para a obtenção de metabólitos secundários em células de *Momordica charantia* elicidadas com AS

4.1.1) Avaliação do efeito do AS sobre as proteínas totais

Nossa avaliação iniciou-se pela determinação das variações nos teores de proteínas totais no meio intra e extracelular da cultura de *Momordica charantia*. Na **Figura 10** podemos observar o perfil protéico intracelular da cultura, sem a utilização de elicitor, experimento controle. A cultura celular de *Momordica charantia* apresenta um comportamento cíclico em relação à síntese de proteínas, onde a partir de 5 dias (t_1) ocorre gradativamente um aumento na quantificação de proteínas totais e em 20 dias (t_4) tem-se uma concentração menor e logo após este tempo ocorre um aumento na quantificação de proteínas até 30 dias onde apresentou o maior valor de proteínas totais de 98 $\mu\text{g/mL}$.

Em relação aos testes de elicitação realizados utilizando AS na concentração de 0,5 mmol/L de AS, observa-se uma maior quantificação de proteínas totais produzidas no meio intracelular no tempo t_0 (100 $\mu\text{g/mL}$) que seguiu com pouco variação, porém demonstrando uma tendência a diminuição com o passar do tempo t_6 (30 dias) (**Fig. 11**). Os ensaios de elicitação com AS na concentração de 1 mmol/L apresentaram teores maiores de proteínas em t_0 , t_2 e t_6 de, 82, 91 e 74 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Entretanto valores esses inferiores aos obtidos sem elicitor ou com AS 0,5 mmol/L (**Fig. 12**).

No ensaio de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L todos os tempos apresentaram teores muito abaixo de proteínas do que foi verificado com concentrações menores de AS ou no experimento controle. Os valores estiveram entre 18 e 5 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando que AS diminui os teores de proteínas totais com o aumento de sua concentração no meio da concentração em todos os tempos testados, porém que um tempo maior de exposição leva a uma aparente recuperação do sistema, após uma brusca queda nos tempos entre 5 e 25 dias (**Fig. 13**).

As proteínas estão relacionadas nos mecanismos de defesa vegetal. Estudos demonstraram que estresses bióticos ou abióticos levam a alteração no padrão de expressão de proteínas das plantas, podendo ocorrer tanto a inibição quanto a indução da biossíntese de determinados constituintes proteicos o que vai variar com a mecanismo ativado e o tipo de elicitor utilizado (SOARES et al., 2007).

Figura 10: Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular, sem a utilização de elicitor, na cultura celular de *Momordica charantia* durante 30 dias. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de proteínas totais em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). *** refere-se $P < 0,001$

Figura 11: Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L, em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de proteínas totais em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). * refere-se $P < 0,001$, ** se refere a $P < 0,01$ e * refere-se a $P < 0,05$.**

Figura 12: Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L, em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de proteínas totais em relação ao tempo inicial (t_0 - 2 horas). * refere-se $P < 0,001$ comparados ao grupo controle (Branco).**

Figura 13: Variação da concentração de proteínas totais presentes no meio intracelular durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L, em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de proteínas totais em relação ao tempo inicial (t_0 - 2 horas). *** refere-se $P < 0,001$ comparados ao Branco.

Analisando todos os dados obtidos em relação a quantificação de proteínas totais no meio intracelular, podemos notar que o ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L foi, em sua maioria, a que apresentou maiores concentrações em relação não somente ao controle, mas sim aos demais ensaios. Ao analisar este resultado pode-se notar indução da síntese proteica provocada pelo AS nesta concentração independente do tempo. Por sua vez, os ensaios de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L foram o que apresentou menores valores em relação ao controle e os demais tempos de ensaios (**Fig. 14**).

Figura 14: Comparação dos resultados da quantificação de proteínas totais produzidas no meio intracelular com as diferentes concentrações de AS. Os ensaios são representativos de 18 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO WAY- ANOVA e pós teste de Bonferroni onde se avaliou a produção de proteínas totais intracelulares em comparação com todos os demais tempos e ensaios de elicitação.

A concentração de proteínas totais produzidas no meio intracelular, no material elicitado com AS 0,5, 1,0 e 5 mmol/L, apresentaram uma grande variação em relação aos testes controle a partir do tempo de 10 dias (t2) (**Fig. 15**). Podemos observar um aumento na concentração de proteínas intracelulares nos controles até 15 dias nas células elicitadas com AS 0,5 e 1,0 mmol/L, já nas células elicitadas com AS na concentração de 5 mmol/L apresentaram uma concentração de em torno 3,2 vezes menor que nos demais ensaios. Nas amostras elicitadas com AS nas concentrações de 0,5, e 1,0 mmol/L verifica-se que não há variação significativa nas concentrações com o tempo, sendo que no tempo de 30 dias as concentrações de proteínas com as duas menores concentrações utilizadas não apresentaram diferença. No tempo de 30 dias houve uma diminuição de 62,15% na concentração de proteínas totais entre as células elicitadas com AS e o controle e de 80% em relação do controle com a elicitação de 5 mmol/L de AS.

Em relação à quantificação de proteínas totais liberadas para o meio extracelular, durante a fase de crescimento (controle), ocorre uma variação nos teores no decorrer do tempo analisado onde, nos tempos t_2 (10 dias) e t_5 e t_6 (25 e 30 dias respectivamente) apresentaram os maiores teores. Ao analisar o experimento durante 30 dias, assim como observado para o conteúdo de proteínas totais no meio intracelular, do experimento controle observa-se um ciclo na liberação de proteínas totais para o meio extracelular (**Fig. 15**).

Durante o ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L ocorre uma variação significativa nos teores com os diferentes tempos avaliados, onde no tempo de 25 dias (t_5) verificou-se a menor quantificação de proteínas totais (**Fig. 16**).

Na elicitação de 1 mmol/L de AS houve alterações significativas em relação ao controle nos tempos t_2 , t_3 , t_4 e t_6 (10, 15, 20 e 30 dias respectivamente), onde os tempos t_2 , t_3 , e t_6 apresentaram um aumento na liberação de proteínas totais, sendo o tempo t_2 o que apresentou maior teor (18,2 $\mu\text{g/mL}$) de proteínas totais e o tempo t_4 o que apresentou o menor teor (4,8 $\mu\text{g/mL}$) (**Fig. 17**).

No ensaio de elicitação com AS 5 mmol/L ocorreu a maior liberação de proteínas totais no tempo t_5 (25 dias) de (11 $\mu\text{g/mL}$) e o menores teores nos tempos t_1 e t_2 (4,2 e 4,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (**Fig. 18**).

Figura 15: Variação da concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular, sem utilização de elicitor, na cultura de células de *Momordica charantia* durante 30 dias. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de proteínas totais liberadas para o meio extracelular em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). *** refere-se $P < 0,001$, ** se refere a $P < 0,01$ e * refere-se a $P < 0,05$.

Figura 16: Variação da concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de proteínas totais liberadas para o meio extracelular em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). *** refere-se $P < 0,001$ e * refere-se a $P < 0,05$.

Figura 17: Variação da concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de proteínas totais liberadas para o meio extracelular em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). *** refere-se $P < 0,001$.

Figura 18: Variação da concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de proteínas totais liberadas para o meio extracelular em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). *** refere-se $P < 0,001$ e * refere-se a $P < 0,05$.

Comparando os resultados obtidos em todos os experimentos de elicitação na liberação de proteínas totais nota-se que os maiores teores de proteínas totais liberadas foram os tempos controles (branco) (t₂, t₃, t₅ e t₆). Observa-se uma diminuição nos teores de proteínas totais liberadas para o meio extracelular na presença de AS (**Fig. 19**). Comparando-se estes valores com aqueles obtidos com os diferentes tratamentos no meio intracelular verifica-se que este foi aproximadamente 20 vezes menor que o teor de proteínas presentes na fração intracelular.

A quantidade de proteínas liberadas foi, na maioria dos tempos, maior nos controles, onde a maior concentração foi encontrada no tempo de 30 dias no meio intracelular. Somente no tempo de 0 e 5 dias o teor de proteínas totais, no meio

intracelular, foi maior nos ensaios de elicitação que nos controles. Neste mesmo tempo observamos nos controles, meio extracelular, também valores mais baixos de proteínas. A concentração de proteínas totais liberadas para o meio extracelular se manteve menor nos ensaios de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L, no meio extracelular.

Figura 19: Comparação dos resultados da quantificação de proteínas totais liberadas para o meio extracelular avaliando todos os ensaios de elicitação. Os ensaios são representativos de 18 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO WAY- ANOVA e pós teste de Bonferroni onde se avaliou a produção de proteínas totais liberadas para o meio extracelular em comparação com todos os demais tempos e ensaios de elicitação.

4.2.2) Efeito do AS sobre o teor de açúcares redutores

Os danos sobre a parede vegetal pode levar à fragmentação e liberação dos açúcares constituintes desta, onde estes têm a capacidade de mediar mecanismos de defesa na cultura de células ou na planta, podem regular o crescimento celular ou levar aos mecanismos que culminam na morte celular (MUNNÉ- BOSCH et al., 2013).

Inicialmente avaliou-se o comportamento nos teores açúcares intracelulares, utilizou-se a medida de açúcares redutores para eliminarmos o efeito da fonte de carbono e medir-se apenas o resultado de sua metabolização intracelular ou sua liberação da parede celular.

O controle das medidas feitas na fração intracelular, não apresentou variação expressiva e significativa da produção dos açúcares redutores totais em todos os tempos os valores mantiveram-se entre 1,5 e 1,54 $\mu\text{g/mL}$ (**Fig. 23**).

No ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L, os tempos t_1 , t_3 e t_4 apresentaram uma diminuição significativa em relação à produção de açúcares redutores totais no meio intracelular e o tempo t_6 uma redução drástica em relação ao controle (**Fig. 20**). Na concentração de 1,0 mmol/L de AS não houve variações significativas em relação ao controle (**Fig. 21**).

No ensaio de elicitação com AS, na concentração de 5 mmol/L, todos os tempos apresentaram variação significativas em relação ao controle. Observando-se um comportamento cíclico entre os tempos avaliados (**Fig. 22**).

Figura 20: Variação da concentração de Açúcares redutores Totais presentes na fração intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de multi comparação de Bonferroni onde foi analisado as variações em relação ao controle e aos demais tempos de realização do experimento *** refere-se $P < 0,001$, **refere-se a $P < 0,01$ e * refere-se a $P < 0,05$.

Figura 21: Variação da concentração de açúcares redutores totais presentes na fração intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de açúcares redutores totais liberados para o meio extracelular em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas).

Figura 22: Variação da concentração de açúcares redutores totais presentes na fração intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de açúcares redutores totais liberados para o meio extracelular em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). *** refere-se $P < 0,001$

Comparando todos os teores de açúcares redutores totais liberados para a fração extracelular, nota-se que a elicitação de 5,0 mmol/L de AS foi a que apresentou maiores variações em relação a todos os tempos e aos controles. A elicitação de 1,0 mmol/L de AS foi a que apresentou menores teores de açúcares redutores totais liberados em relação a todos os tempos (**Fig. 23 e 24**).

Figura 23: Comparação dos resultados da quantificação de açúcares redutores totais produzidos no meio intracelular entre todos os ensaios de elicitação. Os ensaios são representativos de 18 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO WAY- ANOVA e pós teste de Bonferroni onde se avaliou a produção de proteínas totais liberadas para o meio extracelular em comparação com todos os demais tempos e ensaios de elicitação.

Portanto, a produção de açúcares redutores liberados na fração intracelular apresentou-se como uma resposta dose-dependente em relação à concentração de AS, onde a elicitação fazendo uso de AS na concentração de 5 mmol/L mostrou uma maior resposta para a produção de açúcares redutores em todo o período, sendo que o tempo de 30 dias foi o de maior produção (**Fig. 24**).

Figura 24: Açúcares Redutores Presentes na Fração Intracelular. Comparação dos valores médios obtidos dos testes de eliciação com as na quantificação de açúcares redutores totais na fração intracelular. Variação da concentração de açúcares redutores produzidos no meio intracelular durante a fase de crescimento da cultura celular de *Momordica charantia*, e quando estas foram elicitadas com AS nas concentrações de 0,5; 1,0; e 5,0 mmol/L.

A dosagem de açúcares redutores totais liberados para o meio extracelular não demonstrou alteração significativa no controle (branco) em todos os tempos avaliados, os teores estiveram entre 2100 e 2200 µg/mL.

O ensaio de eliciação com AS na concentração de 0,5 mmol/L apresentou variação significativa em todos os tempos em relação ao controle. O tempo de 25 dias atingiu a maior concentração de açúcares redutores totais (**Fig. 25**). O mesmo efeito na liberação de açúcares redutores totais sem elicitor foi observado no ensaio de eliciação com AS na concentração de 1 mmol/L, onde não houve variação significativa nos valores da quantificação (**Fig. 26**).

No ensaio de elicitação com AS, na concentração de 5,0 mmol/L, houve um aumento drástico na concentração de açúcares redutores totais presentes no meio intracelular da ordem de 20.000 vezes em relação aos demais experimentos (Fig. 27).

Figura 25: Variação da concentração de Açúcares Redutores Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L de AS em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de açúcares redutores totais liberados para o meio extracelular em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). * refere-se $P < 0,001$**

Figura 26: Variação da concentração de açúcares redutores totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L de AS em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA.

Figura 27: Variação da concentração de Açúcares Redutores Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de ANOVA e com o teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação da quantificação de açúcares redutores totais liberados para o meio extracelular em relação ao tempo inicial (t0- 2 horas). *** refere-se $P < 0,001$.

Nas plantas superiores a sacarose é a maior forma de transporte de carboidratos. A sacarose é produzida durante a fotossíntese nos tecidos (folhas) e depois é transportada para diversos tecidos da planta (raízes, órgãos reprodutores, órgãos de estocagem etc.). Invertases (EC.3.2.1.26) hidrolisam irreversivelmente sacarose em glucose e frutose. Até o presente momento foram identificados três grupos de invertases: alcalina/ neutras localizadas no citosol, mitocôndrias e/ou em plastídios, e dois tipos de invertases ácidas, insolúveis ligados à parede celular (invertase da parede celular) e solúvel encontrada no vacúolo (invertase vacuolar), respectivamente (PROELS e HÜCKELHOVEN, 2013; TAUZIN e GIARDINA, 2014).

O efeito observado na elicitación com 5 mmol/L, a partir de t_3 (15 dias), sugere que a enzima invertase presente na parede celular da cultura de células de *Momordica charantia* não sofreu ação inibitória mediante a presença do AS em alta concentração. Fato este evidenciado pela grande concentração de açúcares redutores totais presente na fração extracelular (cabe ressaltar que a única fonte de carboidrato oferecida para a cultura de células foi a sacarose).

Por outro lado, os possíveis canais que transportam os monossacarídeos provenientes da sacarose (frutose e glucose) para o meio intracelular estão sofrendo alguma inibição resultante da presença de AS. Estes monossacarídeos (açúcares redutores) não estão sendo internalizados e permanecendo no meio extracelular, visto que nos demais ensaios de elicitación este evento não é observado.

Neste ensaio podemos observar o efeito causado por AS sobre a parede celular dependente da concentração do mesmo. Na fração de açúcares redutores liberados para o meio extracelular, nos tempos 0 e 15 dias, utilizando AS 0,5 e 1 mmol/L, houve um aumento da concentração de açúcares redutores totais com o aumento do tempo de exposição ao elicitor. Passando a uma estabilização da concentração com o tempo. Nos controles observamos que a uma relação inversa, havendo uma diminuição desta concentração com o tempo de exposição até 15 dias. Ao analisar este parâmetro, se nota uma maior concentração de açúcar redutor na fração extracelular que na fração intracelular, evidenciando que algum evento está sendo mediado possivelmente sobre a parede celular que pode estar sendo fragmentada. Por sua vez, o ensaio de elicitación utilizando AS na concentração de 5 mmol/L teve um aumento relativamente expressivo a partir de 15 dias de ensaio onde se notou a presença de açúcares redutores totais em uma proporção de 20000 vezes maior em relação aos ensaios utilizando AS nas concentrações de 0,5, 1 mmol/L e durante a fase de crescimento da cultura celular de *Momordica charantia* (Fig. 28).

Figura 28:.. Comparação dos valores médios obtidos dos testes de elicitação na quantificação de açúcares redutores totais liberados para a fração extracelular em cultura de células de *Momordica charantia* com ou sem elicitor AS..

Estes resultados nos leva a hipótese de um envolvimento dos mecanismos de resistência observado nas reações de defesa em plantas. É bem conhecido que o acúmulo e liberação de açúcares redutores é regulado por transportadores que são moduladas por vários parâmetros fisiológicos induzidos (FERRI et al. 2011). Destes podemos citar como agentes indutores o excesso de luz, da disposição hídrica para a planta, possíveis lesões que podem ocorrer no tecido vegetal, ataques de patógenos e por moléculas sinalizadoras como o AS.

Baixos níveis de açúcares favorecem as taxas de colonização de patógenos fúngicos (MUNDY e BERESFORD, 2007), mas os níveis mais elevados de açúcares parecem invertem este efeito. Este fenômeno é denominado como "**resistência da alta concentração de açúcar**" (SALZMANN et al., 1998).

Um padrão semelhante na produção e acumulação de polifenóis foi encontrado em ambos obtidos em outras culturas celulares (FERRI et al., 2013) em que as suspensões de células foram tratadas com o pecíolo quitosano (um

oligossacárido componente da parede da célula fúngica) (FERRI et al., 2009).

O uso do AS como molécula elicitadora resultou na presença mais elevada de açúcares do que em condições controle, fase de desenvolvimento da cultura sem o uso de elicitores,. Este evento mimetiza os mecanismos posteriores ao ataque de patógeno na cultura de células. Por conseguinte, é possível relacionar o acúmulo de açúcar ao aumento ou na produção de metabólitos secundários que podem estar correlacionados também com a resistência da **Resistência da Alta Concentração de Açúcar**.

4.2.3) Efeito do AS sobre o Teor de Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, desde fenóis simples até cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e lignina.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras devido a sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo.

Dentre os metabólitos secundários, os compostos fenólicos em particular, estão envolvidos na resposta das plantas aos estresses bióticos e abióticos e fornecem uma contribuição significativa para a atividade antioxidante de tecidos vegetais (CAI et al. 2013).

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUZA et al., 2007).

A produção de compostos fenólicos totais, produzidos na fração intracelular, apresentou-se como um ciclo, onde, no tempo inicial (2 horas) e no tempo t_4 (20 dias), verificou-se os menores valores acompanhado de um posterior aumento no teor de compostos fenólicos totais (**Fig. 29**).

Figura 29: Quantificação de Compostos Fenólicos Totais produzidos no meio intracelular durante a fase de desenvolvimento da cultura de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA e pelo teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular relação ao tempo inicial (t_0 - 2 horas).

No ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L ocorreu uma produção de compostos fenólicos totais em uma proporção 200 vezes maior em relação ao ensaio controle e a partir do t_0 (2 horas) ocorre um aumento, onde, desde o tempo de 20 dias encontrou-se valores significativos em relação ao tempo inicial (**Fig. 30**).

Na elicitação com AS na concentração de 1 mmol/L, os teores de compostos fenólicos totais apresentaram valores aumentados em relação ao controle em uma proporção de 200 vezes. Ocorreu o mesmo comportamento observado no controle onde o tempo inicial e o tempo de t_4 (20 dias) apresentaram

os menores teores (Fig. 31).

Figura 30: Quantificação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA e pelo teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular relação ao tempo inicial (t0- 2 horas).

Figura 31: Quantificação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1,0 mmol/L em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA e pelo teste de comparação de Dunnett onde se comparou a variação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular relação ao tempo inicial (t0- 2 horas).

No ensaio de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L verificou-se os menores valores de compostos fenólicos totais em relação a todos os experimentos realizados. Estes se encontraram em uma proporção 800 vezes menor que o controle. Os valores tenderam a diminuir no decorrer de todos os tempos sendo que a partir do t₃ (15 dias) passaram a ser significativos em relação ao tempo inicial (2 horas) (**Fig. 32**).

Figura 32: Quantificação de Compostos Fenólicos Totais produzidos no meio intracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5,0 mmol/L mediado em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA e pelo teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular relação ao tempo inicial (t0- 2 horas).

Comparando todos os resultados do experimento visado a quantificação de compostos fenólicos totais presentes na fração intracelular, observou-se que o ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L e 1mmol/L foram as mais eficazes para a indução da produção de compostos fenólicos da cultura de células (**Fig. 33**).

Figura 33: Comparação dos resultados da quantificação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular entre todos os ensaios de elicitação. Os ensaios são representativos de 18 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO WAY- ANOVA e pós teste de Bonferroni onde se avaliou a produção de proteínas totais liberadas para o meio extracelular em comparação com todos os demais tempos e ensaios de elicitação.

Em relação à produção de compostos fenólicos liberados para o meio extracelular, ocorreu mais uma vez um comportamento semelhante ao observado no controle intracelular, onde no tempo inicial e de 20 dias encontra-se valores mínimos seguidos de aumentos da liberação de compostos fenólicos onde os tempos t_2 e t_3 apresentaram valores significativos que demonstraram um ciclo na liberação destes para o meio extracelular (**Fig. 34**). No ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L ocorreu a liberação de compostos fenólicos totais em uma proporção de 300 vezes maior em relação ao controle (**Fig. 35**).

Figura 34: Quantificação de compostos fenólicos totais liberados para o meio extracelular no experimento controle da cultura celular de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA e pelo teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular relação ao tempo inicial (t0- 2 horas).

Figura 35: Quantificação de Compostos Fenólicos Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 0,5 mmol/L mediado em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA e pelo teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular relação ao tempo inicial (t0- 2 horas).

Os valores obtidos na elicitação com 1 mmol/L foram os menores em relação ao todos os teores de compostos fenólicos totais liberados para o meio extracelular, ficando a baixo dos valores (com exceção do t₀) em relação ao controle. Os teores de compostos fenólicos totais liberados para o meio extracelular mais expressivos foram em relação ao ensaio de 5,0 mmol/L em que apresentaram um aumento em cerca de 200 vezes em relação ao controle (**Fig. 37**).

Figura 36: Quantificação de Compostos Fenólicos Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 1 mmol/L mediado em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA e pelo teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular relação ao tempo inicial (t0- 2 horas).

Figura 37: Quantificação de Compostos Fenólicos Totais liberados para o meio extracelular durante ensaio de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L mediado em cultura de células de *Momordica charantia*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de ANOVA e pelo teste de comparação de Dunett onde se comparou a variação de compostos fenólicos totais produzidos no meio intracelular relação ao tempo inicial (t0- 2 horas).

O aumento da presença de compostos fenólicos totais é resultante da reação de hipersensibilidade induzida por AS. O Metil Jasmonato e o AS são consideradas moléculas de sinalização que desempenham um papel-chave no crescimento da planta e no desenvolvimento. Estas moléculas de sinalização estão envolvidas na transdução de sinais que induz enzimas específicas onde estas atuam na produção e formação de compostos do metabolismo secundário resultando nos mecanismos de defesa (BABAR-ALI et al. 2007).

Jones e Saxena (2013) evidenciaram que a Resposta de Hipersensibilidade e os mecanismos que levam à morte celular impedem as células vegetais de acumularem os compostos fenólicos no meio intracelular sendo que estes são liberados para o meio extracelular em grandes quantidades.

Este fato foi claramente observado onde a maior concentração de AS como elicitor resultou em uma maior quantidade de compostos fenólicos liberados para a fração extracelular.

Comparando-se os valores mínimos de compostos fenólicos intracelulares obtidos no ensaio de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L, com os valores máximos obtidos no ensaio de elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L, observou-se este efeito da liberação em grandes quantidades de compostos fenólicos induzidas por AS. Este resultado sugere que uma via carreadora de compostos fenólicos é ativada permitindo o transporte destes para o meio extracelular a fim de se evitar os mecanismos de morte celular (**Fig. 38**).

Figura 38: Comparação dos resultados da quantificação de compostos fenólicos totais liberados para o meio extracelular entre todos os ensaios de elicitação. Os ensaios são representativos de 18 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico TWO WAY- ANOVA e pós teste de Bonferroni onde se avaliou a produção de proteínas totais liberadas para o meio extracelular em comparação com todos os demais tempos e ensaios de elicitação.

Em relação à dosagem de compostos fenólicos totais, houve um drástico aumento destes durante os ensaios de elicitação com AS, sendo que o processo de elicitação fazendo uso do AS na concentração de 0,5 mmol/L evidenciou um relativo aumento na produção de compostos fenólicos na fração intracelular desde o tempo 0 até o tempo de 30 dias (**Fig. 39**) Por outro lado, em relação à concentração de compostos fenólicos liberados para o meio extracelular resultante dos processos de elicitação estes não sofreram variações consideráveis e estes se encontram na ordem de 100 vezes menor em relação à produção de compostos fenólicos no meio intracelular com exceção dos ensaios de elicitação fazendo uso do AS na concentração de 5 mmol/L que levou à produção de compostos fenólicos totais liberados para a fração extracelular na razão de 12 vezes a mais que nos demais ensaios (**Fig. 40**).

Figura 39: Comparação dos resultados da quantificação de compostos fenólicos totais no meio intracelular no ensaios de elicitação com ou sem AS em cultura de células de *Momordica charantia*.

Figura 40: Comparação dos resultados da quantificação de compostos fenólicos totais no meio extracelular no ensaios de elicitação com ou sem AS em cultura de células de *Momordica charantia*.

4.3) Determinação das Variações dos Componentes da Parede Celular da Cultura de Células de *Momordica charantia* quando elicitadas com AS

A partir dos resultados obtidos pela dosagem de açúcares redutores totais, devido a significâncias destes para entendimento do efeito de AS sobre a parede, foi estudado a percentagem relativa dos diferentes fragmentos de açúcares liberados para o meio extracelular. Para essa determinação foi utilizado padrões apresentados na **Tabela 4**. O resultado dos percentuais relativos é mostrado na **Tabela 5** e **Tabela 6**.

Tabela 4: Avaliação por HPLC dos padrões de açúcares utilizados para a determinação dos fragmentos da parede celular liberados para o meio extracelular mediante os ensaios de elicitação utilizando o AS.

CARBOIDRATO	GRAU DE POLIMERIZAÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)
Xilose	Monossacarídeo	3,98
Glicose	Monossacarídeo	4,15
Frutose	Monossacarídeo	4,60
Sacarose	Dissacarídeo	4,95
Estaquiose	Tetrassacarídeo	5,10
Maltotetraose	Tetrassacarídeo	5,75
Maltopentose	Pentassacarídeos	6,70
XXXGol	Heptassacarídeo	8,58

Tabela 5: Percentagem relativa dos fragmentos da parede celular liberados em testes de elicitação utilizando o AS nas concentrações de 0,5 mmol/L e 1,0 mmol/L.

Tempo de elicitação	Elicitação AS (0,5 mmol/L)		Elicitação AS (1 mmol/L)	
	Monossacarídeos %	Dissacarídeos %	Monossacarídeos %	Dissacarídeos %
t0 (2horas)	39,51	17,8	37,92	41,12
t1 (5 dias)	8,84	209,04	13,11	269,84
t2 (10 dias)	3,0	39,08	4,89	1,01
t3 (15 dias)	2,06	67,21	5,33	6,48
t4 (20 dias)	12,06	77,14	5,33	4,95
t5 (25 dias)	4,59	66,78	1,19	26,30
t6 (30 dias)	3,12	0,4	37,65	4,824

Tabela 6: Percentagem relativa dos fragmentos da parede celular liberados em testes de elicitação utilizando o AS nas concentrações de 5 mmol/L

Tempo de elicitação	Elicitação AS 5 mmol/L		
	Monossacarídeos %	Dissacarídeos %	Heptassacarídeos %
t0 (2horas)	16,33	156,73	100
t1 (5 dias)	190,21	242,13	- 9,32
t2 (10 dias)	420,63	117,37	103,50
t3 (15 dias)	619,90	_____	103,72
t4 (20 dias)	542,39	_____	101,79
t5 (25 dias)	578,96	_____	100,22
t6 (30 dias)	528,50	_____	128,06

Foi observado a presença de monossacarídeos e dissacarídeos sendo que a percentagem relativa de dissacarídeos significativamente maior. Este resultado nos mostra que a elicitação com o AS provoca alterações na composição da parede celular da cultura de *Momordica charantia* induzindo a liberação principalmente dissacarídeos.

Por sua vez os ensaios de elicitação realizado com AS na concentração de 5 mmol/L evidenciou a liberação de fragmentos maiores de açúcares desde o t₀ onde foi possível a detecção de heptassacarídeos liberados mediante este ensaio e a porcentagem relativa destes heptassacarídeos foi aumentada no decorrer do período de elicitação.

4.4) Determinação das Variações dos Componentes da Parede Celular da Cultura de Células de *Momordica charantia* quando elicitadas com AS por Cromatografia em Papel

Devido a não observação de fragmentos maiores de açúcares liberados mediante o ensaio de elicitação, foi realizado a técnica de separação cromatográfica em papel utilizando a técnica de detecção por Nitrato de Prata Alcalina.

Nesta técnica, devido à saturação que pode ser aplicada, foi possível identificar através da comparação com os padrões a presença de pentoses sendo que estes surgem a partir do tempo de 20 dias na elicitação com 0,5 mmol/L de AS e em todos os tempos de elicitação com AS na concentração de 1 mmol/L evidenciando uma maior agressividade desta concentração ao se avaliar o potencial do AS como agente elicitor. Já na elicitação com AS na concentração de 5 mmol/L observa-se a presença de desde o tempo t_0 a liberação de tetrassacarídeos, pentassacarídeos e heptassacarídeos evidenciando, portanto, uma relação de maior agressividade causada pelo AS resultando na liberação de fragmentos maiores de açúcares presentes na parede celular (**Figs. 41, 42, 43 e 44**)

Figura 41: Cromatografia em papel das frações liberadas para o meio extracelular em cultura de *Momordica charantia* sem elicitor (controle).

Figura 42: Cromatografia em papel das frações liberadas para o meio extracelular em cultura de *Momordica charantia* quando elicitadas com AS 0,5 mmol/L.

Figura 43: Cromatografia em papel das frações liberadas para o meio extracelular em cultura de *Momordica charantia* quando elicitadas com AS 1,0 mmol/L.

Figura 44: Cromatografia em papel das frações liberadas para o meio extracelular em cultura de *Momordica charantia* quando elicitadas com AS 5,0 mmol/L.

4.5) Obtenção e caracterização dos padrões de metabólitos secundários

As extrações realizadas a partir de folhas e caules evidenciaram a presença de metabólitos secundários, principalmente triterpenos e glicoconjugados. Esta etapa serviu para a obtenção de padrões para a posterior pesquisa na cultura de células de *Momordica charantia*. Para este estudo, foram realizadas duas extrações, onde a primeira foi descartada devido a pequena presença de metabólitos e a segunda foi dada continuidade. Devido a massa obtida nas frações de CLV e devido aos dados da cromatografia em camada delgada (CCD) optou-se pelo estudo das frações E e B (**Tabela 7**).

Partindo da cultura celular de *Momordica charantia* e, devido aos resultados obtidos através das dosagens de açúcares redutores, fenólicos e proteínas totais, optou-se ao pesquisar os metabólitos secundários a partir destas, realizando ensaios de elicitação e controle. Para este experimento, o material foi recolhido após 30 dias de crescimento, nas mesmas condições dos ensaios de elicitação.

A partir destas culturas de *M. charantia*, tanto eliciada e como do controle, a extração com DCM/ MeOH (2:1) foi realizada como descrito em Material e Métodos, e estes extratos ainda foram submetidos a *clean-up*. O material foi analisado por HPLC nas condições de 63%, 62% e 66% de acetonitrila como fase móvel.

Desta análise conseguiu-se isolar 22 moléculas onde foram observadas moléculas com tempo de retenção maior, igual ou menor do que os padrões. As substâncias que apresentaram tempo de retenção e absorbância em UV próximos ou iguais aos padrões foram analisadas em RMN ¹H para comparação e posterior elucidação estrutural destes.

Tabela 7: Massas obtidas a partir das frações resultantes da CLV, a partir de *M. charantia*.

Fração	Fase móvel		Massa Obtida
	Hexano/AcOEt (v/v)	AcOEt/MeOH (v/v)	g
A	1:0	_____	0,025
B	7:3	_____	0,110
C	1:1	_____	0,750
D	1:4	_____	0,708
E	_____	1:0	1,215
F	_____	4:1	1,791
G	_____	1:1	0,596
H	_____	1:4	0,204
I	_____	0:1	0,180

Tabela 8: Massas obtidas após análise preparativa em HPLC da fração E obtida em CLV, a partir de *M. charantia*.

Composto	Massa mg
(E ₇₋₂)	6
(E ₇₋₃)	16
(E ₇₋₄)	5
(E ₇₋₅)	2
(E ₇₋₆)	36
(E ₇₋₇)	32
(E ₇₋₈)	4
(E ₇₋₉)	9
(E ₇₋₁₀)	12

Partindo da cultura celular de *Momordica charantia* e, devido aos resultados obtidos através das dosagens de açúcares redutores, fenólicos e proteínas totais, optou-se ao pesquisar os metabólitos secundários a partir destas, realizando ensaios de elicitação e controle. Para este experimento, o material foi recolhido após 30 dias de crescimento, nas mesmas condições dos ensaios de elicitação.

A partir destas culturas de *M. charantia*, tanto eliciada e como do controle, a extração com DCM/ MeOH (2:1 v/v) foi realizada como descrito em Material e Métodos, e estes extratos ainda foram submetidos a *clean-up*. O material foi analisado por HPLC nas condições de 63%, 62% e 66% de acetonitrila como fase móvel.

Desta análise conseguiu-se isolar 22 moléculas onde foram observadas moléculas com tempo de retenção maior, igual ou menor do que os padrões. As substâncias que apresentaram tempo de retenção e absorbância em UV próximos ou iguais aos padrões foram analisadas em RMN ¹H para comparação e posterior elucidação estrutural destes.

4.6) Moléculas Obtidas e Propostas a Partir dos Padrões obtidos das Folhas de *Momordica charantia* (Frações B₃ e E₁₋₇)

Para a elucidação estrutural dos compostos obtidos por meio de separações utilizando HPLC, dentre todos os metabólitos isolados, estaremos apresentando a estrutura de três substâncias identificadas.

As substâncias 1 e 3 possuem monoglicosídeos na base de um átomo de-H anomérico (δ (H), 4,94-4,97 (d, J = 8,0, H- C (1 '))) e um átomo de C anomérico (δ (C) 101,6-101,8 (d, C (1 '))). A confirmação do açúcar foi obtida após a hidrólise ácida (Hidrólise de Saeman) como descrito em Material e Métodos. A fração glicosídica foi analisada em HPLC e confirmada como sendo uma unidade de β -Glucopiranosil.

Substância 1

A substância **1** apresentou em $[M + Na]^+$ um íon em HR-ESI-MS em m/z 495,34 que apresenta a fórmula $C_{31}H_{48}O_3$ e outro de 180,16 referente ao glicosídeo. Esta substância apresentou quatro grupos metílicos terciários, um grupo metílico secundário, um grupamento O-Me secundário, dois grupos metílicos vinílicos secundários, um grupamento aldeído (CHO) e uma hidroxila (OH) secundária.

E7-7

Nome da estrutura: (3S,7S,8S,9S,10R,13R,14S,17S)-3-hidroxi-17-((4R)-4-metoxi-6-metilept-5-en-2-il)-4,4,10,13,14-pentametil-7-(((2R,3S,4R,5R,6R)-4,5,6-triidroxi-2-(hidroxmetil)tetraidro-2H-piran-3-il)oxi)-1,2,3,4,7,8,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecaidro-9H-ciclopenta[a]fenantrene-9-carbaldeído

Fórmula Molecular: $C_{38}H_{62}O_9$

$[\alpha]^{25}_D = + 1,72$

Tempo de retenção= 13,21 min

Dados espectrais= Anexo 3.2.1

Substância 2

A substância **2** apresentou m/z 509, 35 $[M+Na]^+$. Os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C revelaram a presença de quatro grupos metílicos terciários, um grupo O-Me terciário, um grupamento OH secundário, um grupamento aldeído (CHO).

E7-6

Nome da estrutura: (3*S*,7*S*,8*S*,9*R*,10*R*,13*R*,14*R*,17*S*)-3-hidroxi-17-((*E*)-6-hidroxi-6-metilept-4-en-2-il)-7-metoxi-4,4,8,10,13,14-hexametil
1,2,3,4,7,8,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecaidro-9H ciclopenta[a]fenantrene-9-carbaldeído

Fórmula Molecular: C₃₃H₅₄O₄

$[\alpha]^{25}_D$ = +1,72

Tempo de retenção= 20,93 min

Dados espectrais= Anexo 3.3.1

Substância 3

A substância **3** apresentou m/z 431,87 no modo negativo e em m/z 180,16 $[M + Na]^+$ da fração hidrolisada. Os espectros de RMN de 1H demonstram a presença de grupamentos metoxílicos (singletos) $\delta(H)$ 0,75, 0,89, 1,20. Apresentou também um grupamento aldeído (CHO) em 9,72 (1H, s). O espectro de correlação HMBC mostrou um átomo de H anomérico onde sugere a ligação glicosídica HC(1') com C(7).

Nome da estrutura: 17-((*E*)-3,5-dimetilepta-4,6-dien-1-il)-3-hidroxi-4,4,14-trimetil-7-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-4,5,6-triidroxi-2-(hidroximetil)tetraidro-2H piran-3-il)oxi)-1,2,3,4,7,8,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecaidro-9H ciclopenta[*a*]fenanthrene-9-carbaldeído

Fórmula Molecular: $C_{36}H_{56}O_8$

$[\alpha]^{25}_D = + 0,25$

Tempo de retenção= 13.15 min

Dados espectrais= Anexo 3.3.1

4.7) Efeito do AS mediado na Produção de Metabólitos Secundários em Cultura de Células de *Momordica charantia*

A produção de metabólitos secundários é drasticamente aumentada na medida em que a concentração de AS é maior onde se confirma que o AS é uma molécula potencialmente indutora na produção de metabólitos secundários quando em contato com a cultura de células de *Momordica charantia* (Fig. 45).

Figura 45: Efeito do AS na indução da produção de metabólitos secundários em cultura de células de *Momordica charantia*. Comparação entre a produção de metabólitos secundários durante a fase de crescimento e quando elicitadas com AS nas concentrações de 0,5 mmol/L, 1,0 mmol/L e 5,0 mmol/L. Placa de Sílica para detecção em UV 256 nm. Revelador: A) Vanilina; B) *p*- Anisalaldeído. Fase móvel MeOH/ AcOEt (1:1 v/v)

5- CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos da realização deste trabalho, podemos concluir que:

1) O AS, em todas as concentrações, modulou os teores de proteínas totais, açúcares redutores e compostos fenólicos na cultura de células de *Momordica charantia*.

2) O AS desencadeou também eventos envolvendo a degradação e fragmentação da parede celular de *Momordica charantia*. Esta fragmentação da parede celular ocorre de maneira a liberar oligossacarídeos maiores quanto maior a concentração de AS.

3) A obtenção de metabólitos secundários isolados da cultura celular de *Momordica charantia* é viável, e ainda que é possível utilizar o AS como modulador nesta cultura para obtenção dos metabolitos de interesse.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; KAMAL, R. In vitro clonal propagation of *Momordica charantia* L. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 426-430, 2004.

AGARWAL, M.; KAMAL, R. Studies on flavonoid production using *in vitro* cultures of *Momordica charantia*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 277-279, 2007.

ALTANER, C.; KNOX, J. P.; JARVIS, M. C. In situ detection of cell wall polyssaccharides in sitka spruce (*Picea sitchensis* (BONG.) Carrière) Wood Tissue. **Bioresources**, v. 2, p. 284- 295, 2007.

ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais, **Documentos EMBRAPA Cerrados**, 2002.

BABAR-ALI, M.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. **Molecules**, v. 12, n.3, p. 607- 621, 2007.

BARNA, B.; FODOR, J.; HARRACH, B. D.; POGÁNY, M.; KIRÁLY, Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 30, p. 1-7, 2012.

BLUM, A.; LOERZ, C.; MARTIN, H. J.; STAAB- WEIJNITZ, C. A.; MASER, E. *Momordica charantia* extract, a herbal remedy for type 2 diabetes, contains a specific 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 1, p. 51-55, 2011.

BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M.; FURTADO, E. L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 2, p. 124-128, 2010.

BONNEY R. J., WALKER P. R., POTTER V. R. Isoenzyme patterns in parenchymal and non parenchymal cells isolated from regenerating and regenerated rat liver. **Biochemistry Journal**, v.136, p. 947-54, 1973.

BUCKERIDE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; DOS SANTOS, H. P.; LIMA, E. D. U. Polissacarídeos de Reserva de Parede Celular em Sementes. Estrutura, Metabolismo, Funções e Aspectos Ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.137-162, 2000.

CAI, Z.; KASTELL, A.; SPEISER, C.; SMETANSKA, I. Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cellviability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 2, p. 330-340, 2013.

CARPITA, N. C. Progress in the Biological Synthesis of the Plant Cell Wall: New Ideas for Improving Biomass for Bioenergy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1-8, 2011.

CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D. F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, v. 262, p. 1883-1886, 1993.

CHENG, H. L.; HUANG, H. K.; CHANG, C. I.; TSAI, C. P.; CHOU, C. H. A Cell-Based Screening Identifies Compounds from the Stem of *Momordica charantia* that Overcome Insulin Resistance and Activate AMP-Activated Protein Kinase. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 6835–6843, 2008.

CORCHETE, P.; BRU, R. Proteome alterations monitored by DIGE analysis in *Silybum marianum* cell cultures elicited with methyl jasmonate and methyl B cyclodextrin. **Journal of Proteomics**, v. 24, p. 99-108, 2014.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites), **Biochemistry e Molecular Biology of Plants**, American Society of Plant Physiologists, p. 1250- 1318, 2000.

DE MELLO, R. Caracterização dos Componentes Extracelulares produzidos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (amora- preta) durante resposta de hipersensibilidade. Dissertação de Mestrado, **Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Ribeirão Preto, 2009.

DE SOUZA, F. A. Estudo do Efeito de Hipersensibilidade sobre a parede celular em cultura de células de amora- preta (*Rubus fruticosus*). Dissertação de Mestrado, **Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Ribeirão Preto, 2007.

DE SOUZA, W. R. Estudo do efeito elicitor de Ácido Salicílico e do Polissacarídeo extraído de Paineira (*Chorisia speciosa*) em cultura de células de amora- preta (*Rubus fruticosus*). Dissertação de Mestrado, **Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Ribeirão Preto, 2005.

EICHHORN, H.; KLINGHAMMER, M.; BECH, P.; TENHAKEN, R.; Isolation of a novelABC-transporter gene from soybean induced by salicylic acid. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, p. 2193–2201, 2006.

EMBRAPA. Biorreatores: Produção de mudas com mais segurança e economia. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, DF, 2005.

ENGELBERTH, J.; VISWANATHAN, S.; ENGELBERTH, M. J. Low Concentrations of Salicylic Acid Stimulate Insect Elicitor Responses in *Zea mays* Seedlings. **Journal of Chemistry Ecology**, v. 37, p. 263-266, 2011.

FANG, E. F.; NG T. B. Bitter Gourd (*Momordica charantia*) is a Cornucopia of Health: A Review of its Credited Antidiabetic, Anti HIV, and Antitumor Properties. **Current Molecular Medicine**, v. 11, p. 417-436, 2011.

FANG, M.Q.; ZHANG, H.; CAO, Y.; WANG, C. Anti-inflammatory and free radical scavenging activities of ethanol extracts of three used as "Bolengguazi". **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 61-65, 2007.

FANG, E. F.; ZHANG, C. Z.; WONG, J. H.; SHEN, J. Y.; LI, C. H.; NG, T.B. The MAP30 protein from bitter gourd (*Momordica charantia*) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v. 324, p. 66-74, 2012.

FERRI, M.; TASSONI, A.; FRANCESCHETTI, M.; RIGHETTI, L.; NALDRETT, M.J.; BAGNI, N. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. **Proteomics**, v. 9, p. 610- 624, 2009.

FERRI, M.; RIGHETTI, L.; TASSONI, A. Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures. **Journal Plant Physiology**, v.163, n. 3, p. 189-95, 2011.

FUMAGALI E.; GONÇALVES R. A. C.; MACHADO M. F. P. S.; SILVA. M. F. F. P.; VIDOTI, G. J.; DE OLIVEIRA, A. J. B. Produção de Metabólitos Secundários em Cultura de Células e Tecidos de Plantas: O Exemplo Dos Gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GREC S, VANHAM D, DE RIBAU COURT JC, PURNELLE B, BOUTRY M. Identification of regulatory sequence elements within the transcription promoter region of *NpABC1*, a gene encoding a plant ABC transporter induced by diterpenes. **Plant Journal**, v. 35, p. 237-250, 2003.

HAYOT, C. M.; FOROUZESH, E.; GOEL, A.; AVRAMOVA, Z.; TURNER, J. A. Viscoelastic properties of cell walls of single living plant cells determined by dynamic nanoidentification. **Journal of Experimental Botany Advance**, v. 65, n. 21, p. 1-16, 2012.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 30, p. 1028-1065, 2013.

HOLOPAINE, J. K.; HEIJARI, J.; NERG, A. -M.; VOURINEN, M.; KAINULAINEN, P. Potential for the Use of Exogenous Chemical Elicitors in Disease and Insect Pest Management of Conifer Seedling Production. **The Open Forest Science Journal**, v. 2, p. 17-24, 2009.

HOUGH L.; JONES, J. K. N. Chromatography on paper. **Methods Carbohydrates Chemistry**, v. 1, p 21-31, 1962.

HSU, H. Y.; LIN, J. H.; LI, C. J.; TSANG, S. F.; TSAI C. H.; CHYUAN J. H.; CHIU, S. J.; CHUANG, S. E. Antimigratory Effects of the Methanol Extract from *Momordica charantia* on Human Lung Adenocarcinoma CL1 Cells. **Evidences Based Complement Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-12. 2012.

HUANG, L.; ADACHI, T.; SHIMIZU, Y.; GOTO, Y.; TOYAMA, J.; TANAKA, H.; AKASHI, R.; SAWAGUCHI, A.; IWATA, H.; HAGA T. Characterization of lectin isolated from *Momordica charantia* seed as a B cell activator. **Immunology Letters**, v. 121, n. 2, p. 148-156, 2008.

HUANG, C.; QIAN, Z. G.; ZHONG, J. J. Enhancement of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax ginseng* by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide elicitation. **Journal of Biotechnology**, v. 165, n. 10, p. 30-36, 2013.

IRITI, M.; FAORO, F. Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3371-3399, 2009.

JONES, A. M. P.; SAXENA, P. K. Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture. **PLoS ONE** v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431 pp., 2004.

KIBDY, D. K.; DAVIDSON, D.J. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. **Anal. Biochem**, v. 55, n.1, p. 321-325, 1973.

KIKUCHI, T.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; WATANABE, K.; ISHII, K.; YAMAMOTO, A.; FUKATSU, M.; TANAKA, R.; AKIHISHA, T. Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Momordica charantia*. **Chemistry e Biodiversity**, v. 9, n. 7, p. 1221-1230, 2012.

KNOX, J. P. Cell Adhesion, Cell Separation and Plant Morphogenesis. **Plant Journal**, v. 2, n. 2, p. 137-141, 1992.

KNOX, J. P. The Use of Antibodies to Study the Architecture and Developmental Regulation of Plant Cell Walls. **International Review of Cytology**, v. 171, p. 79-120, 1997.

KNOX, J. P. Revealing the Structural and Functional Diversity of Plant Cell Wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 308-313, 2008.

KNOX, J. P. Arabinogalactan- proteins (AGPs) and Plant Cell Development. **Foods Food Ingredient**, v. 12, n. 1, p. 1751-1767, 2006.

KIM, Y.; WYSLOUZIL, B. E.; WEATHERS, P. J. Secondary Metabolism of Hairy Root Cultures in Bioreactors. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, v. 38, p. 1-10, 2002.

LEE, Y. S.; JU, H. K.; KIM, Y. J.; LIM, T. G.; UDDIN M. R.; KIM, Y. B.; BAEK, J. H.; KWON, S. W.; LEE, K. W.; SEO, H.; PARK, S. U.; YANG, T. J.; Enhancement of anti-inflammatory activity of Aloe vera adventitious root extracts through the alteration of primary and secondary metabolites via salicylic acid elicitation. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. 1-13, 2013.

LEITE, G. H. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; LIMA, G. P. P.; SILVA, M. A. Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 718-725, 2009.

LENZI, M.; ORTH, A.I.; GUERRA, T. M. Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), em Florianópolis, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 505-513, 2005.

LEROUX, O.; LEROUX, F.; BAGNIEWSKA- ZADWORNA, A.; KNOX, J. P.; CLAEYS, M.; BALS, S.; VIANE, R. L. L. Ultrastructure and composition of cell wall appositions in root of *Asplenium* (Polypodiales). **Micron**, v. 42, p. 863- 870, 2011.

LI, Z. C.; Mc CLURE, J. W.; HAGERMAN, A. E. Soluble and Bound Apoplastic Activity for Peroxidase, β -D-Glucosidase, Malate Dehydrogenase, and Nonspecific Arylesterase, in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Oat (*Avena sativa* L.) Primary leaves. **Plant Physiology**, v. 90, p. 185-190, 1989.

LIMA, J. F.; Estabelecimento da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos secundários. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Ribeirão Preto, 2009.

LIMA, G. P. P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A. M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Scientia Agricola**, v. 56, n. 1, p. 21-25, 1999.

LO, HY.; HO, TY.; LIN, C.; LI, C. C.; HSIANG, C. Y. Momordica charantia and Its Novel Polypeptide Regulate Glucose Homeostasis in Mice via Binding to Insulin Receptor. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 10, p. 2461- 248, 2013.

LYNGE J., JUEL, C.; HELLSTEN, Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. **Journal Physiology**, v. 537, n. 2, p. 597-605, 2001.

MACÊDO, N. A. Manual de Técnicas em Histologia Vegetal, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2ª edição, 96 p. Bahia, 1997.

MALAMY, J.; KLESSIG, J. P. C. D.; RASKIN, I. Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. **Science**, v. 250, p. 1002-1004, 1990.

MALINOWSKA M, SIKORA E, OGONOWSKI J. Production of triterpenoids with cell and tissue cultures. **Acta Biochim Polonica**, v. 60, n. 4, p. 731-735, 2013.

MENG, Y.; LIU, S.; LI, J.; MENG, Y.; ZHAO, X. Preparation of an antitumor and antiviral agent: chemical modification of α -MMC and MAP30 from *Momordica Charantia* L. with covalent conjugation of polyethylene glycol. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3133–3142, 2012.

MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA E. T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, p. 73-79, 2003.

MUNDY, D.C.; BERESFORD, R. M. Susceptibility of grapes to *Botrytis cinerea* in relation to berry nitrogen and sugar concentration. **New Zealand Plant Protection**, v. 60, p. 123–127, 2007.

MUNÉ- BOSH; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. **Plant Physiology**, v. 161, p. 5-19, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, p. 473- 497, 1962.

NEGRI, G. Diabetes Mellitus: Plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 2, p. 120-142, 2005.

NOVÁKOVÁ, M.; SAŠEK, V.; DOBREV, P. I.; VALENTOVÁ, O.; BURKETOVÁ, L. Plant hormones in defense response of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum* - Reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 4, p. 308- 317, 2014.

OUJI, Y.; YOSHIKAWA, M.; MORIYA, K.; NISHIOFUKU, M.; OUJI-SAGESHIMA, N.; MATSUDA, R.; NISHIMURA, F.; ISHIZAKA, S. Isolation and characterization of murine hepatocytes following collagenase infusion into left ventricle of heart. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 4, p. 487-490, 2010.

PIETERSE, C. M.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN RWEES, S. C. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 21-33, 2012

PITCHAKARN, P.; OGAWA, K.; SUZUKI, S.; TAKAHASHI, S.; ASAMOTO, M.; CHEWONARIN, T.; LIMTRAKUL, P.; SHIRAI, T. Momordica charantia leaf extract suppresses rat prostate cancer progression *in vitro* and *in vivo*. **Japanese Cancer Association**, v. 101, p. 2234-2240, 2010.

PITCHAKARN, P.; SUZUKI, S.; OGAWA, K.; POMPIMON, W.; TAKAHASHI, S.; ASAMOTO, M.; LIMTRAKUL, P.; SHIRAI, T.; Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf, modulates the progression of androgen-independent human prostate cancer cell line, PC3. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 840-847, 2012.

POLLIER, J.; MOSES, T.; GONZÁLEZ-GUZMÁN, M.; DE GEYTER, N.; LIPPENS, S.; VANDEN BOSSCHE, R.; MARHAVÝ, P.; KREMER, A.; MORREEL, K.; GUÉRIN, C. J.; TAVA, A.; OLESZEK, W.; THEVELEIN, J. M.; CAMPOS, N.; GOORMACHTIG S.; GOOSSENS A. The protein quality control system manages plant defence compound synthesis. **Nature**, v. 504, n. 7478, p. 148-152, 2013.

PRIETO, D.; CORCHETE, P. Transport of flavonolignans to the culture medium of elicited cell suspensions of *Silybum marianum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 63-68, 2014.

REINHARD KORBINIAN PROELS, R. K.; HÜCKELHOVEN, R. Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 8, p. 858-864, 2014.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p.123-1230, 2003.

RUFFER, M.; STEIPE B.; . ZENK M.H. Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. **FEBS Letters**, v. 377, n. 2, p. 175-180, 1995.

SALZMANN, R.A.; TIKHONOVA, I.; BORDELON, B.P.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. **Plant Physiology**, v. 117, p. 465-472, 1998.

SASABE ,M.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; INAGAKI, Y.; ICHINOSE, Y. cDNA cloning and character-ization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. **FEBS Letters**, v. 518, p. 164-168, 2002.

SAŠEK, V.; JANDA, M.; DELAGE, E.; PUYAUBERT, J.; GUIVARC'H, A.; LÓPEZ MASEDA, E.; DOBREV, PI.; CAIUS, J.; , BÓKA, K.; VALENTOVÁ, O.; BURKETOVÁ, L.; ZACHOWSKI, A.; RUELLAND, E. Constitutive salicylic acid accumulation in *Arabidopsis* plants stunts rosette but not root growth. **The New Phytologist**, v. 24, p. 805-816, 2014.

SLAYMAKER, D.H.; NAVARRE, D.A.; CLARK, D.; DEL POZO, O.; MARTIN, G. B.; KLESSIG, D. F. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. **PNAS** v. 99, n. 18, p. 11640-11645, 2002.

SUZUKI, K. Elicitor Signal Transduction That Leads to Hypersensitive Reaction in Cultured Tobacco Cells. **Plant Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 343-351, 1999.

SINGH , J.; CUMMING, E.; MANOHARAN, G.; KALASZ, H.; ADEGHATE, E. Medicinal Chemistry of Anti-diabetic effects of *Momordica Charantia*: Active Constituents and Models of Actions. **The Open Medicine Chemistry Journal**, v. 5, p. 70-77, 2001.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

SOARES, A. M.S.; MACHADO, O. L.T. Defesa de plantas: Sinalização Química e Espécies de reativas de Oxigênio. **Revista trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; Vieira-Jr G. M.; Mariane; AYRES, C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. **Critical reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 29-43, 2007.

SUMIDA, D. H.; OKAMOTO, M. M.; LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; HELL, N. S. Esquema de Restrição Alimentar Altera a Resposta Celular à Insulina em Ratos Diabéticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 44, n. 4, 2000.

TAN, M. J.; YE, J. TURNER, BEHRENS, G.H; KE, C-K.; TANG, C.H. CHEN, T.; WEISS, H-C.; GESING, E-R.; ROWLAND, A.; JAMES, D. E. YE, Y. Antidiabetic Activities of Triterpenoids Isolated from Bitter Melon Associated with Activation of the AMPK Pathway. **Chemistry and Biology**, v. 15, p. 263-273, 2008.

TAUZIN, A. S.; GIARDINA, T. Sucrose invertases, a part of the plant defense response to biotic stress. **Frontiers in the plant Science**. v. 5, p. 1-8, 2014.

THIMMAPPA, R.; GEISLER, K.; LOUVEAU, T.; O'MAILLE P.; OSBOURN, A. Triterpene Biosynthesis in Plants. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 65, p. 225-257, 2014.

TOSHIHIRO, A.; NAOKI, H.; HARUKUNI, T.; MOTOHIKO, U.; HIROYUKI, A.; YUICHI, Y.; YUMIKO, K.; TAKASHI S.; HOYOKU, N. Cucurbitane-Type Triterpenoids from the Fruits of *Momordica charantia* and Their Cancer Chemopreventive Effects. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1233-1239, 2007.

TREVELIAN, W. E.; PROTECTOR, D. P. HARRISON, J. S. Detection of sugar on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444-445, 1950.

TRUJILLO- VILLANUEVA, K.; PIÑA, J.; GONZÁLES, M. M.; BENÍTEZ, E. R.; FLOTA, F. V. The sequential exposure to jasmonat, salicylic acid and yeast extract promotes sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. **Biotechnology Letter**, v. 34, p. 379-385, 2011.

VERHERTBRUGGEN, Y.; MARCUS, E.; HAEGER, A.; ORTIZ, J. J.; KNOX, J. P. An extended set of monoclonal antibodies to pectin homogalacturonan. **Carbohydrate Research**, v. 344, p.1852-1862, 2009.

VIRDI, J.; SIVAKAMI, S.; SHAHANI, S.; SUTHAR, A.C.; BANAVALIKAR, M. M.; BIYANI, M. K. Antihyperglycemic effects of three extract from *Momordica charantia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 107-111, 2003.

WANG, B-L.; ZHANG, W.; ZHAO, J.; WANG, F.; FAN, L.; WU, Y.; HU, Z. Gene cloning and expression of a novel hypoglycaemic peptide from *Momordica charantia*. **Journal Science Food Agriculture**, v. 91, p. 2443-2448, 2011.

WANG, X.; SUN, W.; CAO, J.; QU, H.; BI, X.; ZHAO, Y. Structures of new triterpenoids and cytotoxicity activities of the isolated major compounds from the fruit of *Momordica charantia* L. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3927-3933, 2012.

WILD, S; ROGLIC G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

YAKASI, K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. **FEBS Letters**, v. 580, p. 1183-1191, 2006.

YAN S, DONG X. Perception of the plant immune signal salicylic acid. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 20, p. 64-68, 2014.

YAO, X.; LI, J.; DENG, N.; WANG, S.; MENG, Y.; SHEN, F. Immunoaffinity purification of α -momorcharin from bitter melon seeds (*Momordica charantia*) **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 1-7, 2011.

XIE, Z.; CHEN, Z. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 13, n. 2, p. 183-190, 2000.

ZÁMOCKÝ, M.; GASSELHUBER, B.; FURTMÜLLER, P.; OBINGR, C. Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 252, n. 2 p. 131-144, 2012.

ZHANG, J.; HUANG, Y.; KIKUCHI, T.; TOKUDA, H.; SUZUKI, N.; INAFUKU, K.; MIURA, M.; MOTOHASHI, S.; SUZUKI, T.; AKIHISA T. Cucurbitane triterpenoids from the leaves of *Momordica charantia*, and their cancer chemopreventive effects and cytotoxicities. **Chemistry e biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 428-440, 2012.

ZIMMET, P.; ALBERTIK, G. M. M.; Shaw Jonathan. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782-787, 2001.

7- ANEXOS

ANEXO 1

**AUTORIZAÇÃO CONCEDIDA PELO IBAMA PARA REALIZAÇÃO DOS
EXPERIMENTOS UTILIZANDO A ESPÉCIE *Momordica charantia***

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 35575-2	Data da Emissão: 20/07/2012 13:48
Dados do titular	
Nome: Vitor Francisco dos Santos	CPF: 059.891.426-92

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPECIE	Momordica charantia

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 67348211

Página 1/1

ANEXO 2

RMN 1H das frações Obtidas em CLV (B- I)

Anexo 2.1: Espectro de ¹H RMN da fração B Obtida em CLV.

Anexo 2.2: Espectro de ¹H RMN da fração C Obtida em CLV.

Anexo 2.3: Espectro de ¹H RMN da fração D Obtida em CLV.

Anexo 2.4: Espectro de ¹H RMN da fração E Obtida em CLV.

Anexo 2.5: Espectro de ¹H RMN da fração F Obtida em CLV.

Anexo 2.6: Espectro de ¹H RMN da fração G Obtida em CLV.

Anexo 2.7: Espectro de ¹H RMN da fração H Obtida em CLV.

Anexo 2.8: Espectro de ¹H RMN da fração I Obtida em CLV.

ANEXO 3

Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e as correlações COSY, ^{13}C DEPT- 135, HMBC e HMQC dos padrões obtidos para a pesquisa de metabólitos secundários.

Acquisition Time (sec)	3.8535	Date	24 Oct 2013 17:20:16	Date Stamp	24 Oct 2013 17:20:16
File Name	C:\Users\VitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\FRE 7-411.tif	Origin	spec	Frequency (MHz)	500.13
Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Owner	root
Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	574.70	Solvent	CHLOROFORM-d
Spectrum Offset (Hz)	3488.3718	Spectrum Type	STANDARD	SWH (ppm)	8503.40
		SWH (Hz)	8503.40	Temperature (degree C)	24.000

¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.76 (d, J=6.49 Hz, 3 H) 0.87 - 1.09 (m, 12 H) 1.22 - 1.45 (m, 13 H) 1.60 (br. s., 28 H) 1.67 - 1.86 (m, 12 H) 1.91 (d, J=8.30 Hz, 3 H) 2.01 (s, 3 H) 2.10 (s, 2 H) 2.19 (d, J=15.05 Hz, 3 H) 2.34 (br. s., 2 H) 2.40 - 2.61 (m, 3 H) 2.70 (d, J=7.01 Hz, 1 H) 3.49 (s, 1 H) 3.57 (br. s., 1 H) 3.72 (br. s., 1 H) 3.80 (d, J=5.71 Hz, 1 H) 3.97 (d, J=4.67 Hz, 1 H) 4.09 (d, J=7.01 Hz, 1 H) 4.29 (d, J=6.23 Hz, 1 H) 4.99 - 5.17 (m, 1 H) 5.90 (br. s., 1 H) 7.26 (s, 6 H) 9.69 - 9.77 (m, 1 H)

No.	(ppm)	Annotation	Layer No.	Created By	Created At	Modified By	Modified At
1	[-0.01 .. 0.01]	TMS	1	VitorFrancisco	qui 27/02/2014 16:27:52		

No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	0.07	34.8	0.0287	15	1.18	590.9	0.0213	29	1.90	952.1	0.0392	43	3.57	1787.2	0.0482
2	0.76	379.1	0.1137	16	1.22	610.1	0.0340	30	1.92	960.4	0.0465	44	3.67	1834.9	0.0238
3	0.77	385.6	0.0832	17	1.26	623.1	0.02418	31	2.01	1005.3	0.2852	45	3.72	1856.3	0.0142
4	0.89	446.9	0.0412	18	1.28	637.9	0.0563	32	2.10	1051.8	0.0745	46	3.79	1898.7	0.0232
5	0.92	461.4	0.1675	19	1.31	653.9	0.0821	33	2.17	1087.6	0.0293	47	3.80	1902.4	0.0190
6	0.94	489.7	0.1131	20	1.32	662.3	0.0772	34	2.20	1102.6	0.0299	48	3.97	1984.2	0.0388
7	0.96	478.8	0.0644	21	1.35	677.0	0.0440	35	2.34	1171.9	0.0176	49	3.98	1988.8	0.0381
8	0.98	491.5	0.0648	22	1.37	696.4	0.0485	36	2.46	1229.8	0.0148	50	4.08	2041.0	0.0225
9	1.00	498.2	0.0644	23	1.60	800.3	0.4828	37	2.49	1243.8	0.0144	51	4.09	2048.0	0.0210
10	1.01	503.2	0.0418	24	1.74	870.1	0.1380	38	2.53	1263.8	0.0253	52	4.14	2072.9	0.0137
11	1.02	506.1	0.0427	25	1.75	878.9	0.0877	39	2.55	1274.7	0.0258	53	4.16	2081.0	0.0131
12	1.04	518.7	0.0362	26	1.79	894.8	0.0580	40	2.69	1347.3	0.0114	54	4.29	2144.3	0.0112
13	1.06	528.6	0.2045	27	1.82	907.7	0.0636	41	2.71	1354.3	0.0115	55	4.30	2150.5	0.0112
14	1.15	576.4	0.0210	28	1.85	924.6	0.0333	42	3.49	1748.7	0.0428	56	4.96	2480.1	0.0180

Shift1 (ppm)	H's	Type	J (Hz)	Multiplet	Connections	(ppm)
1	0.76	3	d	M01	-	[0.73 .. 0.82]
2	0.98	12	m	M02	-	[0.87 .. 1.09]
3	1.30	13	m	M03	-	[1.22 .. 1.45]
4	1.60	28	br. s.	M04	-	[1.51 .. 1.67]
5	1.79	12	m	M05	-	[1.67 .. 1.96]
6	1.91	3	d	M06	-	[1.88 .. 1.96]
7	2.01	3	s	M07	-	[1.96 .. 2.05]
8	2.10	2	s	M08	-	[2.06 .. 2.14]
9	2.19	3	d	M09	-	[2.14 .. 2.27]
10	2.34	2	br. s.	M10	-	[2.28 .. 2.40]
11	2.51	3	m	M11	-	[2.40 .. 2.61]
12	2.70	1	d	M12	M18	[2.62 .. 2.80]
13	3.49	1	s	M13	-	[3.31 .. 3.53]
14	3.67	1	br. s.	M14	-	[3.53 .. 3.62]
15	3.72	1	br. s.	M15	-	[3.69 .. 3.75]
16	3.80	1	d	M16	-	[3.76 .. 3.88]
17	3.97	1	d	M17	-	[3.89 .. 4.02]
18	4.09	1	d	M18	M12	[4.03 .. 4.12]
19	4.29	1	d	M19	-	[4.23 .. 4.40]
20	5.08	1	m	M20	-	[4.99 .. 5.17]
21	5.90	1	br. s.	M21	-	[5.86 .. 6.00]
22	7.26	6	s	M22	-	[7.23 .. 7.34]
23	9.73	1	m	M23	-	[9.69 .. 9.77]

Anexo 3.2.1: Espectro de ^1H RMN composto 1

Acquisition Time (sec)	1.0420	Date	25 Oct 2013 03:21:52	Date Stamp	25 Oct 2013 03:21:52
File Name	C:\Users\VictorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\FRE 7-415.fid	Origin	spec	Frequency (MHz)	125.76
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	6144	Original Points Count	32768
Owner	root	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
SW (Hz)	31446.54	Solvent	CHLOROFORM-d	Receiver Gain	32768.00
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	31445.58	Temperature (degree C)	24.800
				Spectrum Offset (Hz)	13789.4014

¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm -6.17 (s, 1 C) 1.27 (s, 1 C) 17.05 (s, 1 C) 20.68 (s, 1 C) 27.92 (s, 1 C) 33.84 (s, 1 C) 36.25 (s, 1 C) 39.47 (s, 1 C) 44.38 (s, 1 C) 45.92 (s, 1 C) 47.99 (s, 1 C) 49.81 (s, 1 C) 54.23 (s, 1 C) 54.80 (s, 1 C) 61.52 (s, 1 C) 64.83 (s, 1 C) 72.79 (s, 1 C) 76.82 (s, 1 C) 77.08 (s, 1 C) 77.33 (s, 1 C) 79.80 (s, 1 C) 106.52 (s, 1 C) 109.95 (s, 1 C) 111.84 (s, 1 C) 115.64 (s, 1 C) 119.62 (s, 1 C) 125.34 (s, 1 C) 132.60 (s, 1 C) 137.97 (s, 1 C) 150.51 (s, 1 C) 151.08 (s, 1 C) 211.71 (s, 1 C) 225.64 (s, 1 C)

VFRE 7-4.015 esp
Vertical Scale Factor = 1

No.	Shift1 (ppm)	C's	Type	Multiplet1	No.	Shift1 (ppm)	C's	Type	Multiplet1
1	-6.17	1	s	M01	10	45.92	1	s	M10
2	1.27	1	s	M02	11	47.99	1	s	M11
3	17.05	1	s	M03	12	49.81	1	s	M12
4	20.68	1	s	M04	13	54.23	1	s	M13
5	27.92	1	s	M05	14	54.80	1	s	M14
6	33.84	1	s	M06	15	61.52	1	s	M15
7	36.25	1	s	M07	16	64.83	1	s	M16
8	39.47	1	s	M08	17	72.79	1	s	M17
9	44.38	1	s	M09	18	76.82	1	s	M18

No.	Shift1 (ppm)	C's	Type	Multiplet1	(ppm)	No.	Shift1 (ppm)	C's	Type	Multiplet1	(ppm)
19	77.08	1	s	M19	[77.06 .. 77.10]	27	125.34	1	s	M27	[125.32 .. 125.37]
20	77.33	1	s	M20	[77.31 .. 77.35]	28	132.60	1	s	M28	[132.58 .. 132.62]
21	79.80	1	s	M21	[79.78 .. 79.83]	29	137.97	1	s	M29	[137.95 .. 138.00]
22	106.52	1	s	M22	[106.49 .. 106.54]	30	150.51	1	s	M30	[150.49 .. 150.54]
23	109.95	1	s	M23	[109.93 .. 109.98]	31	151.08	1	s	M31	[151.05 .. 151.10]
24	111.84	1	s	M24	[111.82 .. 111.87]	32	211.71	1	s	M32	[211.68 .. 211.73]
25	115.64	1	s	M25	[115.61 .. 115.66]	33	225.64	1	s	M33	[225.62 .. 225.66]
26	119.62	1	s	M26	[119.60 .. 119.64]						

No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	-6.17	-776.0	0.0112	8	39.47	4963.8	0.0115	15	61.52	7736.3	0.0069
2	1.27	159.7	0.0097	9	44.38	5580.8	0.0116	16	64.83	8152.8	0.0106
3	17.05	2144.3	0.0104	10	45.92	5774.7	0.0123	17	72.79	9153.7	0.0104
4	20.68	2601.1	0.0110	11	47.99	6035.7	0.0109	18	76.82	9660.4	0.8858
5	27.92	3510.8	0.0110	12	49.81	6264.1	0.0114	19	77.08	9683.0	0.9985
6	33.84	4255.5	0.0131	13	54.23	6819.8	0.0136	20	77.33	9724.7	1.0000
7	36.25	4558.8	0.0106	14	54.80	6891.8	0.0114	21	79.80	10035.6	0.0104
								28	132.60	16675.6	0.0109

No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height
29	137.97	17351.2	0.0107	22	106.52	13395.5	0.0111	23	109.95	13827.3	0.0109
30	150.51	18928.0	0.0098	24	111.84	14066.3	0.0100	25	115.64	14542.3	0.0111
31	151.08	18999.0	0.0106	26	119.62	15043.2	0.0108	27	125.34	15763.0	0.0105
32	211.71	26623.6	0.0097								
33	225.64	28373.9	0.0094								

Anexo 3.2.2: Espectro de ¹³C RMN composto 1.

Acquisition Time (sec)	(0.1204, 0.0376)	Comment	5 mm QNP 1H/15N/1H Z-GRD Z5526/0002
Date	24 Oct 2013 19:22:48		
File Name	C:\Users\VitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\FRE 7-4\300\PDATA\1\2rr		
Frequency (MHz)	(500.13, 500.13)	Nucleus	(1H, 1H)
Number of Transients	8	Origin	spect
Original Points Count	(1024, 320)	Owner	root
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	cosygpgf
Solvent	CDCl3	Spectrum Type	COSY
Sweep Width (Hz)	(8495.10, 8495.10)	Temperature (degree C)	24.100
Title			

VFRE 7-4.300.001.2rr.esp

Anexo 3.2.3: Espectro de correlação ^1H , ^1H - COSY composto 1

Acquisition Time (sec)	(0.2408, 0.0115)	Comment	5 mm QNP 1H/15N/1H Z-GRD Z5526/0002
Date	24 Oct 2013 23:03:52		
File Name	C:\Users\VitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\VFRE 7-4\500\PDATA\1\2rr		
Frequency (MHz)	(500.13, 125.77)	Nucleus	(1H, 13C)
Origin	spect	Original Points Count	(2048, 320)
Points Count	(2048, 1024)	Pulse Sequence	hmbcgp1pndqf
Spectrum Type	HMBC	Sweep Width (Hz)	(8499.25, 27905.68)
Title	HMBCGP	Solvent	CDCl3
		Temperature (degree C)	27.800

VFRE 7-4.500.001.2rr.esp

Anexo 3.2.4: Espectro de correlação HMBC composto 1

Acquisition Time (sec)	(0.2408, 0.0141)	Comment	5 mm QNP 1H/15N/1H Z-GRD Z5526/0002
Date	24 Oct 2013 21:10:42		
File Name	C:\Users\VitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\VFRE 7-4\400\PDATA\1\2rr		
Frequency (MHz)	(500.13, 125.77)	Nucleus	(1H, 13C)
Origin	spect	Original Points Count	(2048, 320)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hsqcetgp
Spectrum Type	HSQC	Sweep Width (Hz)	(8495.10, 22602.34)
Temperature (degree C)	24.400	Title	

VFRE 7-4.400.001.2rr.esp

Anexo 3.2.5: Espectro de correlação HMQC composto 1

Anexo 3.3.1: Espectro de ¹H RMN composto 2.

No.	Shift1 (ppm)	C's	Type	Multiplet1	(ppm)	No.	Shift1 (ppm)	C's	Type	Multiplet1	(ppm)
19	76.75	1	s	M19	[76.72 .. 76.77]	22	139.37	1	s	M22	[139.35 .. 139.39]
20	123.65	1	s	M20	[123.63 .. 123.67]	23	145.23	1	s	M23	[145.21 .. 145.25]
21	124.82	1	s	M21	[124.80 .. 124.85]	24	207.55	1	s	M24	[207.52 .. 207.57]

Anexo 3.3.2: Espectro de ^{13}C RMN composto 2

Acquisition Time (sec)	(0.1425, 0.0445)	Comment	5 mm QNP 1H/15N/1H Z-GRD Z5526/0002	
Date	18 Nov 2013 09:58:06			
File Name	C:\Users\WitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\FRE 7-6\300\PDAT\112rr			
Frequency (MHz)	(500.13, 500.13)	Nucleus	(1H, 1H)	Number of Transients
Origin	spect	Original Points Count	(1024, 320)	Owner
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	cosygpgf	Solvent
Spectrum Type	COSY	Sweep Width (Hz)	(7176.89, 7176.89)	Temperature (degree C)
Title	COSY			

VFRE 7-6.300.001.2rr.esp

Anexo 3.3.3: Espectro de correlação ^1H , ^1H - COSY composto 2

Anexo 3.3.4: Espectro de correlação ^{13}C - DEPT composto 2.

Acquisition Time (sec)	(0.2851, 0.0115)	Comment	5 mm QNP 1H/15N/1H Z-GRD Z5526/0002
Date	14 Nov 2013 22:52:48		
File Name	C:\Users\VitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\VFRE 7-6\500\PDATA\1\2rr		
Frequency (MHz)	(500.13, 125.77)	Nucleus	(1H, 13C)
Origin	spect	Original Points Count	(2048, 320)
Points Count	(2048, 1024)	Pulse Sequence	hmbcgp1pndqf
Spectrum Type	HMBC	Sweep Width (Hz)	(7180.40, 27905.68)
Title	HMBCGP	Temperature (degree C)	28.400

VFRE 7-6.500.001.2rr.esp

Anexo 3.3.5: Espectro de correlação HMBC composto 2.

Acquisition Time (sec)	(0.2851, 0.0141)	Comment	5 mm QNP 1H/15N/1H Z-GRD Z5526/0002		
Date	18 Nov 2013 09:54:24				
File Name	C:\Users\VitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\VFRE 7-6/400\PDATA\1\2rr				
Frequency (MHz)	(500.13, 125.77)	Nucleus	(1H, 13C)	Number of Transients	16
Origin	spect	Original Points Count	(2048, 320)	Owner	root
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hsqcetgp	Solvent	CDCl3
Spectrum Type	HSQC	Sweep Width (Hz)	(7176.89, 22602.34)		
Temperature (degree C)	24.400	Title			

VFRE 7-6.400.001.2rr.esp

Anexo 3.3.6: Espectro de correlação HMQC composto 2.

No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	0.08	30.2	0.0368	15	1.22	608.3	0.0702	29	1.70	848.9	0.0657	43	2.37	1187.3	0.0303
2	0.76	379.4	0.0102	16	1.24	619.2	0.0657	30	1.71	856.9	0.0653	44	2.40	1202.1	0.0157
3	0.87	436.8	0.0373	17	1.26	630.9	0.2180	31	1.79	895.6	0.0668	45	2.45	1223.1	0.0159
4	0.89	443.5	0.0528	18	1.28	639.5	0.0974	32	2.02	1009.0	0.2179	46	2.50	1251.4	0.0159
5	0.90	451.1	0.0424	19	1.28	641.3	0.0989	33	2.06	1031.3	0.0205	47	2.54	1270.8	0.0142
6	0.93	464.0	0.0332	20	1.32	658.9	0.0721	34	2.10	1051.8	0.0270	48	2.58	1282.1	0.0150
7	0.99	494.9	0.0451	21	1.33	665.7	0.0702	35	2.16	1078.3	0.0246	49	2.60	1302.2	0.0145
8	1.00	501.7	0.0455	22	1.45	723.8	0.0336	36	2.18	1090.7	0.0229	50	2.63	1315.7	0.0634
9	1.03	514.1	0.0240	23	1.46	731.8	0.0371	37	2.27	1136.2	0.0190	51	2.85	1427.6	0.0173
10	1.07	533.6	0.0297	24	1.48	739.1	0.0386	38	2.29	1145.5	0.0179	52	3.50	1750.4	0.0306
11	1.08	538.8	0.0270	25	1.50	751.6	0.0412	39	2.32	1161.3	0.0228	53	3.62	1808.8	0.0095
12	1.12	559.0	0.0257	26	1.52	758.3	0.0418	40	2.34	1168.8	0.0225	54	3.65	1824.1	0.0137
13	1.17	582.9	0.0329	27	1.52	761.4	0.0453	41	2.34	1172.0	0.0225	55	3.70	1849.5	0.0122
14	1.20	602.1	0.0565	28	1.66	830.5	0.0882	42	2.36	1180.0	0.0305	56	3.73	1863.0	0.0094

Shift (ppm)	H's	Type	J (Hz)	Multiplet	Connections	(ppm)
1	0.08	1	s	M01	-	10.02 .. 0.09
2	0.90	5	m	M02	-	10.83 .. 0.90
3	1.03	4	m	M03	-	10.96 .. 1.09
4	1.12	1	br. s.	M04	-	11.10 .. 1.14
5	1.25	21	m	M05	-	11.16 .. 1.39
6	1.49	10	m	M06	-	11.39 .. 1.59
7	1.69	18	m	M07	-	11.60 .. 1.75
8	1.79	10	br. s.	M08	-	11.75 .. 1.90
9	2.02	5	s	M09	-	11.90 .. 2.04
10	2.06	1	br. s.	M10	-	12.04 .. 2.09
11	2.10	1	br. s.	M11	-	12.08 .. 2.13
12	2.17	2	d	M12	-	12.13 .. 2.22
13	2.34	4	m	M13	-	12.23 .. 2.42
14	2.45	1	br. s.	M14	-	12.43 .. 2.47
15	2.52	1	d	M15	-	12.47 .. 2.59
16	2.61	2	m	M16	-	12.56 .. 2.74
17	2.65	2	s	M17	-	12.74 .. 2.89
18	3.50	1	s	M18	-	13.36 .. 3.59
19	3.63	1	d	M19	-	13.56 .. 3.67
20	3.73	1	m	M20	-	13.67 .. 3.79
21	3.84	2	m	M21	-	13.79 .. 3.97
22	4.10	1	d	M22	M23	13.98 .. 4.16
23	4.22	1	d	M23	M22	14.16 .. 4.30
24	7.10	1	s	M24	-	17.08 .. 7.18

Anexo 3.5.1: Espectro de ¹H RMN composto 3.

No.	Shift (ppm)	C's	Type	Multiplet	No.	Shift (ppm)	C's	Type	Multiplet
21	221.56	1	s	M21	23	226.55	1	s	M23
22	225.53	1	s	M22					

No.	Shift (ppm)	(Hz)	Height	No.	Shift (ppm)	(Hz)	Height
1	94.30	4314.0	0.0327	6	76.49	9619.1	1.0000
2	43.55	5477.1	0.0323	7	76.74	9650.7	0.9234
3	54.66	6874.4	0.0307	8	78.59	9883.0	0.0312
4	55.37	6903.6	0.0306	9	89.40	11242.8	0.0313
5	56.06	7304.3	0.0327	10	106.13	13346.4	0.0330

No.	Shift (ppm)	(Hz)	Height	No.	Shift (ppm)	(Hz)	Height
11	127.63	16050.8	0.0332	16	160.22	20149.5	0.0367
12	134.66	16933.7	0.0375	17	181.65	22944.3	0.0307
13	142.01	17658.8	0.0327	18	186.60	23486.2	0.0321
14	149.44	18793.5	0.0316	19	187.09	23528.5	0.0315
15	158.42	19922.1	0.0307	20	206.63	25985.3	0.0331

No.	Shift (ppm)	(Hz)	Height	No.	Shift (ppm)	(Hz)	Height
21	221.56	27963.4	0.0329	21	221.56	27963.4	0.0329
22	225.53	28902.4	0.0317	22	225.53	28902.4	0.0317
23	226.55	29490.0	0.0402	23	226.55	29490.0	0.0402

Anexo 3.5.2: Espectro de ¹³C RMN composto 3

Acquisition Time (sec)	(0.2826, 0.0115)	Comment	5 mm QNP 1H/15N/1H Z-GRD Z5526/0002
Date	15 Oct 2013 01:56:58		
File Name	C:\Users\VitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\vf3\500\PDATA\1\2rr		
Frequency (MHz)	(500.13, 125.77)	Nucleus	(1H, 13C)
Origin	spect	Original Points Count	(2048, 320)
Points Count	(2048, 1024)	Pulse Sequence	hmbcgp1ndqf
Spectrum Type	HMBC	Sweep Width (Hz)	(7242.84, 27905.68)
Temperature (degree C)	27.800	Tide	HMBCGP

vf3.500.001.2rr.esp

Anexo 3.5.3: Espectro de correlação HMQC composto 3

Acquisition Time (sec)	(0.2826, 0.0141)	Comment	5 mm QNP 1H/15N/1H Z-GRD Z5526/0002	
Date	14 Oct 2013 20:07:54			
File Name	C:\Users\VitorFrancisco\Desktop\Espectros RMN\vf3\400\PDATA\1\2rr			
Frequency (MHz)	(500.13, 125.77)	Nucleus	(1H, 13C)	Number of Transients 24
Origin	spect	Original Points Count	(2048, 320)	Owner root
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hsqcetgp	Solvent CDCl3
Spectrum Type	HSQC	Sweep Width (Hz)	(7239.30, 22602.34)	
Temperature (degree C)	24.300	Title		

vf3.400.001.2rr.esp

Anexo 3.5.4: Espectro de correlação HMQC composto 3

ANEXO 4

Espectros de RMN de ^1H , dos compostos isolados da cultura celular de *Momordica charantia* durante a fase de crescimento (30 dias) e após os ensaios de elicitação com AS nas concentrações de 0,5 mmol/L 1mmol/L e 5 mmol/L (30 dias).

Anexo : Espectro de ¹H RMN composto 2 elicito AS 0,5 mmol/L. Material celular

Anexo : Espectro de ¹H RMN **composto 1** elicitção AS 5 mmol/L. Material celular

Anexo : Espectro de ¹H RMN **composto 4** elicitación AS 5 mmol/L. Material celular

No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height
56	2.06	1030.2	0.0053	63	2.37	1183.4	0.0105	70	3.95	1976.9	0.0025	77	4.20	2102.5	0.0025
57	2.07	1036.2	0.0052	64	3.35	1675.1	0.0082	71	3.97	1987.6	0.0041	78	4.69	2346.2	0.0048
58	2.10	1050.2	0.0055	65	3.49	1747.5	0.0058	72	3.98	1991.7	0.0043	79	5.30	2652.1	0.0040
59	2.15	1073.1	0.0049	66	3.60	1786.6	0.0038	73	3.99	1993.5	0.0039	80	5.59	2786.7	0.0040
60	2.18	1088.1	0.0041	67	3.65	1823.5	0.0062	74	3.99	1997.2	0.0035	81	7.05	3526.7	0.0062
61	2.34	1168.3	0.0151	68	3.72	1860.1	0.0040	75	4.08	2041.3	0.0045	82	7.08	3541.5	0.0032
62	2.35	1175.8	0.0173	69	3.73	1867.1	0.0038	76	4.09	2048.0	0.0043	83	7.10	3550.3	0.0036

Anexo : Espectro de ^1H RMN **composto 5** elicitção AS 5 mmol/L. Material celular

Cromatograma da fração E-7 Obtida a partir das folhas de *Momordica charantia*

Cromatograma da fração B3 obtida a partir da extração das folhas de *Momordica charantia*