

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

JOSÉ FRANCIRALDO DE LIMA

*Estabelecimento da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos bioativos*

RIBEIRÃO PRETO
2009

JOSÉ FRANCIRALDO DE LIMA

*Estabelecimento da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos bioativos*

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia.

RIBEIRÃO PRETO
2009

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, José Franciraldo

Estabelecimento da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos bioativos. Ribeirão Preto, 2009.
100p.; il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Carem Gledes Vargas-Rechia

1. hipoglicemiantes. 2. *Bauhinia forficata* Link. 3. pata-de-vaca. 4. Insulina. 5. metabolismo secundário. 6. elicitor. 7. cultura de tecidos vegetais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: José Franciraldo de Lima

Título: Estabelecimento da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos bioativos

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em...../...../.....

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).:

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).:

Instituição: _____ Assinatura: _____

"Um homem pode imaginar coisas que são falsas, mas ele pode somente compreender coisas que são verdadeiras, pois se as coisas forem falsas, a noção delas não é compreensível".

Isaac Newton

Dedicatória

Oferto este trabalho a Meu Deus, juntamente com seu filho Jesus Cristo, por ter permitido minha existência e consagrando-me todos os dias de minha vida, com belas conquistas enchendo a vida de felicidade, pelos ensinamentos que ele me deu durante a caminhada da vida, sempre estás comigo em todos os momentos ruins e bons; nunca me abandonou mesmo quando, às vezes, fraquejo na minha fé, ele está atento a me defender e encorajar-me a prosseguir na busca de uma vida melhor para todos.

Muito obrigado senhor, pelas maravilhas que tens feito em minha vida...

Dedico este trabalho a minha esposa Josicleide pelo amor incondicional e a dedicação durante a realização do meu mestrado, mulher firme e destemida, seus incentivos tornaram realidade o que eu julgava ser impossível e também aos meus filhos, Letícia e Erickson, por nos proporcionarem tantas alegrias, vocês são muito importante para nossa felicidade.

Dedico esse trabalho também aos meus pais Maria Socorro e Francisco, por terem me concebido e me apoiarem durante toda minha vida. Educaram-me para o bem fizeram tudo que estava ao seu alcance para que eu fosse uma pessoa de Deus. Apesar das dificuldades mostraram-me o caminho da verdade e da dignidade, obrigado Papai e Mamãe...

À Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, por ter concedido a oportunidade de realizar este trabalho, não medindo esforços para concretizar todos os objetivos e cedendo seu laboratório e disponibilizando do seu conhecimento para orientar minha dissertação, a ela minha eterna gratidão por tudo que foi realizado nesta etapa de minha vida.

Agradecimientos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, em especial ao departamento de Física e Química, pela oportunidade.

Aos meus irmãos Francimar, Francisco, Francineide, Cícero Márcio, Fátima, Vicente Maxim, Andréia, pelas preces e boas energias que eles enviaram. Mesmo de longe conseguiram me incentivar para que eu não desistisse do meu objetivo, sempre procuraram me dar forças e encorajar-me com boas esperanças para uma vida melhor.

Aos meus amigos de laboratório, Roberta de Mello, Wagner Rodrigo de Souza, Cibele Aparecida Cesila, Vitor Francisco dos Santos, Fernando Postalli Rodrigues, Cezar Rangel Pestana, Everton de Oliveira Lima dos Santos e Verônica Paviani. Agradeço pelos bons momentos que passamos juntos durante a realização deste mestrado, pelas dificuldades superadas com bom humor, pela humildade empregada na resolução dos obstáculos e na perseverança desta caminhada, muito obrigado a todos pelo prazer de tê-los conhecido e ter compartilhado tantos momentos prazerosos.

Ao Alcides Silva Pereira, pela dedicação e atenção em colaborar com o meu trabalho no laboratório sem medir esforços. Sempre procurou atender todas as minhas necessidades, principalmente quando eu mais precisei dele, a ele meu muito obrigado e que Deus o conserve para servir a outros que ingressarem neste laboratório.

À Ana Cristina Morseli Polizello, pela competência e profissionalismo, por ter me ajudado a vencer os obstáculos nesta caminhada e ser muito discreta nas abordagens da rotina do laboratório, preserve para sempre esse seu comportamento, você foi muito importante nesta fase de transformação da minha vida.

À Maria Regina de Pila Raphaloski, pela sua sinceridade nos momentos mais difíceis buscando resolver os problemas com rapidez e eficiência, você será sempre lembrada por toda minha vida.

À Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, por ceder do seu preparo técnico em me ajudar a entender boas práticas de laboratório, estando sempre a disposição quando eu mais precisei.

Ieda Maria Razaboni Prado, pela sincera ajuda durante a realização do meu mestrado, apontando o melhor caminho para essa realização.

Nadir Mazzucato, pelos excelentes cafés, disponibilizados nos momentos de ansiedade, e pelas brincadeiras sadias durante essa tão boa caminhada.

Luciana Ceribelli, pela atenção e simpatia e pelos momentos de descontração.

À Profa Dra Ana Isabel de Assis Pandochi, por ceder seu laboratório para realização de algumas técnicas e pelo seu entusiasmo.

Ao Prof. Dr. Augusto César C. Spadaro, por permitir o uso de seu laboratório na realização de muitas técnicas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Curti, pela disponibilização de seu laboratório e dedicação em me ajudar nesta tarefa de realização do meu trabalho.

À profa Dra. Yara Maria Lucisano Valim, pelos bons conselhos e amizade, cedendo seu laboratório quando eu precisei.

A Dr. Pierre Landolt, pelo incentivo e torcida sempre me apoiou procurando estimular o meu crescimento profissional, a ele minha eterna gratidão.

Em memória de Peter Bernet, pela sua simpatia e apoio incondicional, e pelo grande prazer que foi ter te conhecido e convivido com sua pessoa.

A Mariza Bernet, pela simpatia e incentivos incondicionais a minha caminhada neste mestrado; obrigado por tudo.

RESUMO

LIMA, J.F. **Estabelecimento da cultura de células em suspensão de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos bioativos.** 2009. 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

As plantas medicinais têm sido utilizadas como uma importante fonte de prevenção e tratamento de doenças para a população pobre dos países em desenvolvimento. A literatura apresenta resultados que demonstram a atividade de proteínas e flavonóides presentes nas folhas, sementes e cascas do caule de *Bauhinia forficata* Link com ação hipoglicemiante. Este trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo para a obtenção das células em cultura de *B. forficata* para posterior produção de compostos fenólicos e proteínas com atividade hipoglicemiante. Assim, inicialmente, foram padronizadas as condições para obtenção da cultura *in vitro* de *B. forficata* Link. Realizou-se a indução da calogênese (indução máxima 77%) utilizando-se folhas como explantes em meio MS suplementado com ácido 2,4-diclofenoxiacético 1 mg/L, cinetina 1 mg/L e 3% (m/v) de sacarose. A cultura de células em suspensão foi estabelecida a partir da transferência de inóculos de calos frescos (2g) para a 40 mL de meio MS. Após a padronização realizou-se eliciações, com MeJA e AS 1 µmol/L, nos tempos de 0, 3, 6, 9 e 12 dias, monitoradas pelo teor de compostos fenólicos e proteínas totais no meio intra e extracelular. Avaliou-se também o efeito da suplementação com sacarose (20, 30 e 40 g/L) sobre o sistema celular. O MeJA causou um aumento de composto fenólicos no meio extracelular de 105% e de 126% no meio intracelular, em 6 dias. O AS, em 9 dias de indução, aumentou esse compostos em 106,5% e 132,6% no meio extra e intracelular, respectivamente. Em 6 dias obteve-se o melhor tempo de eliciação das proteínas extracelulares com MeJA (81%) e de 9 dias para AS (41%). A presença desses elicitores, em 6 e 9 dias, foram capazes de aumentar a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (FAL) e tirosina amônia liase (TAL) no meio intracelular. Os resultados obtidos demonstraram que AS e MeJA podem modular a liberação de compostos fenólicos e proteínas para o meio extracelular, sendo os tempos de 6 e 9 dias os mais eficientes. A suplementação do meio com sacarose contribui para esta liberação, sendo a melhor concentração de sacarose 30 g/L. Portanto, as condições estabelecidas foram eficientes para obtenção da suspensão celular de *Bauhinia forficata* Link e modulação de compostos fenólicos e proteínas neste sistema.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata* Link. Cultura de células. Compostos fenólicos. Hipoglicemiantes.

ABSTRACT

LIMA, J.F. **Establishment of cell suspension culture of *Bauhinia forficata* Link as a source of bioactive metabolites.** 2009. 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The medicinal plants have been used as a major source of prevention and treatment of diseases for the poor population in the developing countries. Hypoglycaemic bioactive compounds have been found in leaves, seeds and barks of *Bauhinia forficata*. The aim for this work was to establish a protocol to obtain the *B. forficata* cell culture and to produce phenolic compounds and proteins with hypoglycaemic activities. The callus induction (maximum response: 77%) was developed using leaves as explants on MS medium supplemented with 1mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 1mg/L kinetin plus 3% sucrose (w/v). The cell suspension culture was established by transferring an inoculum of fresh callus (2 g) to 40 mL liquid MS medium. The effects of 1 µmol/L methyl jasmonate (MeJA) or salicylic acid (AS) in the cell culture, supplemented with sucrose (20, 30 and 40 g/L), was evaluated by monitoring the proteins and phenolic compounds in the extra and intra cellular medium after 0, 3, 6, 9 and 12 days. In the extracellular fractions, the best time for phenolic compounds induction in the presence of MeJA (105%) and AS (106.5%) was 6 and 9 days, respectively. In the intracellular fractions, the highest effect was observed 6 days after induction in the presence of MeJA (126%) or AS (132.6%). The best time for protein induction in the extracellular medium was 6 days in the presence of MeJA (81%) and 9 days in the presence of AS (41%). In addition, the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and tyrosine ammonia lyase (TAL) increased in the intracellular medium in the presence of MeJA and AS after 6 and 9 days, respectively. In conclusion, the conditions we used were efficient for obtention of cell suspension culture of *B. forficata*. MeJA and AS can be used as elicitors of phenolic compounds and protein in this cellular system.

Keywords: *Bauhinia forficata* Link. Cell culture. Phenolic compounds. Hypoglycaemic

**LISTA DE SIGLAS
E ABREVIATURAS**

2,4-D	2,4-Diclorofenoxacético
AG	Ácido Gálico
AIA	Ácido Indolacético
ANA	Ácido Naftalenacético
AS	Ácido Salicílico
BAP	6-Benzilaminapurina
BF	<i>Bauhinia forficata</i>
BSA	Albumina Soro Bovino
CIN	Cinetina
DTT	Ditritreitol
FAL	Fenilalanina Amônia Liase
F-I	Ramnoglucuronogalactana extraída do tegumento das sementes de paineira
FR1	Fração Resíduo 1
FR2	Fração Resíduo 2
FS1	Fração sobrenadante um
FS2	Fração Sobrenadante Dois
G3	Ácido Giberélico
IBA	Ácido Indol-3-butírico
ICS	Isocorismato Sintase
LC	Maize Leaf Colour
MeJA	Metil Jasmonato
MEP	Metileritritol Fosfato
MS	Murashige e Skoog
OMS	Organização Mundial da Saúde
PVP	Polivinilpirrolidona
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T0	Tempo Zero
T3	Tempo Três
T6	Tempo Seis
T9	Tempo Nove
T12	Tempo Doze
TAL	Tirosina Amônia Liase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio MS	25
Tabela 2 - Matriz de brotação	26
Tabela 3 - Tampão de diluição de amostra 2x concentrado	28
Tabela 4 - Protocolo da preparação do gel de poliacrilamida	28
Tabela 5 - Padrões de massa molecular para eletroforese em gel de poliacrilamida pré Corados	29
Tabela 6 - Padrões de massa molecular para eletroforese em gel de poliacrilamida	29
Tabela 7 - Protocolo de preparação de tampão de corrida Tris/Glicina	29
Tabela 8 - Protocolo de preparação da solução corante de Coomassie	30
Tabela 9 - Protocolo de preparação da solução descolorante de Coomassie.....	30
Tabela 10 - Protocolo de preparação do tampão de transferência Western Blotting	30
Tabela 11 - Protocolo de preparação do Tampão TBS-T para Western Blotting.....	30
Tabela 12- Determinação do perfil de germinação de <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	39
Tabela 13- Análise da matriz de brotação	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo secundário vegetal.....	17
Figura 2. Via do ácido chiquímico	18
Figura 3. Fluxograma da padronização do protocolo experimental.....	37
Figura 4. Fotos da germinação de <i>Bauhinia forficata</i> Link	39
Figura 5. Fotos da pré-formação de calos	41
Figura 6. Teor de proteínas e fenólicos	43
Figura 7. Eletroforese das proteínas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	45
Figura 8. Western Blotting das proteínas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	46
Figura 9. Análise de compostos fenólicos extracelulares.....	49
Figura 10. Análise de compostos fenólicos intracelulares	49
Figura 11. Análise de proteínas totais extracelulares	52
Figura 12. Análise de proteínas totais intracelulares.....	52
Figura 13. Análise de açúcares redutores extracelulares.....	54
Figura 14. Análise de lipídeos totais intracelulares.....	54
Figura 15. Elicitação com MeJA e AS, em concentrações diferentes de fonte de carbono, para produção de fenólicos extracelulares.....	57
Figura 16. Elicitação com MeJA e AS, em concentrações diferentes de fonte de carbono, para produção de fenólicos intracelulares	57
Figura 17. Elicitação com MeJA e AS, em concentrações diferentes de fonte de carbono, para produção de proteínas totais extracelulares	60
Figura 18. Elicitação com MeJA e AS, em concentrações diferentes de fonte de carbono, para produção de proteínas totais intracelulares.....	60
Figura 19. Atividade da Enzima (FAL) Fenilalanina Amônia Liase	64
Figura 20. Atividade da Enzima (TAL) Tirosina Amônia Liase	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	8
1.1 Cultura de Células	8
1.2 Plantas com propriedade terapêutica	9
1.3 Diabetes	10
1.4 Planta <i>Bauhinia forficata</i> Link	11
1.5 Metabólitos com propriedade hipoglicemiante	13
1.6 Metabolismo secundário de plantas.....	14
1.7 Elicitores Biológicos	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Equipamentos	23
3.2 Reagentes e meios	24
3.3 Assepsia de sementes <i>Bauhinia forficata</i> Link	24
3.4 Meio de cultura para germinação das sementes de <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	25
3.5 Preparo da Matriz de Brotação	26
3.6 Preparação das células cultivadas.....	26
3.7 Análise dos componentes do meio extracelular (ME) das suspensões de <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	27
3.7.1 Determinação do teor de compostos fenólicos (SLINGLETON E SLINKARD, 1977).	27
3.7.2 Determinação do teor de proteínas (BRADFORD, 1976).....	27
3.8 Extração de Proteínas para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida e Estern Blotting	27
3.12 Padronização do protocolo para ensaios de elicitação no meio de cultura de <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	32
3.12.1 Contagem e viabilidade celular	32
3.12.2 Elicitação no meio de cultura de células em suspensão de <i>Bauhinia forficata</i> Link....	33
3.12.2.1 Determinação do teor de açúcar redutor pelo método do ferricianeto (KIDBY; DAVISON, 1973).....	33
3.12.2.2 Determinação do teor de lipídios totais (RADIN, 1969).....	33
3.13 Elicitação com diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura de células em suspensão de <i>Bauhinia forficata</i> Link	34

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Estabelecimento da cultura de células em suspensão de <i>Bauhinia forficata</i> Link	38
4.1.1 Padronização da assepsia para a germinação de sementes de <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	38
4.1.2 Padronização das condições de obtenção de calos de <i>Bauhinia forficata</i> Link	40
4.2 Análise de proteínas totais e compostos fenólicos no meio extracelular das suspensões de <i>Bauhinia forficata</i> Link	42
4.3 Análise por eletroforese e por western blotting das proteínas obtidas das células cultivadas <i>in vitro</i> e de folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	44
4.4 Padronização do protocolo para ensaios de elicitação no meio de cultura de <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	47
4.5 Análise do efeito dos elicitores, MeJA e AS, sobre a liberação de compostos fenólicos no meio extracelular (fração S1) e intracelular (fração S2) da cultura de células de <i>Bauhinia forficata</i> Link, em diferentes tempos.....	47
4.6 Análise do teor de proteínas totais extra (fração S1) e intracelular (fração S2) nas células de <i>Bauhinia forficata</i> Link elicitadas com MeJA e AS, em diferentes tempos.....	50
4.7 Análise do teor de açúcar redutor no meio intracelular, fração (S1), de cultura de células de <i>Bauhinia forficata</i> Link após elicitação MeJA e AS, em diferentes tempos.....	52
4.8 Análise do teor de lipídios totais no meio intracelular, fração S2, em células de <i>Bauhinia forficata</i> Link elicitadas com MeJA e AS, em diferentes tempo	52
4.9 Análise do efeito da variação de concentração de sacarose sobre a elicitação de compostos fenólicos extracelulares (fração S1) e intracelular (fração S2), mediada por MeJA e AS, na cultura de células de <i>Bauhinia forficata</i> Link	54
4.10 Análise do efeito da concentração de sacarose sobre as proteínas totais extra (fração S1) e intracelular (fração S2) nas células de <i>Bauhinia forficata</i> Link, elicitadas com MeJA e AS .	57
5 CONCLUSÕES.....	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Cultura de Células

A cultura de células e tecidos vegetais é uma técnica de grande aplicação para o desenvolvimento de pesquisa em diversas áreas do conhecimento, como: para produção de mudas, manipulação de material vegetal, para melhoramento de culturas em fase de declínio, produção de agregados celulares (calos), para produção de metabólitos bioativos, ou ainda para o estudo de vias de síntese (THORPE, 2007).

A história da cultura de células vegetais se inicia com Apud (1838) que postulou que algumas células eram capazes de serem separadas do organismo e continuarem crescendo independente, em meios específicos para sua nutrição, o que foi confirmado mais tarde por Haberlandt (1902). Logo após, Kogl e colaboradores (1931) descobriram o primeiro hormônio de crescimento de planta, ácido indolacético (IAA), que é um regulador de crescimento responsável pelo desenvolvimento de raízes.

O cientista francês Roger J. Gautheret, em 1937, obteve resultados encorajadores com cultivo de tecidos cambiais de cenoura. Neste mesmo ano, Philip R. White (1934) realizou o cultivo de raízes de tomate *in vitro*. Gautheret (1939), estudando cultura de tecidos isolados de cenoura, verificou que podia mantê-las por vários anos realizando subculturas. Estas experiências demonstraram que as culturas poderiam, não somente ser iniciadas, como igualmente serem mantidas durante um longo período de tempo. Mais tarde, Miller & Skoog (1955) publicaram a descoberta do hormônio cinetina, um regulador de crescimento vegetal pertencente à classe das citocininas, que foi muito importante para impulsionar o interesse sobre a cultura de tecidos vegetais. Murashige e Skoog (1962) publicaram a composição de um meio de cultura para tecido de plantas que veio a ser denominado de MS, em referência aos autores Murashige & Skoog, o qual se tornou um meio básico para o estabelecimento de muitas culturas vegetais, *in vitro*, sendo um marco no desenvolvimento desse processo.

O grande interesse pela cultura de tecidos vegetais tem sido determinante na superação de obstáculos para os avanços do conhecimento nessa área. Muitas possibilidades têm surgido em função das diversas aplicações, no campo da genética, da fisiologia, da bioquímica vegetal, seja para estudos de rotas metabólicas, manipulação dos tecidos de plantas, ou ainda, ampla

aplicação para finalidades industriais, produção de enzimas vegetais, metabólitos com propriedades aromatizantes e corantes (CALDAS, 1998; TORRES et al., 2000).

Chatuvrvedi (2007) mostrou a ampliação do uso de cultura de tecidos, utilizada em microreatores para testes farmacêuticos. Estudos demonstram a importância das técnicas de cultura de tecidos frente à moderna biotecnologia, para os processos envolvendo plantas medicinais. São notórias as possibilidades que a cultura de tecidos pode oferecer nas resoluções dos desafios da interdisciplinaridade e os múltiplos usos que se pode fazer dessa técnica (TITANJI, 2007; MUHARMMED et al., 2008; FUMIHIKO et al., 2008).

1.2 Plantas com propriedades terapêuticas

A utilização de plantas para finalidades terapêuticas vem de relatos tão antigos quanto à civilização humana. Por muito tempo produtos de origem vegetal, animal e mineral foram as principais bases da terapêutica. Cerca de 25% dos fármacos prescritos mundialmente são obtidos de plantas, 80% dos fármacos utilizados em países em desenvolvimento são extraídos de produtos naturais, 50% são sintéticos, no entanto seus protótipos têm origem nos princípios isolados de plantas. Além disso, entre 252 fármacos considerados como essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal (YUE-ZHONG, 1998; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; RATES, 2001).

A literatura apresenta registros de mais de 1200 espécies de plantas com propriedades hipoglicemiantes, as quais são utilizadas popularmente no controle dos teores de glucose. Embora, parte destas espécies não possua uma avaliação científica cuidadosa para comprovação dos seus efeitos, sendo que 80% destas espécies comprovadamente demonstraram atividade antidiabética (LEDUC et al., 2006). Vários medicamentos modernos, utilizados na medicina convencional, têm origem de plantas medicinais dos quais podemos citar: metformina, medicamento muito utilizado no tratamento do diabetes que foi isolado das flores da espécie *Galega officinalis*; atropina obtida da *Atropa belladonna* L.; morfina e a codeína isoladas da espécie *Papaver somniferum* L., entre outras (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998; SIMÕES et al., 2001; YEH, 2003; LEDUC et al., 2006).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta, porém 20% de sua população são responsáveis por 63% do consumo de medicamentos de origem sintética disponíveis. O restante da população tem nos produtos de origem natural, principalmente nas plantas, muitas vezes, a única fonte terapêutica (SIMÕES et al., 2001).

A Organização Mundial da Saúde procura estimular a utilização de plantas medicinais para o tratamento de várias enfermidades, incluindo o diabetes, doença que atinge milhões de pessoas no mundo, principalmente em países onde o acesso aos tratamentos convencionais não são disponíveis (ABDEL-BARRY et al., 1997).

Tendo como base o conhecimento e uso popular, a pesquisa e comprovação dos efeitos dos constituintes de plantas usadas na medicina tradicional como hipoglicemiantes, tornam-se necessário, considerando que estas substâncias podem servir como agentes hipoglicêmicos que mimetizam os efeitos da insulina. Sendo assim poderiam ser substituídas as dolorosas injeções de insulina, aliviando os tratamentos dos diabéticos tipo 1 e minimizariam os efeitos colaterais dos agentes hipoglicemiantes orais nos pacientes diabéticos do tipo 2, além de diminuir os elevados custos com tratamentos de pessoas de baixa renda (ABDEL-BARRY et al., 1997).

1.3 Diabetes

Diabetes é uma doença crônica que ocorre por uma deficiência herdada e/ou adquirida na produção de insulina ou ainda pela resistência a insulina. Esta deficiência pode ser absoluta ou relativa provocando um aumento da concentração de glucose no sangue ocasionando, assim, muitos danos sistêmicos, em sua maioria nos vasos sanguíneos e nervos. O diabetes afeta cerca de 1 a 2% da população mundial (AHMED, 2005).

Há relatos da existência de duas formas clínicas principais de diabetes. O diabetes do tipo 1, conhecida como diabetes juvenil, o qual adquiriu tal denominação por ocorrer predominantemente em indivíduos jovens, na sua primeira década de vida, e por se caracterizar clinicamente por insuficiência de secreção pancreática de insulina, onde o sistema de defesa destrói as células beta, que são responsáveis pela produção de insulina, obrigando seu portador à utilização de injeções diárias de insulina para sua sobrevivência (RODRIGUES, et al., 2005).

O diabetes do tipo 2, antes chamado diabetes de adulto ou da maturidade, ocorre mais em indivíduos a partir dos quarenta anos, corresponde a 80% de todos os casos de diabetes (BONORA, 1993; THAI, 1993; MOHAMMED, 2008).

Clinicamente, o diabetes do tipo 2 associa-se geralmente a obesidade, e apresenta diferentes graus de deficiência insulínica que podem produzir alterações do metabolismo dos carboidratos. Estas deficiências variam desde pequenas intolerâncias a glucose até formas

insulinopênicas semelhantes o diabetes do tipo 1, que exige o uso terapêutico de insulina exógena.

O aumento no número de pessoas acometidas pelo diabetes está no aumento do crescimento da população, vida sedentária, envelhecimento, urbanização, aumento da prevalência de obesidade e inatividade física.

Estima-se que existam mais de 170 milhões de pessoas com diabetes no mundo. As projeções da OMS sugerem que até o ano de 2030 esse número pode chegar a 366 milhões. Dados da OMS (2002) mostram que em 2000, os cinco países, com maior número de pacientes diabéticos, eram a Índia (32,7 milhões), a China (22,6 milhões), os Estados Unidos (17,7 milhões), a Indonésia (8,4 milhões) e o Japão (6,8 milhões). No Brasil, este número pode ser próximo de 4,6 milhões de pessoas e nas projeções para 2030, serão cerca de 11,3 milhões. Deste total, aproximadamente 50% das pessoas com diabetes desconhecem sua condição mórbida, sendo que 10% destas são portadoras do diabetes tipo 1 (FRANCO et al., 1998).

O Brasil gasta, aproximadamente, 3,9 milhões de dólares/ano com cuidados relacionados ao diabetes. O alto custo inclui os gastos com serviços médico-hospitalares, medicamentos, testes laboratoriais e gerenciamento do diabetes (OMS, 2005). O impacto da doença como problema de saúde pública é consequência não somente do seu quadro clínico diretamente relacionado à hiperglicemia, mas principalmente pelas alterações funcionais que ocorrem em diferentes órgãos e sistemas, os quais são resultantes do descontrole metabólico crônico dos carboidratos, das proteínas e dos lipídeos.

1.4 Planta *Bauhinia forficata* Link

A *Bauhinia forficata* Link pertence à família (Fabaceae), conhecida popularmente como pata-de-vaca, onde se encontra 300 espécies do gênero *Bauhinia*, apresenta-se como uma árvore de porte médio, encontrada do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul, possui folhas uncinadas com formato semelhante a uma pata de vaca, flores brancas e frutos do tipo vagem linear. Algumas espécies do gênero *Bauhinia* são utilizadas na medicina folclórica da África, Ásia e América para o tratamento de várias doenças. A infusão das folhas de *Bauhinia forficata* Link é utilizada na medicina popular brasileira como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (PEPATO et al., 2004).

Estudos fitoquímicos demonstraram que esta planta contém alcalóides, taninos, mucilagem, óleo essencial, heteroglicosídeos cianogênicos, saponinas, catecol e ácidos voláteis fixos (PEPATO et al., 2004).

Na literatura existem alguns relatos sobre a ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link com resultados comprovados cientificamente (PEPATO et al., 2002; SILVA et al., 2002; CAZAROLLI et al., 2006). Os experimentos da atividade hipoglicêmica de *Bauhinia forficata* Link, em pacientes diabéticos, foram feitos por Juliani em 1929 e 1931. Mais tarde, demonstrou que esta espécie vegetal continha compostos capazes de diminuir a glicemia de cães e coelhos submetidos a hiperglicemia adrenalítica e pancreatomizados (JULIANI, 1941). Caricati Neto e colaboradores (1985) também observaram efeitos da *Bauhinia forficata* Link na glicemia quando a fração obtida por extração aquosa das folhas desta espécie foi administrada intraperitonealmente em ratos diabéticos.

Recentemente Pepato e colaboradores (2002) constataram, após um tratamento crônico de 31 dias, que os ratos diabéticos tratados com chá das folhas de *Bauhinia forficata* Link apresentaram significativa redução na glicemia e nos níveis de glucose e uréia na urina, em relação ao grupo controle. Ainda em 2002, Silva e colaboradores observaram a redução dos níveis glicêmicos em ratos normais e diabéticos após administração oral das frações butanólicas das folhas desta espécie em um período agudo de 3 horas. Em 2004, Lino e colaboradores demonstraram que a administração das frações obtidas a partir do extrato aquoso, etanólico, e hexânico de *Bauhinia forficata* Link por 7 dias, em animais diabéticos, foram capazes de reduzir, significativamente, os níveis de glucose plasmática, triglicerídeos e colesterol total.

Entretanto, Russo e colaboradores (1990) não encontraram diferença significativa no placebo, *Imperata brasilienses* (“sapé”), e o chá das folhas de *Bauhinia forficata* Link realizado durante um tratamento agudo (0 a 6 horas) e crônico (1 a 56 dias). Esse resultado mostra a existência de controvérsia nos dados da literatura sobre o tema, mas isto pode ser atribuído a muitos fatores como: tipo de solo, clima, condições de cultivo, armazenamento da planta e variações sazonais. Como também deve ser avaliada a forma e fracionamento dos extratos da planta e as vias de administração utilizadas nos ensaios (DA SILVA e CECHINEL FILHO, 2002; SILVA et al., 2002; DE SOUSA et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2006).

Várias espécies do gênero *Bauhinia* foram e continuam sendo estudadas fitoquímica e farmacologicamente (DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; PIZZOLATTI et al., 2003).

Trabalhos abordando a composição fitoquímica da *Bauhinia forficata* Link confirmaram que esta planta é caracterizada pelo acúmulo de flavonóides livres e glicosilados nas folhas e flores, como o β -sitosterol e canferol-3,7-diramnosídeo, sendo este último somente encontrado nas folhas (DA SILVA et al., 2000).

Pizzolati e colaboradores (2003) realizaram o isolamento e a identificação do canferol e de mais cinco flavonóides glicosilados contendo os flavonóis canferol e quercetina como agliconas. De Sousa e colaboradores (2004), com o intuito de estudar o efeito dos constituintes de *Bauhinia forficata* Link individualmente, avaliaram a atividade aguda do composto majoritário isolado da fração *n*-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* Link, o canferol-3,7-*O*-(α)-L-diramnosídeo (canferitrina). Após administração oral em animais normoglicêmicos e diabéticos foi observado significativo efeito hipoglicêmico e atividade antioxidante deste composto. Além disso, a canferitrina estimulou significativamente a captação de [¹⁴C]-deoxi-D-glucose no músculo sóleo de ratos sem alterar a síntese protéica e os níveis de glucose urinária, em um período agudo de tratamento (JORGE et al., 2004).

1.5 Metabólitos com propriedade hipoglicemiante

Logo após a conclusão dos estudos que confirmaram a presença da insulina no pâncreas de cães, os cientistas envolvidos na descoberta apresentaram resultados que sugeriam a presença de substâncias similares à insulina, em extratos das mais diversas plantas (COLLIP, 1923; BEST, 1924). Collip (1923) nomeou-a de glucocinina, pois se acreditava que uma substância derivada de plantas não poderia ter o nome de insulina, que vem da palavra latina que significa ilhota, referência às ilhotas de Langerhans do pâncreas. Khann e colaboradores (1976) encontraram indícios mais concretos sobre a presença de insulina em plantas. Eles isolaram, de frutos e de sementes de *Momordica charantia* (Melão-de-São Caetano), uma fração protéica com massa molecular de aproximadamente 6,0 kDa, a qual reagia com anticorpo antiinsulina humana. Os estudos desse grupo tiveram como base à experiência da medicina popular indiana, que a indicara como sendo de grande valor no tratamento do diabetes (PULOK, 2006).

Proteínas isoladas de folhas de “espinafre”, *Tetragonia expansa* Murr.(Aizoaceae), “centeio” *Claviceps purpúrea* (Fr.) Tul. (Clavicipitaceae) e de *Lemna gibba* G3, (Araceae) que apresentaram massas moleculares semelhantes à das insulinas animais, reagiram com

anticorpos antiinsulina suína apresentando a propriedade de ligação ao receptor de insulina humana (COLLIER et al., 1987).

Muitos trabalhos sobre os efeitos de extratos com ação hipoglicemiante têm sido realizados, atribuindo essa ação a atividade de flavonóides totais. Bhavna et al. (2008) estudaram os extratos de folhas de *Eugenia jambolana* Lam (Myrtaceae), obtendo resultados da ação hipoglicêmica e hipolipidêmica em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, o que evidenciou os múltiplos efeitos que a planta apresenta; seja pela ação de peptídeos e proteínas, ou por efeitos de classes de metabólitos secundários sintetizados pela planta.

A literatura apresenta poucos estudos da presença de proteínas semelhantes a insulina em plantas, porém continuamente muitas abordagens sobre os efeitos benéficos de uma enorme quantidade de extratos de folhas, das mais variadas plantas com ação antidiabetes, são descritas em diversas publicações onde as propriedades sugerem a presença de proteínas ativas. Venâncio e colaboradores (2003) relataram a presença de insulina vegetal em vargens e tegumentos das sementes e folhas de “feijão-de-corda” *Vigna unguiculata* L (Fabaceae) bem como nas folhas de pata-de-vaca *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae) duas plantas bastante utilizadas popularmente no Brasil por sua ação hipoglicemiante (PANIZZA, 1997; VENÂNCIO et al., 2000).

Em *Bauhinia variegata* Linn (Caesalpiniaceae) foi demonstrado que a insulina se encontra, predominantemente, associada aos cloroplastos que são organelas responsáveis pelos processos fotossintéticos que se dão nas folhas verdes (AZEVEDO, 2006).

A partir de estudos de resposta de defesa, com as sementes de “feijão-de-porco” *Canavalia ensiformis* (L.) (Fabaceae) contra insetos, foi observada a presença de uma proteína que apresentava ação hipoglicemiante (OLIVEIRA et al., 1999). Os resultados do efeito de diferentes espécies são indicativos que demonstram a necessidade do estudo dos mecanismos envolvidos nas atividades destes compostos descritos pela literatura.

1.6 Metabolismo secundário de plantas

As plantas possuem vias metabólicas que não se encontram nos animais, estas vias fazem parte do chamado **metabolismo secundário**., as quais são rotas que levam a formação de compostos conhecidos como metabólitos secundários. Segundo Geissman e Crout (1969),

substâncias do metabolismo secundário são de natureza evidentemente complexa e distribuição restrita, ao contrário das substâncias do metabolismo primário que apresentam uma distribuição universal. Poucos metabólitos secundários possuem uma função característica bem determinada no metabolismo dos organismos que as produzem.

Estes compostos podem ser divididos em 3 grandes grupos químicos diferentes: terpenos, compostos fenólicos e compostos que contêm nitrogênio, também chamado de alcalóides (GERSHENZON, 2002). Os terpenos ou terpenóides constituem uma larga classe de produtos secundários. Esta classe diversificada de compostos é, em geral, solúvel em água, é sintetizada pela via do ácido mevalônico ou via do MEP (metileritritol fosfato).

Os **terpenos** são metabólitos formados por isopentano, esqueleto de cinco carbonos ramificado, a sua estrutura básica é formada por unidades de isoprenos, isso porque os terpenos podem ser decompostos por altas temperaturas e formar os isoprenos (TAIZ E ZEIGER, 2002; HOSAKATTE et al., 2008).

A classificação dos terpenos é feita de acordo com a quantidade de unidade isoprénicas em: hemiterpenos C5, monoterpenos C10, sesquiterpenos C15, diterpenos C20, triterpenos C30, tetraterpenos C40. Eles apresentam funções variadas nos vegetais, são geralmente encontrados nas sementes, flores, folhas e raízes das plantas. Alguns são precursores de vitaminas como A, K e E, como também responsáveis pela propriedade inseticida nas plantas, aromaticidade e muitas outras funções (GERSHENZON, 2002).

Os **alcalóides** formam um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas, cuja similaridade molecular mais significativa é a presença de nitrogênio na forma de amina (raramente amida). Existem várias classes de alcalóides, e todas apresentam alguma ação fisiológica, geralmente no sistema nervoso central, o que tem sido utilizado para o benefício do homem na produção de drogas medicinais, como, por exemplo, a morfina (Vickery & Vickery, 1981). Nesta categoria estão alcalóides de defesa anti-herbívoros, glicosídeos cianogênicos, os quais são considerados interessantes porque apresentam toxicidade em humanos e pelas suas propriedades medicinais (TAIZ E ZEIGER, 2002).

As funções destes compostos nas plantas não estão bem definidas. Inicialmente, foram atribuídos aos alcalóides os efeitos de proteção, resultante da toxicidade elevada conferidas aos vegetais. No entanto, acredita-se que os alcalóides atuem também como reserva da síntese de proteínas, estimulantes ou reguladores do crescimento, ainda, como agentes finais da

desintoxicação e da transformação simples de outras substâncias, cujo acúmulo pode ser nocivo ao vegetal (HENRIQUES et al., 2001).

Dentre as Traqueófitas, as dicotiledôneas são as que apresentam maior número de famílias com espécies que contém alcalóides, embora eles possam aparecer em algumas monocotiledôneas e menos freqüentemente nas gimnospermas. Eles distribuem-se por toda a planta, mas tendem a se acumular em certas regiões, em particular nos tecidos externos, no tegumento das sementes e nas cascas dos caules e raízes. Em cada planta existe sempre uma mistura própria de vários alcalóides com estrutura química semelhante, e geralmente observa-se predomínio de um alcalóide principal (HENRIQUES et al., 2001).

Os **compostos fenólicos** são formados por um anel aromático ligado a hidroxila (fenol) e são um grupo heterogêneo de compostos químicos que somam aproximadamente 10.000 compostos, entre eles estão os flavonóides, presentes nas folhas de *Bauhinia forficata* com atividade hipoglicemiante. Encontra-se ainda, flavonas, isoflavonas, cumarinas, ligninas, antocianidinas e taninos. A síntese dessas substâncias é realizada por diversas rotas metabólicas, onde a maior parte dos compostos é sintetizada pela via do ácido chiquímico. Esse ácido transforma os carboidratos simples, derivados da glicólise e da via das pentoses fosfato, em aminoácidos aromáticos (HERMANN & WEAVER, 1999).

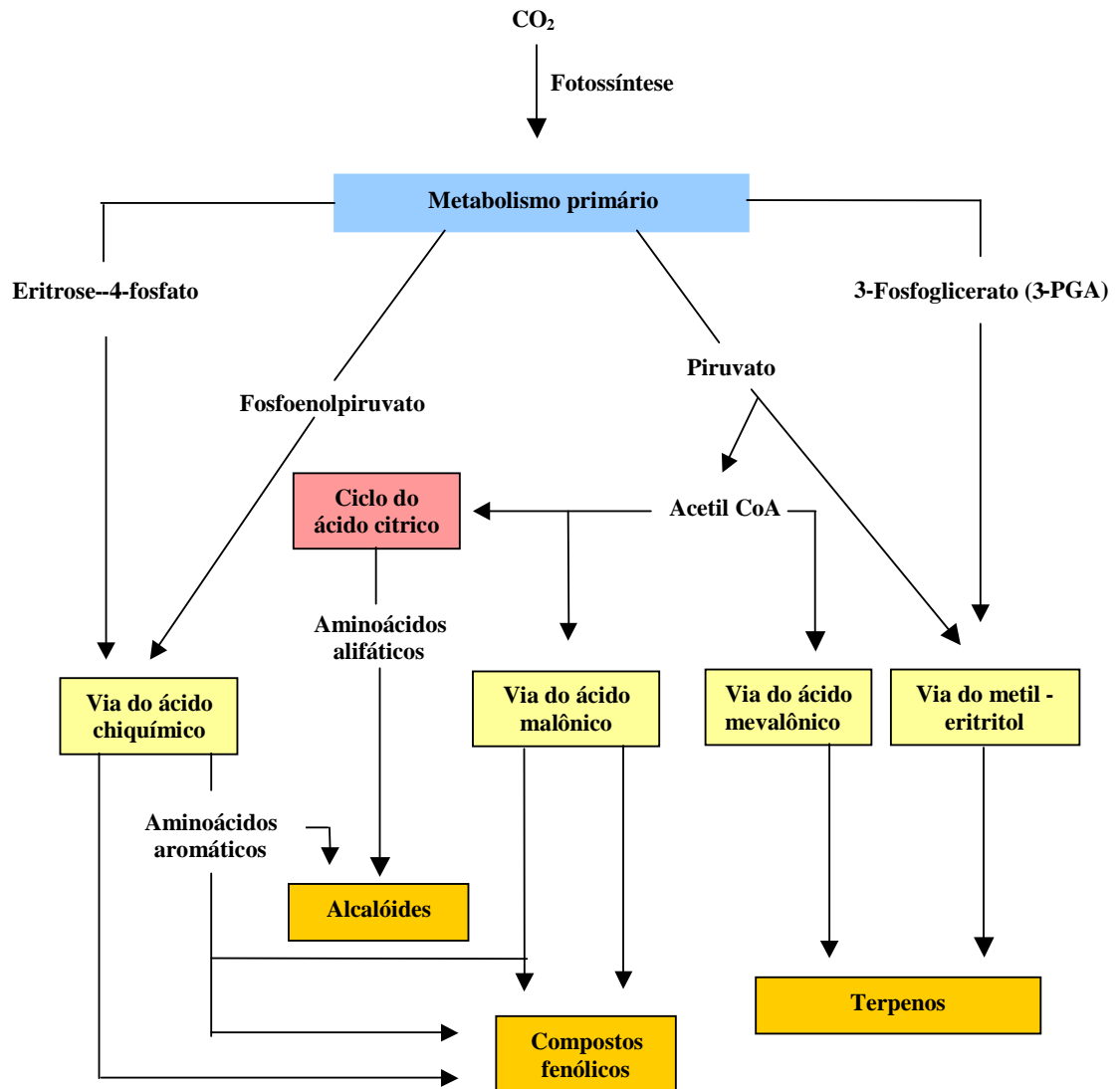


Figura 1. Rotas simplificadas das principais vias do metabolismo secundário vegetal (adaptado de TAIZ & ZEIGER 2002).

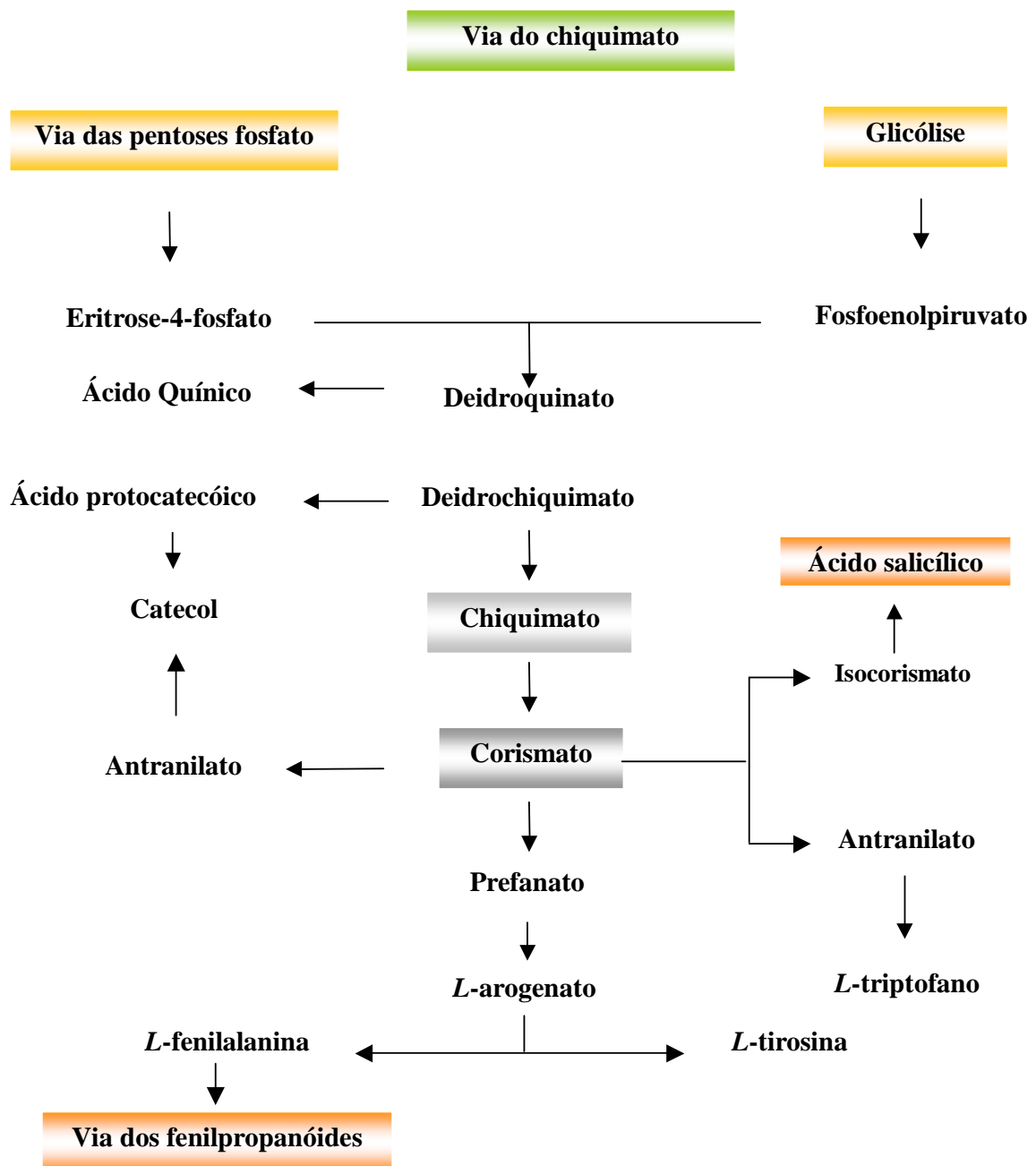


Figura 2. Via metabólica do chiquimato. O corismato é convertido a isocorismato pela enzima isocorismato sintase 1 (ICS1), sendo que o isocorismato é então transformado em ácido salicílico (Adaptado de DE SOUZA, 2005).

A grande maioria dos compostos fenólicos sintetizados, nas plantas, são derivados do aminoácido fenilalanina, via eliminação de uma molécula de amônia com subsequente formação de ácido cinâmico. Esta reação é catalisada pela enzima **fenilalanina amônia liase (FAL)** situada num ponto chave entre o metabolismo primário e secundário, participando de um importante ponto de regulação para a biossíntese dos compostos fenólicos (MYUNG-MIN et al., 2008).

A atividade da enzima FAL é aumentada por fatores ambientais e por infecções microbianas (GERSHEZON, 2002). Segundo Nicholson e Hammerschmidt (1992), substâncias fenólicas são sintetizadas pelas plantas após lesões físicas, infecção (bactéria, fungo, vírus ou nematóides) ou qualquer outro tipo de estresse (nutricional, salino, hídrico, etc.). Outras características dos metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos, são a capacidade que estas moléculas possuem em dar cor às flores e aos frutos e aromaticidade para atrair seus polinizadores, além de serem utilizadas como medicamentos pelo homem (KORKINA, 2007).

1.7 Elicitores Biológicos

Elicitores ou estimuladores são compostos ou tratamentos que induzem as plantas a sintetizarem fitoalexinas em níveis elevados, assim como ativar a síntese de novas moléculas (EILERT & CONSTABEL, 1986; FUNK et al., 1987; TANI et al., 1992; VARGAS-RECHIA et al., 1998; SOUZA, 2005). O efeito dos elicitores depende de muitos fatores, tais como: concentração do elicitor, tempo de elicitação e o estágio de crescimento da cultura no momento da estimulação.

Os elicitores podem ser divididos em duas classes: os de origem abiótica (metais pesados, luz ultravioleta) e aqueles de origem biológica, como material de parede de fungos e células vegetais ou enzimas microbianas, conhecidos como agentes bióticos (BHAGWATH & HJORTSO, 2000). Muitos trabalhos têm sido publicados com relatos da utilização de elicitores para controle de fitopatógenos, produção e aumento de síntese de vários metabólitos vegetais (ATSUSHI et al., 2007).

O reconhecimento planta-patógeno ocorre normalmente pela interação de uma molécula elicitora do patógeno ou da planta (liberada por ação do patógeno) e de um receptor protéico presente na membrana celular da planta (CERVONE ET AL., 1989; HAHN, 1996; MÉTRAUXS, 2001; UMEMOTO et al., 1997). A forma e a origem das moléculas elicitoras

podem ser variáveis, sendo mais predominante à ocorrência de carboidratos, glicoproteínas, proteínas e lipídios (RICCI et al., 1993; HAHN et al., 1993). Lipopolissacarídeos extracelulares de bactérias, glicoproteínas da parede celular de fungos patogênicos, carboidratos da parede celular de fungos não patogênicos e proteínas de filtrado de culturas de fungos não patogênicos são alguns exemplos de elicitores, purificados ou parcialmente purificados, capazes de ativar mecanismos de defesa de plantas (COVENTRY & DUBERY, 2001; HAHN & ALBERSHEIM, 1978; KOCH et al., 1998; SCHAFFRATH et al., 1995; SEJALON-DELMAS et al., 1997, DESENDER2007).

O tratamento de plantas com essas moléculas elicitoras pode levar, não apenas a uma resposta de resistência, mas a uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, culminando com o que é chamado de indução de resistência. O fenômeno de indução de resistência é caracterizado pela transformação de uma relação originalmente compatível entre planta e patógeno numa relação incompatível. Um exemplo disso é o indutor de resistência, Messenger, lançado pela Éden Bioscience, 2001, indicado para proteção de diversas plantas contra doenças de origem bacteriana, viral, fúngica, nematóides e insetos. O produto é formulado a base de uma proteína da bactéria *Erwinia amylovora*, agente causador do fogo bacteriano em pereira e macieira (GERSHENZON, 2002).

Nos estudos que descrevem os mecanismos de reações bioquímicas, como aqueles que ocorrem durante o reconhecimento de um elicitor pelo receptor na membrana plasmática das células vegetais, Schoch et al. (2002) verificaram que a indução de células de tabaco pelo elicitor β -megaspermina, extraído de parede celular de fungos e por ácido piperonílico (PIP) resultou no acúmulo de ácido salicílico e subsequentemente na ativação de respostas de defesa neste sistema de células em suspensão (GALLO & CROCOMO, 1995).

Em função das condições em que se encontram as células em cultura e dos estímulos recebidos, elas passarão a produzir, em maior ou menor escala, produtos do seu metabolismo secundário, muitos deles de grande interesse farmacêutico. Os metabólitos secundários vegetais apresentam grande valor do ponto de vista social e econômico, assim diversas estratégias têm sido empregadas visando aumentar os valores de produtividade de compostos bioativos em sistemas de cultura de células e tecidos vegetais. Uma dessas estratégias é a adição de elicitores em culturas de células em suspensão (DI COSMO & MISAWA, 1995; MARASCHIN & VERPOORTE, 2002).

Outros autores também constataram que a elicitação com quitosana aumenta significativamente, a produção de fenilpropanóides em cultura de suspensões celulares de *Cocus nucifera* (CHAKRABORTY & KARUN, 2008).

Estudos recentes demonstraram que o polissacarídeo ácido de *Chorisia speciosa* (Família: Bombacaceae) (F-I) é capaz de induzir atividade de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), tais como a quitinase e a laminarinase, além de induzir ao acúmulo de compostos fenólicos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (Família: Rosáceas). Os estudos do efeito elicitor de AS e F-I mostraram que estes compostos são potenciais indutores de resistência em amora-preta (De SOUZA, 2005).

Alguns metabólitos como: antocianinas, proantocianidinas, e fenilpropanóides podem ser estimulados por fatores de transcrição de outras espécies vegetais. Esse efeito foi observado com o fator LC (Maize leaf colour) isolado do milho, *Zea mays* L (Família: Poacea), o qual foi capaz de aumentar a síntese de antocianinas em células de *Malus domestica* (Família: Rosáceas) *in vitro* (HOUHUA et al., 2007).

A obtenção de culturas de células em suspensão e o conhecimento dos mecanismos capazes de modular a produção de metabólitos são fundamentais para que se possa utilizar esta estratégia para o desenvolvimento da produção de biomoléculas para fins terapêuticos e alimentares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estabelecer a cultura de células em suspensão de *Bauhinia forficata* Link capaz de produzir metabólitos bioativos, bem como avaliar o efeito do metil jasmonato (MeJA), ácido salicílico (AS) e da suplementação de diferentes concentrações e tipo de fonte de carbono, para o aumento de metabólitos com efeito hipoglicemiante.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Estabelecer as condições de cultura de células de *Bauhinia forficata* Link.
- 2) Utilizar os elicitores MeJA e AS na modulação da produção de metabólitos na cultura de *Bauhinia forficata* Link.
- 3) Determinar das curvas de dose-resposta e de tempo com os diferentes elicitores.
- 4) Caracterizar os metabólitos obtido a partir do extrato da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link com os diferentes elicitores.
- 5) Determinar o efeito de diferentes fontes de carbono na modulação de metabólitos da cultura de *Bauhinia forficata*. Link.
- 6) Determinar a atividade FAL e TAL com a utilização dos diferentes elicitores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

- Agitador AS 850 (Biolafitte)
- Autoclave vertical de bancada 100 L Marconi
- Câmara de Neubauer (Bioblock)
- Centrífuga Beckman J2 – 21
- Espectrofotômetro DU70
- Fluorímetro F – 4500 (Hitachi)
- Leitor de microplacas - SIGMA DIAGNOSTCS MOD EIA
- Microscópio óptico (Olympus CH2)
- Sonicador Vibra Cell (Sonic & Materials Inc.)
- Agitador de mesa orbital, modelo 140, MARCONI
- Agitador de plataforma, modelo 260250, BOEKEL
- Agitador de tubos, modelo AP 56, PHOENIX
- Balança analítica, modelo BG 4000, GEHAKA
- Balança analítica, modelo LIBROR AEL-40 SM, SHIMADZU
- Bomba de vácuo, modelo 141, PRIMAR
- Câmara de fluxo laminar vertical Veco
- Capela de fluxo laminar ENGELAB
- Centrífuga, modelo 5810R, EPPENDORF
- Centrífuga, modelo J2 – 21, BECKMAN
- Espectrofotômetro SPECTRONIC 20 GENESYS
- Estufa, modelo 002, FANEM
- Liofilizador, modelo 10-146 MR, VIRTIS
- Manta aquecedora, modelo 202, FISATON
- Micromoinho de faca de malha 0,3 mm, TECNAL
- Microscópio óptico JENA
- Rotaevaporador TECNAL
- Sistema de filtração MILLIQ, MILLIPORE
- Ultra-som, modelo T14, THORNTON

3.2 Reagentes e meios

Todos os reagentes e meios utilizados foram da marca Sigma-Aldrich, exceto o reagente Bio-Rad Protein Assay da marca BIORAD, o reagente de Folin-Ciocalteu (IMBRALAB) e o anticorpo monoclonal IgG1 de rato – anti-insulina (E3E3), Santa Cruz (sc57339).

3.3 Assepsia de sementes *Bauhinia forficata* Link

As sementes de *Bauhinia forficata* Link foram coletadas no sítio Brocas, município da cidade de Pedra Branca, Paraíba, Brasil. E uma exsicata foi depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier, Universidade Federal da Paraíba, sob o número 39985. As sementes foram selecionadas e lavadas cuidadosamente com água e detergente, com auxílio de uma esponja bem macia, para retirada das sujidades superficiais. Após esse processo de limpeza, as sementes foram, sequencialmente, tratadas com solução antifúngica, solução de hipoclorito de sódio e álcool 70% sob agitação contínua como demonstrado abaixo.

Assepsia 1

Solução antifúngica Benlax 2% por 2 horas.

Solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 30 minutos.

Solução de álcool 70% por 10 segundos.

Assepsia 2

Solução antifúngica Benlax 2% por 3 horas.

Solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 35 minutos.

Solução de álcool 70% por 20 segundos.

Assepsia 3

Solução antifúngica Benlax 2,5% por 2 horas.

Solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 40 minutos.

Solução de álcool 70% por 30 segundos.

Após o término da assepsia, as sementes foram inoculadas no meio de cultura para germinar..

3.4 Meio cultura para germinação das sementes de *Bauhinia forficata* Link

O meio de cultura MS (Tabela 1) foi preparado a partir de solução estoque (1:10 v/v). Para preparar 700 mL de meio, adicionou-se 35 mL da solução estoque de micronutrientes, 35 mL de solução estoque de macronutrientes e sacarose 30g/L, em seguida aferiu-se o pH para 5,8. Adicionou-se 2,3g/L de phytigel, aqueceu-se até ferver e distribuiu-se em frascos de cultura de 6,0 cm de diâmetro por 8,5 cm de altura com tampa transparentes. Autoclavou-se por 15min, a 120°C, 1atm.

Tabela 1 - Composição do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962)

Macronutrientes em (mg/L)		Micronutrientes (mg/L)	
NH ₄ NO ₃	1650	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ .H ₂ O	8,6
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ .H ₂ O	370	KI	0,83
KH ₂ PO ₄	170	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Fe-EDTA (mg)		Vitaminas e aminoácidos (mg)	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	Ácido nicotínico	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	Piridoxina. HCl	0,5
pH	5,8	Tiamina. HCl	0,1
		Glicina	2,0
		Mio-inositol	100

3.5 Preparo da Matriz de calos

As plântulas germinadas foram seccionadas com bisturi em câmara de fluxo laminar e introduzidas em uma matriz de transformação celular (Tabela 2) para obtenção de calos. Utilizou-se o meio MS (Tabela 1) e os reguladores de crescimento, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina (Cin), em sala de crescimento aclimatizada com fotoperíodo de 16 horas, a 1600lux, 25°C e umidade relativa de 25%. Depois de 20 dias foi determinado o melhor tratamento para obtenção de calos.

Tabela 2 - Matriz de calos da espécie *Bauhinia forficata* Link, utilizando o meio MS e reguladores de crescimento.

2, 4-D (mg/L) \ Cin (mg/L)	0,5	1,0	2,0
0,5	1	2	3
1,0	4	5	6
2,0	7	8	9

3.6 Preparação das células cultivadas

A partir da cultura *in vitro* de calos de *Bauhinia forficata* Link estabelecida em nosso laboratório, foi preparada a cultura de células em suspensão, utilizando o meio MS na presença de reguladores de crescimento 2,4-D 1mg/L, cinetina 1mg/L e 30g/L de sacarose, pH 6,0, sob 12 horas fotoperíodo com 1600 lux de iluminação, temperatura de 25°C, umidade 25% e uso de agitação contínua de 60 ciclos/minutos (MELLO et al., 2001).

3.7 Análise dos componentes do meio extracelular (ME) das suspensões de *Bauhinia forficata* Link

Foram retidas alíquotas de 30 mL de ME das culturas em suspensão de *Bauhinia forficata* Link, a cada subcultura, de 30 em 30 dias, para a análise do teor de compostos fenólicos e proteínas secretadas para o meio. Essas determinações foram realizadas em triplicata.

3.7.1 Determinação do teor de compostos fenólicos (SLINGLETON E SLINKARD, 1977)

Para determinação de compostos fenólicos totais, preparou-se padrão de ácido gálico nas concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{mol/L}$. Pipetou-se 50 μL das amostras, do branco (água deionizada) ou do padrão de ácido gálico e adicionou-se 50 μL de ácido acético 7%, 50 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e homogeneizou-se. Após 3 minutos foram adicionados 50 μL de carbonato dissódico saturado a 35% e 800 μL de água destilada. O sistema reacional foi mantido no escuro durante 90 minutos. A seguir, as leituras foram efetuadas a 725 nm em espectrofotômetro, o ensaio foi feito em triplicata.

3.7.2 Determinação do teor de proteínas (BRADFORD, 1976)

A quantidade de proteínas totais foi determinada por micro-ensaio em placa, utilizando como padrão albumina de soro bovina (BSA) nas concentrações que variaram de 2,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 160 μL de cada amostra, branco (água deionizada) ou padrão reagiram com 40 μL de reagente Coomassie G-250. O meio reacional de 200 μL foi homogeneizado. As leituras foram feitas em leitor ELISA, no comprimento de onda de 600 nm.

3.8 Extração de Proteínas para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blotting

As frações para análise por eletroforese foram preparadas a partir da trituração em nitrogênio líquido, de 1g de células cultivadas em suspensão (C), elicitadas ou não, e de folhas

(F) de *Bauhinia forficata* Link, na presença de tampão Tris HCl 0,03 mol/L pH 8,0 e 0,01 mol/L de β -mercaptoetanol. Após a trituração, as amostras foram centrifugadas a 957 x g por 10 minutos, retirados os sobrenadantes das (frações C e F) e realizada a quantificação de proteínas totais segundo método de BRADFORD (1973), item 3.4.2. Posteriormente, as amostras isoladas foram analisadas por eletroforese e western blotting. Foram inicialmente preparados os reagentes descritos a seguir.

3.9 Tampões, soluções e reagentes para eletroforese e western Blotting

Tabela 3 - Tampão de diluição de amostra 2x concentrado

Reagentes	Concentração
DTT.	100mmol/L
Tris-HCl pH6,8	80mmol/L
Glicerol	15% (v/v)
SDS	2% (m/v)
Azul de Bromofenol	0,006% (m/v)

Tabela 4 - Protocolo da preparação do gel de poliacrilamida

Soluções	Gel de empilhamento (5%)	Gel de corrida (15%)
Acrilamida 30,0% / bis-acrilamida 0,8%	340 μ L	4,0 mL
Tampão TRIS - HCl 1,5 mol/L pH 8,8	---	3,0 mL
Tampão TRIS - HCl 0,5 mol/L pH 6,8	500 μ L	---
H ₂ O deionizada	1,1 mL	760 μ L
SDS 10%	40 μ L	160 μ L
TEMED 10%	10 μ L	40 μ L
Persulfato de amônio 10%	10 μ L	40 μ L

Tabela 5 - Padrões de massa molecular “pré corados” para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE - Bio-Rad - 161-0318)

PROTEÍNA	Massa Molecular (Da)
Miosina	201.179
β Galactosidase	120.284
Albumina de soro bovino	100.236
Ovoalbumina	55.925
Anidrase Carbônica	38.289
Inibidor de Tripsina	29.678
Lisozima	20.669
Aprotinina	6.969

Tabela 6 - Padrões de massa molecular para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE - Raimbow– GE -RPN 755)

PROTEÍNA	Massa Molecular (Da)
Ovoalbumina	45.000
Anidrase Carbônica	30.000
Inibidor de Tripsina	20.100
Lisozima	14.300
Aprotinina	6.500
Insulina – cadeia β	3.500
Insulina – cadeia α	2.500

Tabela 7- Protocolo de preparação de tampão de corrida Tris/Glicina

Tris-HCl pH8,3.	25mmol/L
Glicina	250mmol/L
SDS	0,1% (m/v)

Tabela 8 – Protocolo de preparação da solução corante de Coomassie

Coomassie (Brilliant Blue G)	0,25% (m/v)
Metanol	50% (v/v)
Ácido Acético	7% (v/v)
H ₂ O deionizada q.s.p	100mL

Tabela 9 - Protocolo de preparação da solução descolorante

Metanol	50% (v/v)
Ácido Acético	7% (v/v)
H ₂ O deionizada q.s.p	100mL

Tabela 10 – Protocolo de preparação do Tampão de Transferência Western Blotting

Tris-HCl 1 mol/L pH7,6	25mmol/L
Glicina.	192mmol/L
Metanol	20% (v/v)
SDS	0,05% (m/v)
H ₂ O deionizada q.s.p	1000mL

Tabela 11 – Protocolo de preparação do Tampão TBS-T para Western Blotting

Tris-HCl 1 mol/L pH7,6	20mL
NaCl	8g
Tween 20	2mL
H ₂ O deionizada q.s.p	1000mL

3.10 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida

A caracterização eletroforética da proteína foi feita em gel de poliacrilamida desenvolvida em um sistema para eletroforese Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.), segundo metodologia descrita por LAEMMLI (1970). O gel de separação apresentando 15% de acrilamida e o gel de empilhamento com 5% de acrilamida foram preparados de acordo com protocolo da Tabela 4. Um volume de 10,0 μL das P e F obtidas foram diluídas em 10,0 μL de tampão de amostra 2x concentrado (Tabela 3). As amostras foram aplicadas diretamente no gel de poliacrilamida. A eletroforese foi desenvolvida sob corrente constante de 10 mA, a 4°C, utilizando-se o tampão de corrida tris-glicina (Tabela 7). Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi corado pela solução de Coomassie (Tabela 8) e descorado por lavagens em solução descolorante (Tabela 9). Como padrão de massa molecular foi utilizado os constantes na Tabela 6. Um segundo gel foi preparado nas mesmas condições, utilizando com padrões os contidos na Tabela 5 e 6 para análise de western blotting

3.11. Análise por Western Blotting

As proteínas resolvidas eletroforicamente, seguindo o mesmo protocolo do item 3.7, foram transferidas para membrana de nitrocelulose segundo Towbin et al. (1979), através de um sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad). A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada montando-se o gel de SDS-PAGE e a membrana em um sistema “sanduíche” entre filtros protetores. Este sistema foi colocado em uma cuba eletroforética, contendo tampão de transferência (Tabela 10) a 4°C, posicionada sobre um agitador magnético para homogeneização do tampão e aplicou-se uma corrente de 350mA por 60 minutos.

Após transferência, as membranas de nitrocelulose contendo as proteínas aderidas foram incubadas com tampão TBS-T (Tabela 11) contendo 5% de leite desnatado por 12 horas a 4°C. As membranas foram lavadas rapidamente com tampão TBS-T e incubadas com o anticorpo primário (monoclonal de rato) anti-insulina na diluição de 1:1.000 (v/v), por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Após este período, as membranas foram lavadas rapidamente por duas vezes, uma vez por 15 minutos e 3 vezes por 5 minutos com o mesmo tampão a uma razão de 4 mL por cm^2 de membrana.

O anticorpo secundário marcado com peroxidase (anti-anticorpo de rato), na diluição de 1:2.000 (v/v), foi incubado com a membrana por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante e um novo processo de lavagem foi realizado como anteriormente. Após as lavagens, volumes iguais das soluções de revelação contidas no Kit “ECL Western blotting detection reagents and analysis system” (Amersham Biosciences) foram misturadas, de modo que o volume final mantivesse uma razão de 0,123mL/cm² de membrana. A membrana foi incubada com esta mistura por 60 segundos e o excesso de solução foi seco em papel absorvente. A membrana foi colocada em um cassete de autoradiografia para exposição de 1 a 5 minutos. A marcação do anticorpo primário foi visualizada em filme fotográfico.

3.12 Padronização do protocolo para ensaios de elicitação no meio de cultura de *Bauhinia forficata* Link

Foram utilizadas células em suspensão de *Bauhinia forficata* Link, com 30 dias de subcultura, cultivadas segundo descrito no **item 3.3.4**. As células foram filtradas em membrana de 100 µm e submetidas à pesagem para preparação do inóculo a ser utilizado nos ensaios de elicitação.

3.12.1 Contagem e viabilidade celular

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer (Bioblock) com utilização de microscópio, para a padronização da quantidade de células a serem utilizadas nos ensaios de elicitação em massa (g) e não em número de células (cél/mL). A viabilidade foi acompanhada durante os bioensaios utilizando-se azul de Evans, segundo o método de Kanai e Edwards (1973). 5 mL de azul de Evans a 1% (m/v) foram adicionados a 10mL de suspensão de células, a percentagem de células viáveis foi dada pelo número de células não coradas para cada 100 células coradas. Para os experimentos foi considerada uma viabilidade mínima de 90%.

3.12.2 Elicitação no meio de cultura de células em suspensão de *Bauhinia forficata* Link

Foram preparados 35 erlenmeyer de 125 mL, cada um contendo 40 mL de meio de cultura (MS) suplementado com 30g/L de sacarose, devidamente autoclavados sob 120°C por 15 minutos. A seguir, foram acrescentados 2g de células, para cada elicitação com MeJA e AS, na concentração de 1µmol/L, nos tempo 0, 3, 6, 9 e 12 dias (T0,T3, T6, T9 e T12, respectivamente). Todo experimento foi realizado em triplicata. O controle foi preparado utilizando-se 1 mL de água deionizada como elicitor para cada tempo analisado. Após cada período de elicitação, as amostras foram filtradas separadamente, as frações sobrenadantes (S1) foram congeladas para análises posteriores. As frações R1, contendo as células, foram suspensas em 10 mL de tampão tris-HCl pH 7,2 e trituradas na presença de nitrogênio líquido, depois centrifugadas a 1000x g, por 10 minutos, obtendo-se as frações R2, as quais foram congeladas e os sobrenadantes (S2) foram separados para as análises de proteínas totais (item 3.4.1), fenólicos totais (item 3.4.2), açúcar redutores e lipídios totais, de acordo com o fluxograma contido na Figura 3.

3.12.2.1 Determinação do teor de açúcar redutor pelo método do ferricianeto (KIDBY; DAVISON, 1973)

O método consistiu em reagir 100 µL das amostras dos sobrenadantes (S1 e S2), padrão galactose, de 10 a 250 µg/mL, ou o branco (água deionizada), em triplicata, com 3 mL do reagente de Ferricianeto, sob aquecimento a 100°C durante 7 minutos. Em seguida, resfriou-se em gelo e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 420 nm.

3.12.2.2 Determinação do teor de lipídios totais (RADIN, 1969)

Pipetou-se 200µL das frações (S2) para um funil de separação de 200mL adicionou-se 5mL de solução de clorofórmio:metanol (2:1 v/v). Agitou-se a amostra, acrescentou-se 1 mL de solução de KCl 2mol/L, agitou-se novamente até surgir duas fases. Em seguida efetuou-se a separação das fases hidrofílica e lipofílica. A fase hidrofílica foi re-extraída nas mesmas condições anteriores, por duas vezes, a fim de retirar o restante dos lipídios contido nesta fase. As frações lipofílicas, separadas no processo, foram introduzidas em tubos de ensaio

previamente pesados, e deixadas por 24 horas na capela em temperatura ambiente para secagem. A seguir, pesaram-se os tubos para a determinação da quantidade de lipídios extraídos.

3.13 Elicitação com diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura de células em suspensão de *Bauhinia forficata* Link

Foram preparados 36 erlenmeyer de 125 mL, cada um contendo 40 mL de meio de cultura (MS) suplementado com 20g/L ou 40g/L de sacarose, devidamente autoclavados sob 120°C por 15 minutos. A seguir, foram acrescentados 2g de células, para cada elicitação com MeJA e AS, na concentração de 1µmol/L, nos tempo 6 e 9 dias, todo experimento foi realizado em triplicata. O controle foi preparado utilizando-se 1mL de água deionizada como elicitor para cada tempo analisado. Após cada período de elicitação, as amostras foram filtradas obtendo-se as frações S1 (sobrenadante) e R1. Das frações R1, contendo as células, foi separado 1 g para posterior extração da FAL (Fenilalanina Amônia Liase) e TAL (Tirosina Amônia Liase). O restante de cada uma destas frações foi suspenso em 10 mL de tampão tris-HCl pH 7,2 e triturados na presença de nitrogênio líquido, centrifugados a 1000x g, por 10 minutos, obtendo-se as frações R2, as quais foram congeladas. Os sobrenadantes S1 foram também congelados para análises posteriores. As frações S2 foram separadas para a caracterização dos compostos nesse meio.

3.14 Extração da enzima Fenilalanina Amônia Liase (FAL)

A extração da enzima FAL, foi executada segundo método descrito por Hagendoorn et al. (1991) com modificações realizadas Nita-Lazar et al. (2004). As células em suspensão de *Bauhinia forficata* Link foram centrifugadas a 500x g por 5 minutos a 4°C, para separação das células do meio de cultivo. Pesou-se 0,5g das células decantadas e triturou-se com nitrogênio líquido. Em seguida acrescentou-se ao triturado 2 mL de tampão borato de sódio 0,1mol/L, pH 8,8 e 1 mL de (DTT) Ditioneitol 2mmol/L e homogeneizou-se.

O homogeneizado foi centrifugado a 5000x g por 15min a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado 100mg de Dowex-8 (200-400 mesh) por 10min, sob agitação, a 4 °C. A mistura foi centrifugada por 5 min a 5000x g. O sobrenadante foi separado e a ele foi acrescentado 3

mL de (PVP) Polivinilpirrolidona 0,05% (m/v), permanecendo por 10 minutos em agitação a 4°C. A seguir a mistura foi centrifugada novamente a 5000x g por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido e submetido à diálise em unidades de ultrafiltração (Ultrafee™ Millipore 10KDa). Por fim foi realizada a quantificação de proteínas totais utilizando o método de (Bradford, 1976).

3.15 Determinação da atividade Fenilalanina Amônia Liase (FAL)

A atividade FAL foi determinada utilizando-se o método proposto por Assis et al. (2001). O meio reacional foi preparado com 250µg de proteína (0,25 mL), para cada reação, em 2,25mL de tampão borato de sódio 30mmol/L, pH 8,8. O substrato, 0,5mL de L-fenilalanina (30µmol), foi adicionado após 10 minutos de pré-incubação da enzima com o meio reacional. A atividade da enzima FAL foi determinada pela produção de ácido trans-cinâmico, durante 90 minutos a 37°C, sob agitação constante, acompanhada em espectrofotômetro (DU®-70, Beckman), a 290nm. Após este período, a reação foi interrompida com adição de 0,1 mL de HCl 6 mol/L.

Foi traçada uma curva de calibração utilizando ácido trans-cinâmico como padrão, conforme descrito por Saunders & McClure (1975) e Sreelakshmi & Sharma (2008), onde 0,01 de absorbância equivalem a formação de 3,09 nmol de ácido trans-cinâmico. A atividade da enzima foi definida em nmol de ácido trans-cinâmico por hora por mg de proteína.

3.16 Extração da enzima Tirosina Amônia Liase (TAL)

Segundo o método de Hagendoorn et al. (1991) com algumas alterações.

As células de *Bauhinia forficata* Link foram centrifugadas a 600 x g por 5 minutos a 4°C para o isolamento das células. Pesou-se 0,5g de células submetidas a cada tratamento, transferiu-se para um almofariz previamente resfriado, acrescentou-se 3 mL do tampão de extração, composto de uma mistura de 50mmol/L de tampão Tris-HCl; 1 mmol/L de EDTA; 240 mmol/L de sacarose; 90 mmol/L de PVP pH 8,8 e triturou-se a mistura com nitrogênio líquido.

Em seguida as amostras foram centrifugadas em 6000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado, acrescentou-se a este sobrenadante 2 mL Tris-HCl 0,1mol/L (pH 8,5), e 1 mL de (DTT) 2mmol/L homogeneizou-se.

O homogeneizado foi centrifugado a 6000 xg por 15min a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e adicionado 100mg de Dowex-8 (200-400 mesh) e 3 mL de PVP a 0,05% (m/v) permanecendo por 10 minutos em agitação, centrifugou-se novamente a 6000 x g por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido e submetido à diálise em unidades de ultrafiltração (Ultrafee™ Millipore 10KDa). Por fim; foi realizada a quantificação de proteínas totais, utilizando o método de (Bradford, 1976).

3.17 Determinação da atividade Tirosina Amônia Liase (TAL)

Segundo método Louie et al.(2006) e Rösler, et al (1997), com algumas modificações.

A reação foi iniciada adicionando-se 1mL de tampão Tris-HCl 0,1mol/L (pH 8,5) e 250µg da enzima a qual foi incubada por 2 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL do substrato L-tirosina na concentração de 2,4 mmol, deixando o sistema incubado sob agitação contínua por 10, 30, 60, 90 e 120 minutos. Cada reação foi interrompida com adição de 0,1 mL HCl 6 mol/L.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro DU-70 a 310nm, tendo como referência que 2,03 nmol de ácido *p*-cumárico são equivalentes a 0,01 de absorbância, conforme curva de dosagem de ácido *p*-cumárico descrita por Saunders & McClure, (1975) e Sreelakshmi & Sharma, (2008).

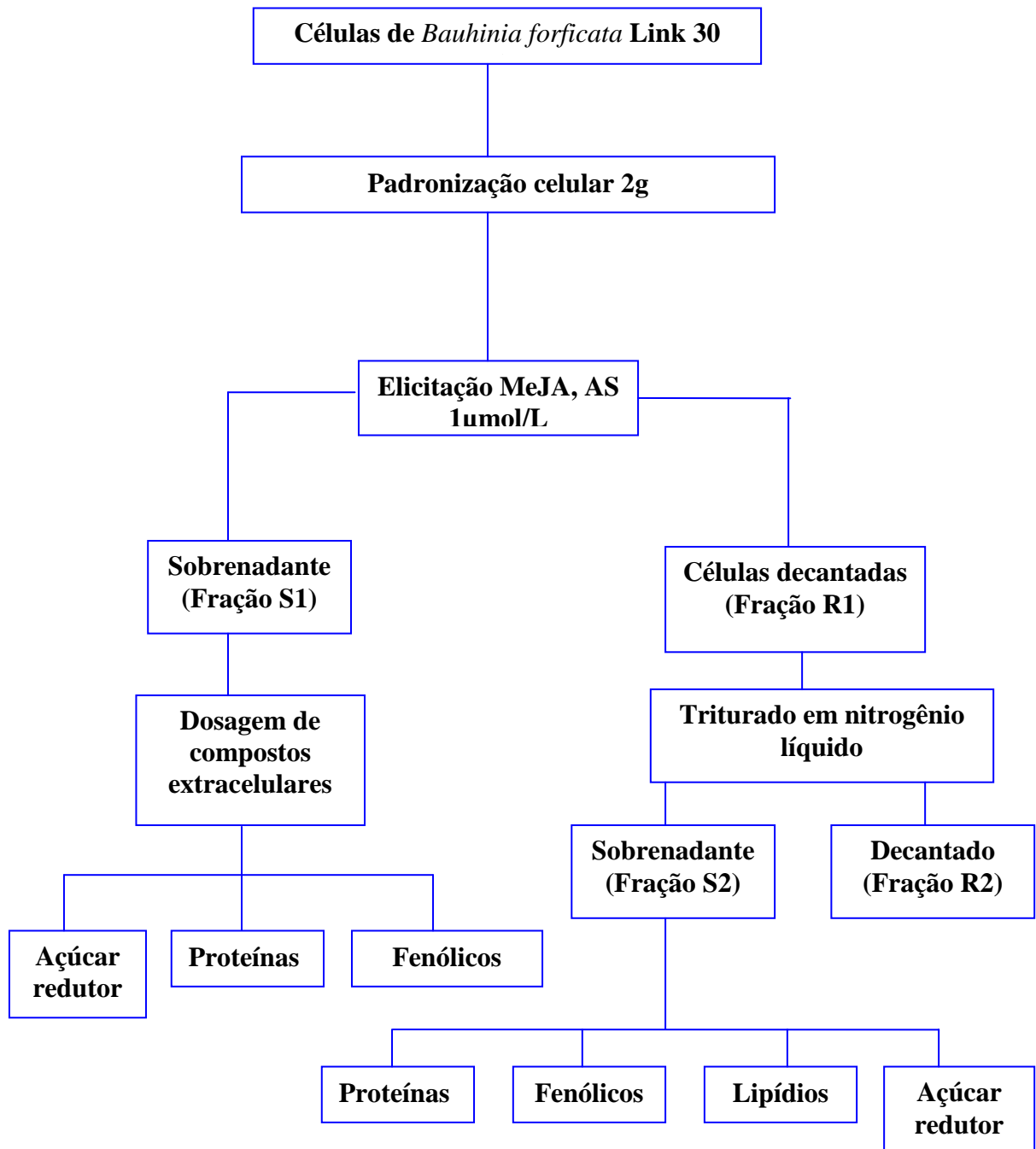


Figura 3. Fluxograma da padronização do protocolo experimental para os ensaios de elicitação com MeJA e AS para a produção de compostos bioativos, até 12 dias de cultivo celular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento da cultura de células em suspensão de *Bauhinia forficata* Link.

O estabelecimento da cultura de células em suspensão de *Bauhinia forficata* Link foi o primeiro passo a ser realizado para podermos comparar o potencial da cultura de células como fonte de metabólitos hipoglicemiantes, já caracterizados nas folhas desta espécie. Essa obtenção iniciou-se com a seleção e assepsia das sementes.

4.1.1 Padronização da assepsia para a germinação de sementes de *Bauhinia forficata* Link

A descontaminação na cultura de tecidos é o primeiro estágio de um trabalho de propagação vegetal, *in vitro*, pois da percentagem de êxito nesta etapa dependerá o progresso do protocolo experimental (DEBERGH, et al., 1991).

As sementes foram selecionadas e submetidas a 3 processos diferentes para a descontaminação das sementes de *Bauhinia forficata* Link, para a obtenção de plântulas a serem utilizadas posteriormente na matriz de brotação, conforme mostrado na Tabela 4, Figura 4. Verificou-se que a condição de assepsia 2, descrita no item 3.3.1 do Material e Métodos, utilizando seqüencialmente o antifúngico Benlax 2% durante 3 horas em combinação com hipoclorito de sódio a 0,5% com 35 minutos de exposição e álcool 70% por 20 segundos, mostrou-se eficiente na descontaminação das sementes de *Bauhinia forficata* Link. O que pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 12, Figura 3. Entre as 9 sementes submetidas ao tratamento 2 (Tabela 2, página 34) não houve nenhum caso de contaminação, porém a taxa de germinação, após 20 dias de inoculação, foi de 77,7% (7 sementes germinadas). Nos tratamentos 1 e 3 a taxa de germinação foi de 22,2 e 11,1%, respectivamente, havendo contaminação tanto por fungos como por bactérias. Além da descontaminação não ter sido eficiente, os processos causaram baixa germinação e pouco crescimento das plântulas.

Muitos fatores podem está relacionados com a germinação e desenvolvimento de uma espécie, segundo Popinigis (1977). Entre eles, o grau de maturação fisiológico e sanidade das sementes são fatores determinantes para se obter uma boa germinação.

Tabela 12 - Determinação do perfil de germinação de sementes de *Bauhinia forficata* Link 20 dias após a inoculação das sementes, com diferentes tratamentos de assepsia

Nº do tratamento	Quantidade de sementes por tratamento	Contaminação por bactéria	Contaminação por fungo	Nº de sementes germinadas	Nº de sementes não germinadas	germinação (%)
1	9	3	2	2	2	22,2
2	9	-	-	7	2	77,7
3	9	4	3	1	1	11,1



6 dias



15 dias

Figura 4. Sementes de *Bauhinia forficata* link, após 6 e 15 dias de germinação.

baixa germinação pode ser atribuída ao efeito dos tratamentos, pois dependendo da concentração e tempo de exposição aos agentes, pode ocorrer algum dano ao endosperma da semente, o que causa uma queda na taxa de germinação. O tratamento de assepsia aplicado a *Labisia pumila* constou do tratamento seqüencial com o antifúngico Benomil 2% por 2 horas, hipoclorito de cálcio 1% por 25 minutos e álcool 70% por 15 segundos. Esse processo foi semelhante ao que utilizamos para *Bauhinia forficata* Link, porém a taxa de germinação para as sementes de *L. pumila* foi de 88,7% (HARTINIE & JUALANG, 2007). Observou, portanto, que a taxa de germinação pode ser melhorada aplicando-se processos de descontaminação, com concentrações menores destes reagentes por tempos mais prolongados, o que pode diminuir os efeitos sobre as sementes sem comprometer a processo de assepsia.

4.1.2 Padronização das condições de obtenção de calos de *Bauhinia forficata* Link.

O objetivo principal desta etapa foi o estabelecimento da cultura de calos de *Bauhinia forficata* Link, em matriz semi-sólida, e principalmente a estabilização de linhagens de células com capacidade de se manter em divisão por um longo período de tempo.

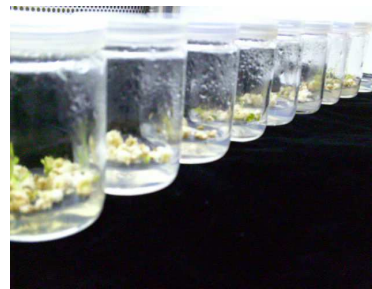
Os resultados na Tabela 13 e Figura 5, mostram os efeitos dos diferentes tratamentos realizados utilizando-se combinação de 2,4-D e cinetina de 0,5 até 2 mg/mL (Tabela 2, página 26) para a indução de calos. Os tratamentos 1, 2, 3, 6, 7 e 9, não apresentaram desenvolvimento de estrutura calosa. Enquanto os tratamentos 4, 5 e 8 apresentaram formação estrutural de desdiferenciação celular de 33,3, 100 e 33,3 %, respectivamente.

O tratamento 5, utilizando os reguladores de crescimento, 2,4-D e cinetina 1 mg/mL, foi o que apresentou melhor resultado, pois as estruturas formadas apresentaram maior taxa de divisão celular, as quais foram monitoradas e repicadas a cada ciclo de desenvolvimento de 30 dias, para formar uma matriz de produção de células.

A partir dos resultados obtidos nessa fase de estabelecimento da cultura de *Bauhinia forficata* Link as células em suspensão foram cultivadas em meio MS, com os reguladores de crescimento 2,4-D e cinetina a 1mg/L, utilizando-se 30g sacarose como fonte de carbono. Essas condições do meio apresentaram-se como uma boa fonte de nutrientes para espécie *Bauhinia forficata* Link, tendo sido bastante semelhante com os resultados obtidos na literatura para a cultura de *Carica papaya*, onde foi usada a mesma suplementação e condições para o estabelecimento da cultura de células (CABRAL et al., 2008).

Tabela 13 - Análise da matriz de transformação celular de *Bauhinia forficata* Link

Tratamentos	Contaminações por fungos	Contaminações por bactérias	Quantidade transformada em calos	Quantidade não transformada	Quantidade transformada (%)
1	1	1	-	1	-
2	-	2	-	1	-
3	1	-	-	2	-
4	1	-	1	1	33,3
5	-	-	3	-	100
6	1	1	-	1	-
7	2	1	-	-	-
8	1	1	1	-	33,3
9	1	2	-	-	-

**Figura 5.** Pré-formação de calos de *Bauhinia forficata* Link

4.2 Análise de proteínas totais e compostos fenólicos no meio extracelular das suspensões de *Bauhinia forficata* Link

Uma alíquota do meio extracelular foi analisada a cada repique das células *Bauhinia forficata* Link, a fim de monitorar a sua estabilização (Figura 6). Os resultados da liberação de proteínas totais no meio extracelular (ME) nas suspensões celulares de *Bauhinia forficata* Link, na fase de estabelecimento da cultura com repiques de 30 em 30 dias, mostraram que houve grande flutuação nas concentrações de proteínas liberadas (10 a 65 µg/mL) durante esse período. Houve uma baixa produção nos meses de fevereiro/2007 até setembro/2007 tendo uma produção média de 13µg/mL e voltando a ter valores crescentes, do mês de outubro/2007 a julho/2008, com uma produção média de 35µg/mL. Estes dados não forneceram informações sobre o perfil protéico da cultura.

Os compostos fenólicos apresentaram dados que indicaram uma produção média de 283µg/mL de compostos fenólicos totais nos meses de fevereiro/2007 a julho/2007. Entre os meses de agosto/2007 a julho/2008, a produção média foi de 460µg/mL, com pequena variação entre os valores obtidos a cada mês. Estes resultados sugerem uma estabilização da cultura a partir de agosto de 2007, o que é de grande importância, pois nosso estudo visou, entre outros objetivos, estimular os mecanismos de defesa vegetal para se obter metabólitos secundários (flavonóides), assim o monitoramento de compostos fenólicos pode ser utilizado com um parâmetro para avaliar a estabilidade da cultura e seu nível de estresse. Os compostos fenólicos são sintetizados pelas plantas após lesões causadas por herbívoros, infecção por bactéria, fungo, vírus ou nematóides, como forma de proteção. Assim, a cultura de *Bauhinia forficata* Link utilizou-se dessa ferramenta metabólica a fim de controlar os desequilíbrios sofridos durante o processo de estabilização da cultura (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992).

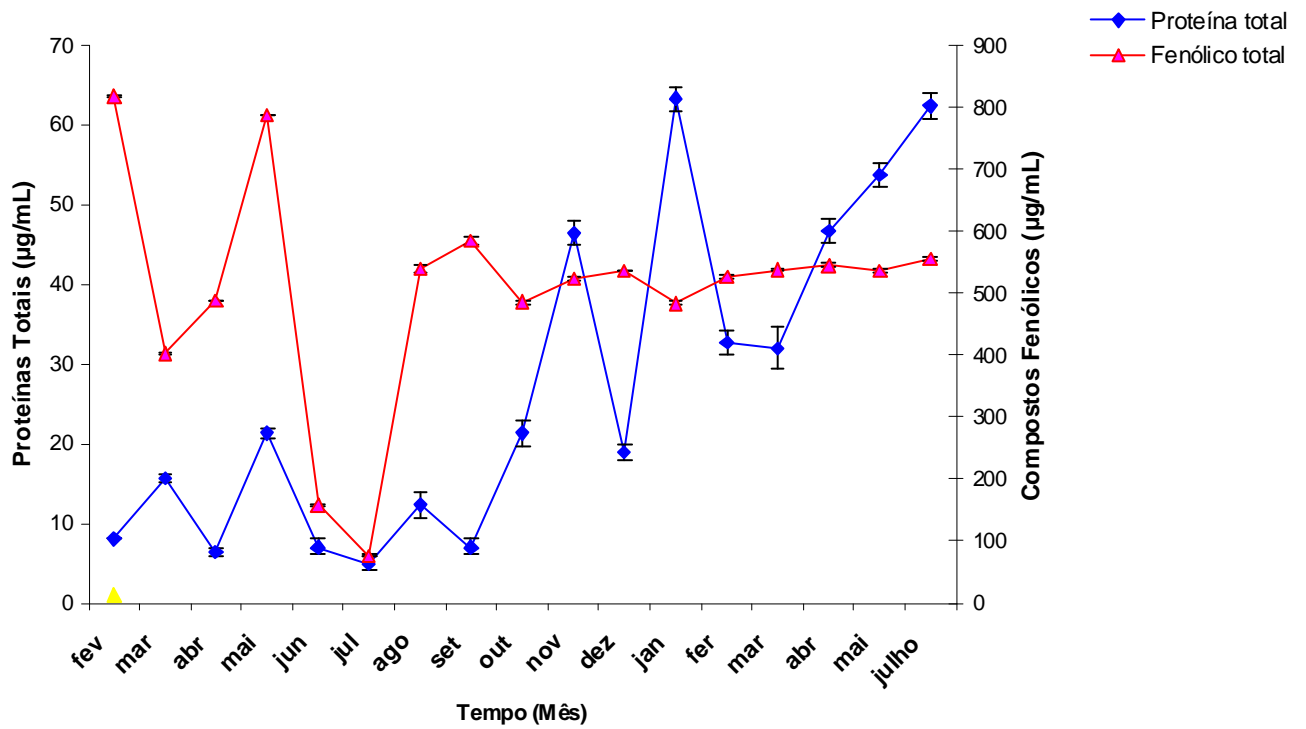


Figura 6. Avaliação dos teores de proteínas totais e compostos fenólicos totais no meio extracelular, durante a estabilização das suspensões celulares de *Bauhinia forficata* Link.

4.3 Análise por eletroforese e por western blotting das proteínas obtidas das células cultivadas *in vitro* e de folhas de *Bauhinia forficata* Link

A Figura 7 apresenta a análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de cultura de células e de folhas de *Bauhinia forficata* Link. O perfil eletroforético das duas frações permitem observar três bandas principais de massas moleculares diferentes, uma com massa acima de 45 KDa, a segunda banda com massa molecular de 42 KDa e a terceira banda com aproximadamente 6 KDa. Estas proteínas reveladas pela coloração com Coomassie Brilliant Blue G, que apresentaram massa molecular entre 6,5 KDa e 6 KDa, demonstrando um perfil bastante semelhante nas duas frações. Na literatura são encontrados trabalhos que demonstraram a existência de diferença de perfil protéico, quando analisadas frações a partir da cultura *in vitro* e *in vivo*, porém isso não ficou demonstrado em nosso resultado. Nas duas frações observamos a presença de uma banda em aproximadamente 6,0 KDa, valor de massa molecular correspondente as proteínas vegetais para as quais é atribuído uma função hipoglicemiante.

A Figura 8 apresenta o resultado da análise de peptídeo de folhas e células de *Bauhinia forficata* Link por Westem Blotting, usando anticorpo anti-insulina humana e padrões das cadeias de insulina α e β .

Neste resultado observa-se que a banda de 6 KDa que apareceu na eletroforese Figura 7 não se tratava de peptídeo similar a insulina. Os extratos utilizados foram folhas *in natura* de *Bauhinia forficata* Link, e células de folhas cultivadas *in vitro*, ambas não apresentaram nem um reconhecimento pelo anticorpo antiinsulina. Trabalhos da literatura afirmam a existência desta proteína similar a insulina humana, como já descrevemos no item 1.5 da Introdução, em diferentes espécie incluindo a *Bauhinia forficata*. Venâncio e colaboradores (2000, 2003) relataram à presença de insulina vegetal em vargens, tegumentos das sementes e folhas de *Vigna unguiculata* L, bem como nas folhas de *Bauhinia forficata* Link. Azevedo (2006) descreveu a existência deste mesmo peptídeo nas folhas de *Bauhinia variegata* Linn, demonstrando que esse peptídeo se encontra, predominantemente, associado aos cloroplastos, que são organelas responsáveis pelos processos fotossintéticos que se dão nas folhas dos vegetais.

No entanto os nossos resultados não apresentaram nenhum indício deste peptídeo, seja *in vitro*, seja nas folhas *in natura*, os métodos utilizados foram os mesmo citados na literatura por AZEVEDO (2006).

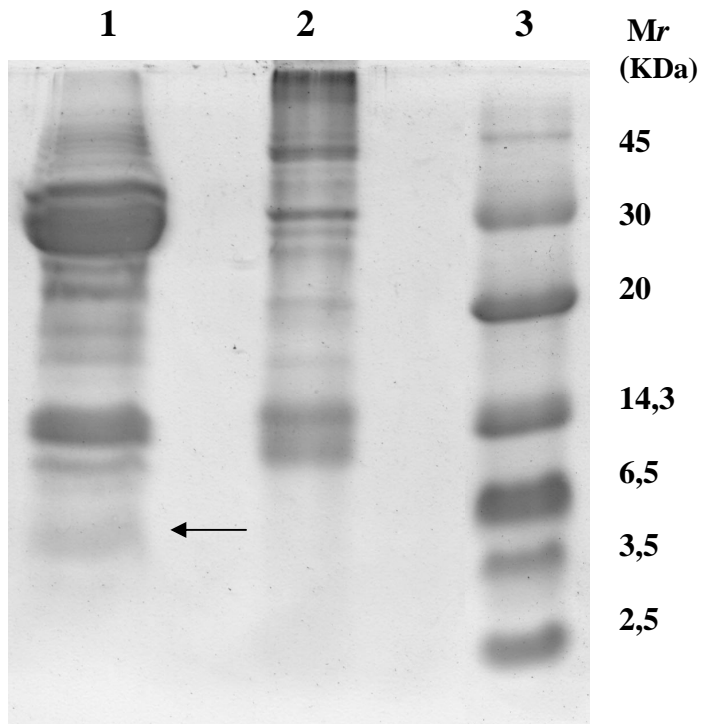


Figura 7. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes das proteínas de *B. forficata* obtidas de diferentes fontes. **1-** células de folhas de *Bauhinia forficata* Link; **2-** proteínas obtidas a partir de células cultivadas *in vitro* de *Bauhinia forficata* Link; **3** padrões de massa molecular - GE (RPN 755)

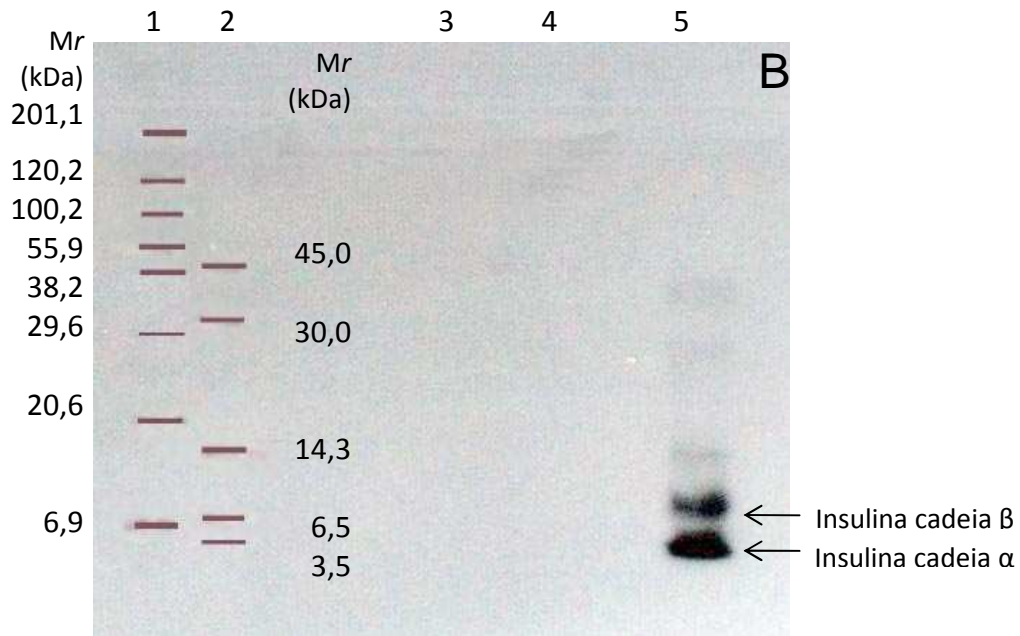


Figura 8. Western Blotting das proteínas de *B. forficata* obtidas de diferentes fontes. **1-** padrões de massa molecular – Bio Rad (161-0318); **2-** padrões de massa molecular - GE (RPN 755); **3-** células de folhas de *Bauhinia forficata* Link; **4-** proteínas obtidas a partir de células cultivadas *in vitro* de *Bauhinia forficata* Link; Insulina padrões de massa molecular – GE (RPN 755).

4.4 Padronização do protocolo para ensaios de elicitação no meio de cultura de *Bauhinia forficata* Link.

A padronização dos ensaios de elicitação no meio de cultura iniciou-se pela determinação da massa a ser inoculada em cada experimento com células de *Bauhinia forficata* Link, utilizando-se como parâmetro o número de células usadas para os experimentos de elicitação com *Rubus fruticosus* de 2×10^6 células 25 mL (DE SOUZA, 2005). A contagem foi substituída pelo valor de massa devido ao alto grau de agregação das células que causam grande dispersão nos resultados.

Foram realizados 6 experimentos isolados de contagem e pesagem das células, em triplicata, obtendo-se o valor de $2,95 \times 10^6$ cél/g de massa úmida de *Bauhinia forficata* Link. Assim o valor de massa que corresponde a 2×10^6 células foi de 676 mg.

Dados da literatura demonstraram que há uma quantidade mínima de inóculo para que o crescimento da cultura não seja afetado e haja uma proporcionalidade entre o volume do meio e a massa celular cultivada. A utilização de volume de inóculo muito pequeno pode inviabilizar a cultura celular, devendo-se correlacionar volume da cultura com volume do inóculo (DUANGJAI, 2007, CHANG-HAI, 2008).

Gunjan & Ashok (2008) realizaram estatísticas de elicitação com células de *Azadirachta indica* e estabeleceram um inóculo de 5g de células para iniciar a cultura de suspensões celulares em um volume de 100 mL de meio. Associando os dados de literatura com os dados obtidos para *Rubus fruticosus*, determinou-se que o inóculo para as elicitações com *Bauhinia forficata* Link seriam preparados com 2g de células para cada tratamento, visto que os ensaios seriam realizadas direto nas suspensões celulares (volume de 40mL), a partir do repique. A viabilidade das células também foi determinada de 95,03%, o que demonstrou uma boa eficiência na manutenção da cultura.

4.5 Análise do efeito dos elicitores, MeJA e AS, sobre a liberação de compostos fenólicos no meio extracelular (fração S1) e intracelular (fração S2) da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link, em diferentes tempos

Os resultados para a liberação de compostos fenólicos totais, no meio extracelular, Figura 9, não apresentaram diferenças entre os dois elicitores, no tempo de 3 dias de elicitação. No entanto, na fração intracelular, Figura 9, houve um aumento da produção de

compostos fenólicos da ordem de 40% para MeJA em relação ao controle e de 30% se comparado ao AS.

Em 6 dias de elicitação, não ocorreu efeito significativo na concentração de fenólicos extracelulares com MeJA, porém a elicitação com AS apresentou um aumento de 51,4% comparando-se ao controle. Na fração intracelular, o MeJA apresentou valor de 2,6% superior ao de AS e 57% quando comparado ao controle.

No tempo de 9 dias, a fração extracelular, elicitada com AS, apresentou um aumento de 20% no teor de compostos fenólicos em relação ao MeJA e 51,6% se comparado com o controle. Na fração intracelular, o AS foi 5,7% mais eficiente que o MeJA, e 45,9% em relação ao controle. Em 12 dias, a fração extracelular o MeJA, causou um aumento de 8,8%, quando comparado com o controle. Na fração intracelular ambos elicitores não apresentaram variações em relação ao controle.

A partir dos resultados obtidos com MeJA e AS, verificou-se que os melhores tempos para a liberação de compostos fenólicos extracelulares, foram 6 e 9 dias.

Quanto aos compostos fenólicos intracelulares (Figura 10), são obtidos aumentos significativos com tempos mais curtos, a partir de 3 dias de elicitação. Assim, observou-se que os dois elicitores foram capazes de estimular a liberação de compostos fenólicos nesse sistema celular, visto seus papéis de moduladores de respostas de defesa em plantas (JONG & YANG, 2003; DE SOUZA, 2007, JIAN, et al., 2006). Estudos com AS demonstraram seu efeito no aumento da síntese de fenilpropanóides em maçã, *Malus domestica* Borkh, (HOUHUA et al., 2007). O mesmo ocorreu com o MeJA que, em pequenas concentrações, foi capaz de ativar vias de defesa celular em células de *Rubus fruticosus* (DE SOUZA, 2005).

Estudos posteriores serão necessários para determinar-se qual desses tempos de elicitação contém a maior quantidade de flavonóides, já caracterizados na literatura pela sua ação hipoglicemiante (DA SILVA, 2002).

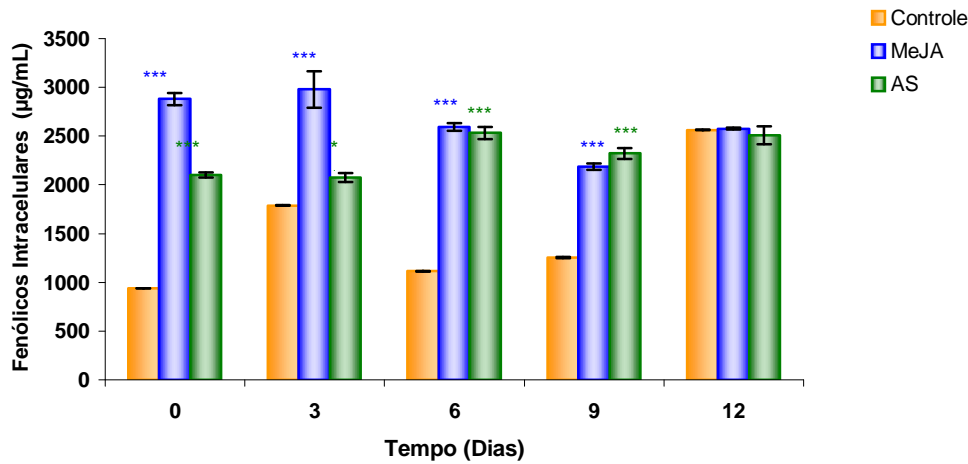


Figura 9. Avaliação do tempo de elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link, para a liberação de compostos fenólicos totais extracelular, com MeJA e AS na concentração de $1\mu\text{mol/L}$ e respectivos controles. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM ANOVA seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests.

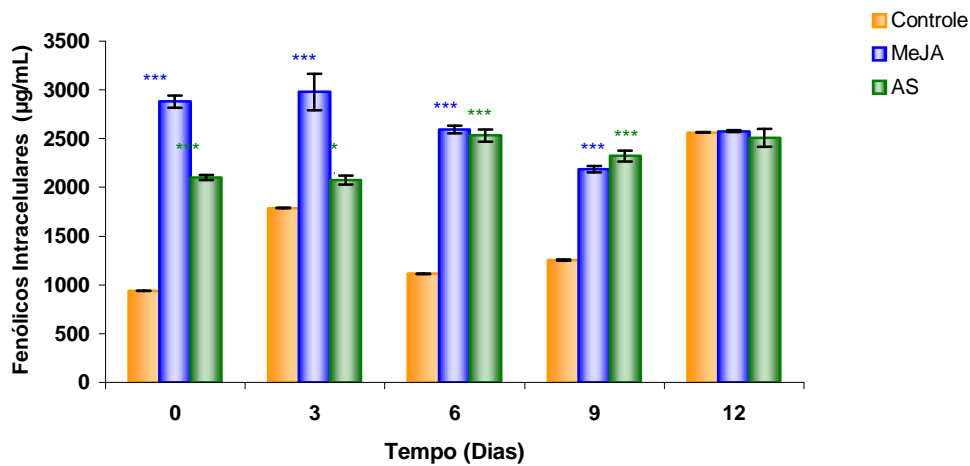


Figura 10. Avaliação do tempo de elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link, para a produção de compostos fenólicos totais intracelulares, com MeJA e AS na concentração de $1\mu\text{mol/L}$ e respectivos controles. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM ANOVA seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests.

4.6 Análise do teor de proteínas totais extra (fração S1) e intracelulares (fração S2) nas células de *Bauhinia forficata* Link elicitadas com MeJA e AS, em diferentes tempos

As figuras 11 e 12 apresentaram os resultados da elicitação de proteínas totais, no meio extracelular e intracelular, com MeJA e AS. No tempo de 3 dias o MeJA apresentou um aumento no teor de proteínas na fração extracelular de 14,4% em relação ao valores obtidos para AS e 36%, quando comparado ao seu controle. Na fração intracelular, MeJA teve produção de 17,6%, superior ao controle, e o AS foi inibitório neste tempo de elicitação.

Em 6 dias, na fração extracelular, o MeJA apresentou um aumento de 32% a mais que AS e 48,8% em relação ao controle. No meio intracelular, MeJA causou um aumento de 43,4% em relação ao controle. No tempo de 9 dias, no meio extracelular, o MeJA apresentou seu maior efeito de liberação proteínas, em relação ao controle, 72%. O mesmo acontecendo no meio intracelular, onde com MeJA obteve-se 37,8% de proteínas totais a mais que com o AS e 92,3% acima do controle.

O resultados com MeJA e AS no meio extracelular, com 12 dias, foram 29 e 18% superiores ao controle, respectivamente. Na fração intracelular o MeJA apresentou valor 10,5% acima dos obtidos para a AS e 15,9% superior ao controle.

Nos resultados apresentados ficou demonstrado que MeJA foi mais ativo que o AS em relação a todos os tempos analisados, tanto nas frações extracelulares como nas frações intracelulares.

O aumento de proteínas totais elicitadas por MeJA e AS, tanto nas frações extracelulares ou intracelulares, pode estar relacionado a síntese de enzimas e proteínas envolvidas nos diferentes mecanismos de defesa vegetal. Entre esses processos temos a produção de compostos fenólicos que exigem um grande maquinário protéico para ativação das vias de síntese, como é demonstrado, em diferentes células vegetais submetidas a mudanças de fatores ambientais, que levam a ativação de vias mediadas por AS e MeJA (RORY et al., 2008).

Na literatura encontramos dados que mostram que a aplicação exógena de MeJA e AS pode induzir a síntese de proteínas (GOZZO, 2003), principalmente, quando há uma grande atividade do metabolismo secundário. Onde o fluxo de proteínas ativas é muito grande, o que contribui para o aumento significativo da síntese de proteínas, em grande parte, envolvidas na

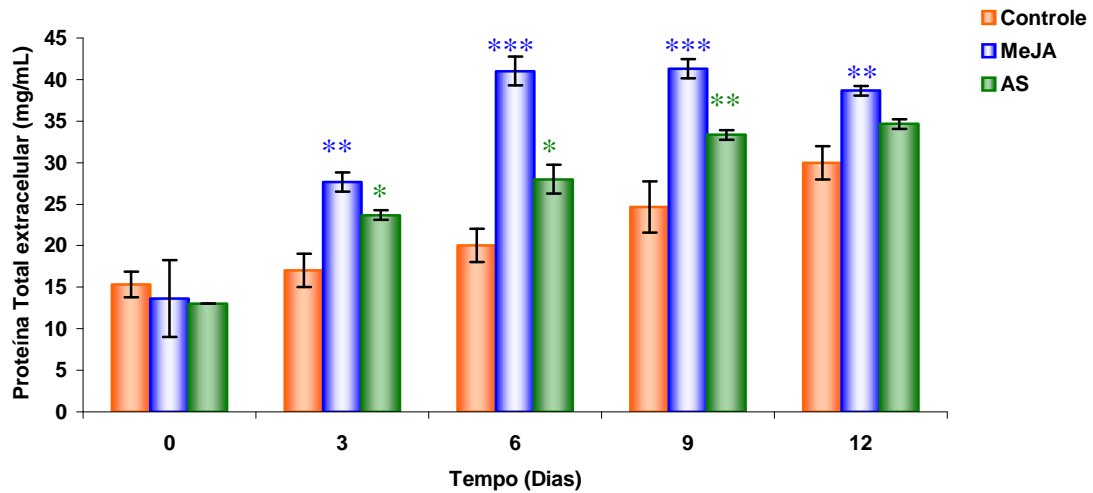


Figura 11. Avaliação do tempo de elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link para a produção de proteínas totais extracelulares com MeJA e AS na concentração de $1\mu\text{mol/L}$ e respectivos controles. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM ANOVA seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests.

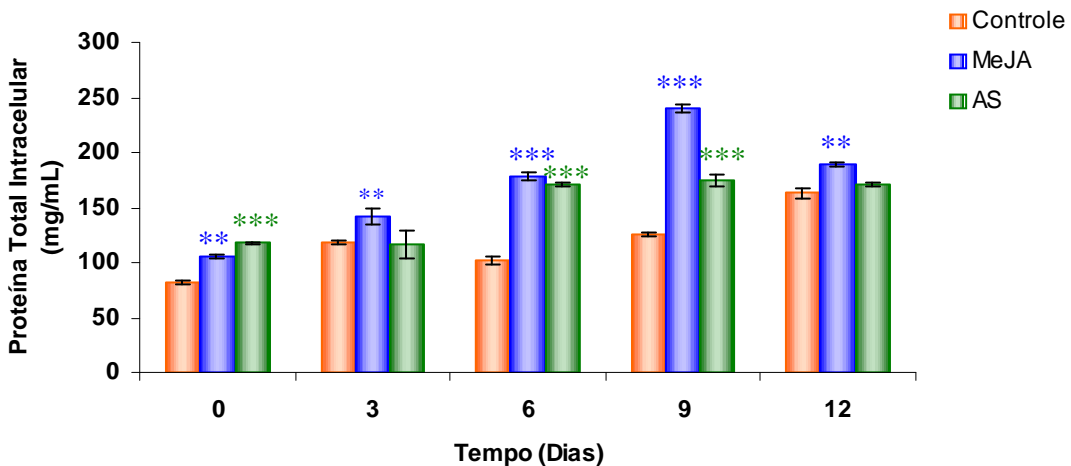


Figura 12. Avaliação do tempo de elicitação de proteínas totais intracelular com MeJA e AS nas concentrações de $1\mu\text{mol/L}$ em cultura de células de *Bauhinia forficata* link e respectivos controles. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM ANOVA seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests.

produção de antioxidantes celulares, visto que uma alta atividade celular gera uma grande quantidade de radicais livres dentro e fora da célula, o que justifica a síntese destas moléculas (HIROKO et al., 2008).

4.7 Análise do teor de açúcar redutor no meio extracelular, frações (S1), de cultura de células de *Bauhinia forficata* Link após elicitação MeJA e AS, em diferentes tempos

A Figura 13 apresenta os resultados da análise de açúcar redutor nas frações extracelulares S1, após a elicitação com MeJA e AS. Pode-se observar que no tempo de 3 dias, o MeJA apresentou um resultado de 12,5% a mais que o AS e 23,4% acima do controle. No tempo 6, MeJA apresentou um aumento de 8,2% em relação ao controle.

Nos tempos 9 e 12 dias, com MeJA, obteve-se um valor média de 2,7% maior que o controle, e AS foi inibitório para estas frações. Com base nestes resultados verificou-se que MeJA foi o elicitor que mais induziu a liberação de açúcares redutores nas células de *Bauhinia forficata* Link, enquanto AS teve uma pequena produção de 10,9% em relação controle no tempo 3 dias.

Estes resultados podem sugerir que o aumento de açúcares redutores provenientes da elicitação com MeJA pode estar ligado a liberação de carboidratos da parede celular, tanto por degradação decorrente de algum processo de morte celular, como por liberação de moléculas sinalizadoras decorrentes dos processos de expansão e crescimento celular (MING, et al., 2008). Foi observado que MeJA provocou um efeito maior destes eventos, principalmente, nos tempos 3 e 6 dias tendo uma significativa redução nos tempos 9 e 12 dias.

4.8 Análise do teor de lipídios totais no meio intracelular, fração S2, em células de *Bauhinia forficata* Link elicidadas com MeJA e AS, em diferentes tempos

A produção de lipídeos foi medida na fração S2, fração intracelular. Nos resultados mostrados na Figura 14, verifica-se que os tempos 3 e 9 dias não tiveram diferença significativa entre os valores obtidos com os dois elicitores em relação ao controle. No entanto, os tempos 6 e 12 dias apresentaram a produção de lipídios totais discretamente aumentada com MeJA em 6 e 12 dias de 0,23% e 0,66%, respectivamente.

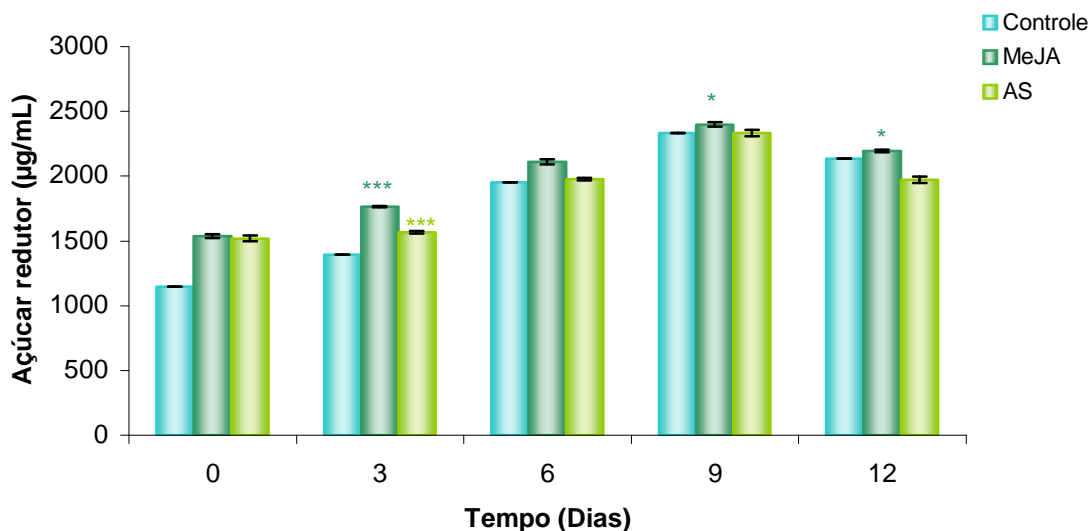


Figura 13. Avaliação do tempo de elicitação de células de *Bauhinia forficata* Link com MeJA e AS, para a produção de açúcares redutores na fração (S1). *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM Anova seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests.

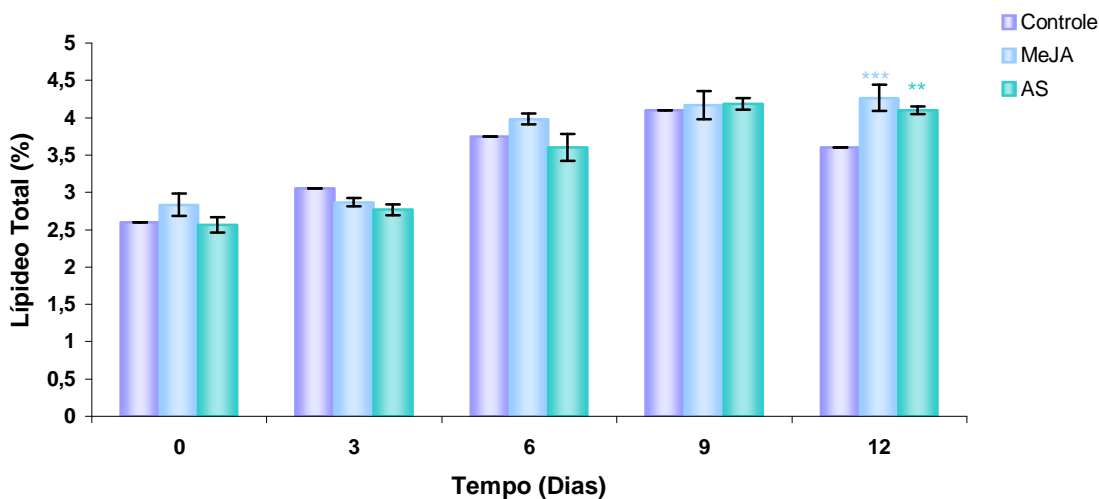


Figura 14. Avaliação do efeito do tempo de elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link com MeJA e AS na concentração $1\mu\text{mol/L}$, sobre o percentual de lipídeos totais. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM Anova seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests.

O AS em 12 dias também demonstrou pequena variação, 0,5%, sendo que no tempo 6 dias foi inibitório. Com base nos resultados verificou-se que não ocorreu modulação de resposta ou aumento significativo dos níveis de lipídeos totais em relação ao controle, o que pode ser decorrente do processo de rompimento mecânica utilizado.

4.9 Análise do efeito da variação de concentração de sacarose sobre a elicitação de compostos fenólicos extracelulares (fração S1) e intracelulares (fração S2), mediada por MeJA e AS, na cultura de células de *Bauhinia forficata* Link

De acordo com os resultados obtidos na elicitação com MeJA e AS nos tempos de 3 a 12 dias, verificou-se que o aumento da produção de compostos fenólicos e proteínas na cultura de *Bauhinia forficata* Link foi mais efetivo em 6 e 9 dias de cultura. Assim, fomos verificar nesses tempos se a alteração da concentração de sacarose no meio poderia melhorar esse processo.

A Figura 15 apresenta os resultados da elicitação, no meio extracelular das células de *Bauhinia forficata* Link, com MeJA e AS a 1µmol/mL, frente as concentrações de sacarose de 20, 30, 40g/L, nos tempos de 6 dias e 9 dias, para avaliação de compostos fenólicos.

No tempo de 6 dias com 20g/L de sacarose, as frações elicidadas com AS apresentaram uma produção média de compostos fenólicos de 64% contra 25,7% com MeJA, ambos comparados com o controle. Na concentração de 30g/L de sacarose, o AS mostrou-se ainda mais eficiente, frente ao controle, com uma produção média de 105%. Enquanto que MeJA teve uma produção de 6,7%. Entretanto, na concentração de 40g/L, o AS demonstrou uma diminuição no percentual, passando a 75% de elicitação em relação ao controle e com MeJA ocorreu um inibição da produção.

No tempo de 9 dias, com 20g/L de sacarose, o AS apresentou uma produção média de 34%, enquanto que MeJA foi de 56%, em relação o controle. Na concentração de 30g/L mostrou uma produção ainda maior em relação à concentração anterior, sendo que AS produziu 107% e MeJA 65% superior ao controle. No tratamento com 40g/L de sacarose observou-se que ocorreu um decréscimo com AS, apresentando 62% e MeJA 84% .

Os elicitores AS e MeJA, foram eficientes na modulação para produção de compostos fenólicos, associados com a suplementação com sacarose na concentração 30g/L, tanto no tempo 6 dias, como no tempo 9 dias, a produção ficando muito maior que com as demais concentrações. Estudos realizados com subculturas de *Taxus* sp tem comprovado a eficácia de

MeJA como elicitor de taxol, um metabólito secundário de muito valor farmacêutico, que tem produção aumentada, significativamente, quando o elicitor MeJA é adicionado a cultura em suspensão, em períodos de cultivo de até 35 dias, comprovando que o elicitor foi capaz de aumentar exponencialmente a produção de taxol (BEUM et al., 2004). Foi verificado no estudo de transcriptoma, com AS e MeJA, que mais de 137 genes relacionados com a transdução e regulação do metabolismo secundário foram ativados a partir de elicitação com elicitores específicos o que justifica o aumento de compostos fenólicos, extra e intracelular de suspensões de *Bauhinia forficata* Link (DAYAKAR et al., 2008).

Na Figura 16 temos os resultados da elicitação, com os elicitores AS e MeJA, na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, os quais foram capazes de induzir o aumento da síntese de compostos fenólicos intracelulares, quando associados com sacarose.

No tempo 6 dias, com 20g/L de sacarose, observou-se um aumento da produção da ordem de 103% para AS e de 143% para MeJA, ambos comparados com o controle. Na concentração de 30g/L de sacarose, esse aumento foi de 127% para AS e 133% para MeJA. A concentração 40g/L de sacarose apresentou uma produção de 94% para o AS, enquanto com MeJA foi inibitório nesta concentração.

No tratamento de 9 dias, 20g/L de sacarose, os resultados foram de 62% com AS e 40% para MeJA. Na concentração de 30g/L de sacarose, os resultados foram de 86% e 75% com AS e MeJA, respectivamente. Porém, a concentração 40g/L de sacarose induziu 70% para AS e 91% em MeJA, todos comparados com o controle. Apesar da elicitação com MeJA associada com sacarose 40g/L, ter a maior percentagem relação ao controle, este valores absoluto é muito menor do que aquele obtido na concentração de 30g/L de sacarose.

As estratégias adotadas para aumentar a liberação de compostos fenólicos pelas células têm sido o objetivo de muitas linhas de pesquisas em todo mundo, modular essas respostas com a finalidade de se aumentar grupos específicos de metabólitos farmacologicamente ativos, é uma forma encontrada para se entender os mecanismos pelos quais levam os organismos vegetais utilizarem suas vias para síntese destes compostos (DAYAKAR et al., 2008).

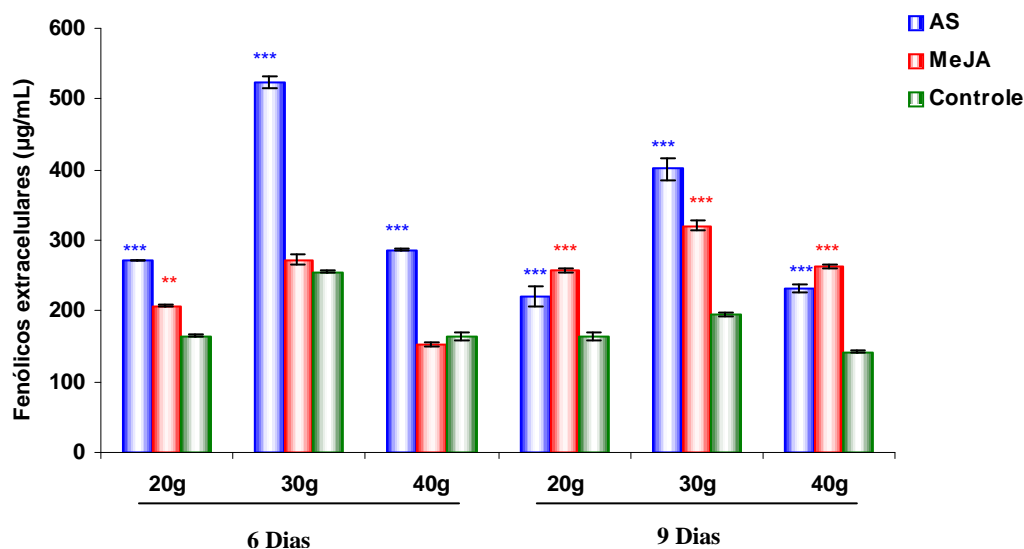


Figura 15. Avaliação do efeito da concentração de sacarose sobre a elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link, para produção de compostos fenólicos totais extracelulares com MeJA e AS na concentração de 1µmol/L. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM ANOVA seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests

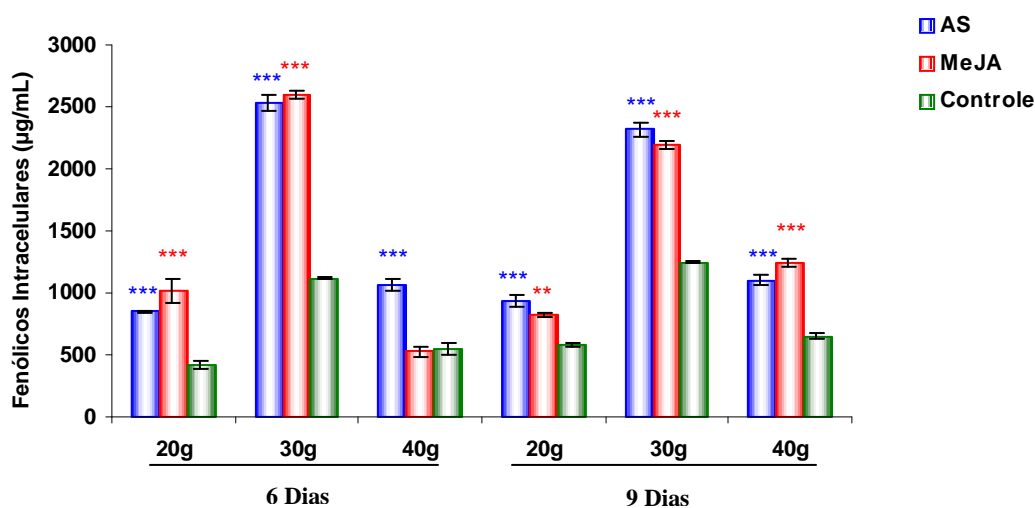


Figura 16. Avaliação do efeito da concentração de sacarose sobre a elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link, para produção de compostos fenólicos totais intracelular com MeJA e AS na concentração de 1µmol/L. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM ANOVA seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests.

No experimento realizado neste trabalho os resultados sugerem que o AS foi um modulador eficiente demonstrando ciclos de liberação destes compostos, indicando que a concentração de sacarose no meio colaborou para essa resposta. Trabalhos realizados por Anna e colaboradores (2002) demonstraram que a indução realizada com AS e MeJA, em períodos de 24 a 96 horas, apresentaram ciclos repetitivos de estimulação da produção de metabólitos secundários, o que justifica usar um período maior de tempo na elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link, com finalidade de se encontrar moléculas diferentes após um longo tempo de exposição destas células aos elicitores.

4.10 Análise do efeito da concentração de sacarose sobre as proteínas totais extra (fração S1) e intracelular (fração S2) nas células de *Bauhinia forficata* Link, elicitadas com MeJA e AS.

A Figura 17 estão os resultados da elicitação de proteínas totais extracelular com AS e MeJA, com concentrações diferentes de sacarose.

No tempo de 6 dias, concentração 20g/L de sacarose, a produção de proteínas foi de 134% para AS e de 28% para MeJA. A concentração de 30g/L teve uma produção de 24% para AS e 81% para MeJA. Na concentração de 40g/L a produção foi de 119% com AS e 37% MeJA.

No tempo 9 dias, na concentração de 20g/L, houve uma produção de 49% para AS e de 10% para MeJA. Enquanto com a concentração 30g/L, obteve-se uma produção de 41% para AS e 75% para MeJA. A concentração de 40g/L apresentou um percentual de 40% para AS e de 26% para MeJA.

As abordagens descritas, pela literatura, têm mostrado a validação de tratamentos para a indução do aumento de síntese de proteínas totais em culturas em suspensões celulares. Apesar de muitas vezes o aumento destas proteínas não estarem ligadas diretamente com o aumento de massa celular conforme experimentos efetuados por Ometto e colaboradores (2001). Eles constataram que a massa de células de *Bauhinia forficata* Link não era aumentada com várias fontes de carbono que foram dosadas no meio de cultura, mas aumentaram significativamente a síntese de proteínas totais. Nos tratamentos realizados neste experimento, nota-se que a fonte de carbono adicionada ao meio de cultura, na concentração de 30g/L, tem

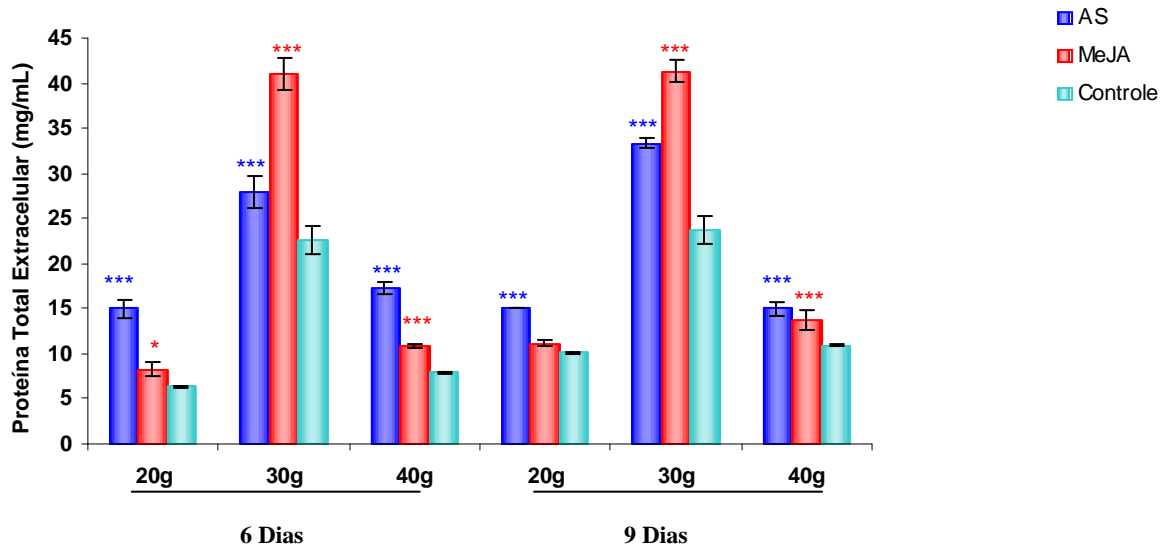


Figura 17. Avaliação do efeito da concentração de sacarose sobre a elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link com MeJA e AS na concentração de 1µmol/L, na produção de proteínas totais extracelulares, com 6 e 9 dias de exposição, *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM ANOVA seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttest

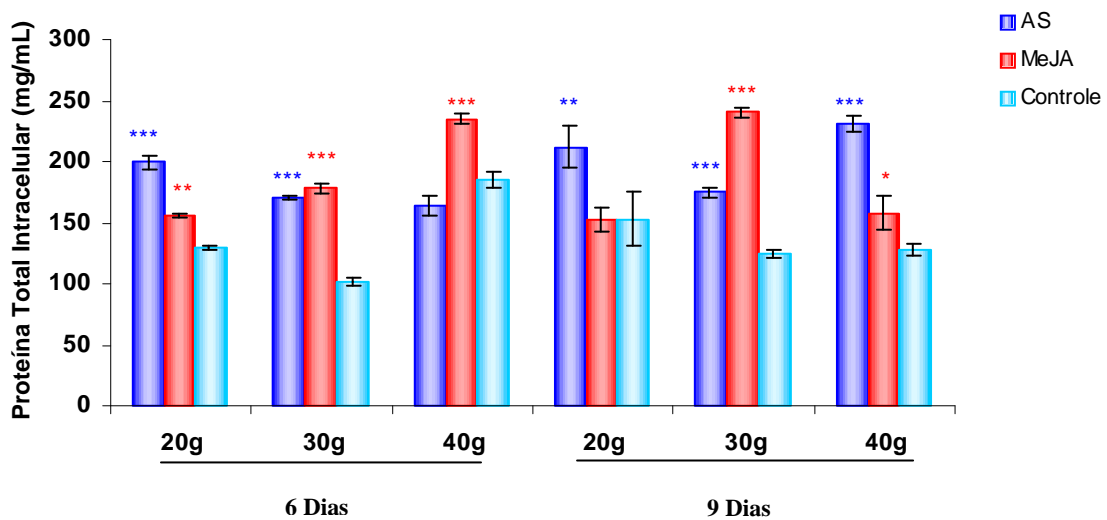


Figura 18. Avaliação do efeito da concentração de sacarose sobre a elicitação das células de *Bauhinia forficata* Link, com MeJA e As na concentração de 1µmol/L, na produção de proteínas totais intracelulares, com 6 e 9 dias de exposição, *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) nível de significância em relação ao controle, resultados submetidos ao teste Two-way RM ANOVA seguido pelo teste não paramétrico Bomferroni posttests

uma grande participação na síntese de proteínas totais, juntamente com os elicitores, principalmente o AS.

Na Figura 18, temos os resultados da síntese de proteínas totais intracelulares, estimuladas por elicitação com AS e MeJA em combinação com diferentes concentrações de sacarose.

No tempo 6 dias, com a concentração de sacarose de 20g/L, tem-se um aumento de 54% na produção de proteínas totais intracelular pelo AS e de 20% pelo MeJA. A concentração de 30g/L produziu um efeito elicitor da ordem de 68% para AS e de 75% para MeJA. Enquanto que a concentração de 40g/L foi inibitória para AS, no entanto, para MeJA essa produção aumentou em relação ao controle 27%.

O tratamento com AS por 9 dias, com sacarose 20g/L, 30g/L e 40g/L obteve-se um percentual de 39, 40 e 80% respectivamente. O MeJA foi inibitório quando associado a sacarose 20g/L. Na concentração de 30g/L e 40g/L a produção foi de 92 e 24% com MeJA em relação ao controle, respectivamente

A elicitação de células vegetais para a produção de metabólitos, sejam eles primários ou secundários, tem despertado o interesse de diversas áreas. A elicitação de proteínas relacionadas à defesa ou manutenção do metabolismo das plantas, tem uma significativa importância para a pesquisa de mecanismos que permitam compreender os meios pelos quais estas proteínas atuam. Mecanismos de rotas que são ativadas com a adição de moléculas elicitoras, que atuam muitas vezes levando o vegetal a mudar sua resposta frente ao ambiente em que este vive (KOEHLER, TIENSON, 2009; SREEDHAR et al., 2009).

4.11 Análise da atividade da enzima (FAL) Fenilalanina Amônia Liase, após elicitação com MeJA e AS em diferentes concentrações de sacarose.

A enzima FAL catalisa o primeiro passo da biossíntese de fenilpropanóides, convertendo L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico. Cabe a ela também a função de regulação entre o metabolismo primário e secundário. Devido ao seu papel na síntese desse grupo de metabólitos secundários, onde estão inseridas as moléculas de *Bauhinia forficata* Link, que na literatura é atribuído funções hipoglicemiante, resolvemos avaliar o efeito dos elicitores estudados sobre sua modulação.

A Figura 19, apresenta os resultados da atividade da FAL nas células de *Bauhinia forficata* Link, após elicitação com 1 μ mol/L dos elicitores MeJA e AS suplementado com 20,30 e 40g/L de sacarose em 6 e 9 dias. Nota-se que a maior atividade desta enzima, ocorreu quando as células foram cultivadas na presença de 30g/L de sacarose em 6 dias para os tratamentos com o elicitor AS, o qual apresentou um resultado de 52,7% de atividade da enzima FAL que seu controle. As concentrações de 20 e 40g/L de sacarose apresentaram resultados de 42,8% e 48,2% superior ao controle, enquanto a elicitação com MeJA e 20, 30 e 40g/L de sacarose foram obtidos 10,1%, -5,6% e -1,07%.e atividade em relação ao controle, respectivamente.

Para o tempo 9 dias, as células em presença de AS e MeJA 1 μ mol/L suplementados com 20, 30 e 40g/L sacarose, apresentaram uma elevação na atividade da FAL de 4,3/4,4%, 36,7/18,4% e 6,3/33,6%, respectivamente. A atividade da enzima FAL depende de suas isoformas. Em muitos organismos esta enzima tem apresentado condições ótimas de atividade diferente para cada tecido (XUE, et al., 2007). A origem do material vegetal transplantado para as condições *in vitro*, pode influenciar nos resultados da reação desta enzima (BOUDET, 2007).

A FAL pode atuar numa variação de temperatura da ordem de 4 °C -60 °C Olsen, et al. (2008). Embora as reações neste experimento com células de *Bauhinia forficata* Link, tenham sido realizados a 37°C com pH de 8,8 (ASSIS, et al., 2001). Esta enzima possui caráter constitutivo ficando compartimentalizada em diversas organelas das células, sendo necessário que fatores de ativação como aumento do nível de aminoácido *L*-fenilalanina Ferrer, et al (2008). Seja responsável pela ativação da catalise desta enzima (YINGSANGA et al., 2008).

4.12 Análise da atividade da enzima Tirosina Amônia Liase (TAL), após elicitação com MeJA e AS em diferentes concentrações de sacarose.

A enzima TAL catalisa a conversão da *L*-tirosina em ácido trans-*p*-cumárico, diminuindo um passo na biossíntese dos fenilpropanóides, portanto sendo capaz de produzir o ácido cumárico de uma maneira mais rápida. Esta relação entre a atividade FAL e TAL tem despertado o interesse de muitos autores visto que não se tem claro as bases metabólicas da escolha de um de outra via salvo pela disponibilidade de substrato (XUE et al, 2006; LOUIE et al., 2006, BOUDET, 2007)

A Figura 20 apresenta os resultados da reação da enzima TAL após elicitação com MeJA e AS 1 μ mol/L em concentrações de sacarose de 20, 30, 40g/L nos tempos 6 e 9 dias, onde o melhor resultado foi obtido com AS em presença de 30g/L em 6 dias apresentando um resultado de 200,8% a mais na atividade da enzima TAL comparado com o controle, para AS no tempo 6 dias os resultados foram inibição de 12,2% com 20 g/L e sacarose e aumento de atividade de 20,2% com 40g/L de sacarose. MeJA em 6 dias de elicitação nas concentrações de 20, 30 e 40g/L de sacarose apresentou 41,8%, 64% e 26,7% de atividade da enzima TAL em relação ao controle, respectivamente.

No tempo de 9 dias, AS e MeJA 1 μ mol/L e 20, 30 e 40g/L de sacarose aumentaram a atividade da TAL em 28,8/70,2%, 35,3/100,5% e 30,4/73,2%, quando comparados com o controle, respectivamente.

Os resultados da Figura 18 apresentam uma diferença de atividade das enzimas FAL e TAL, quando comparados com a Figura 17 como foi relatado por Whetten & Sederoff (1995). A FAL e a TAL podem em alguns casos apresentar cooperação negativa, influenciando os resultados, tanto para um aumento da atividade da FAL, e uma inatividade da TAL, como também influenciar na reação catalítica das duas enzimas.

Observa-se que em alguns tratamentos ocorreram aumentos significativos de percentual da atividade da TAL, porém quando comparamos os valores absolutos da atividade da TAL em relação a atividade da FAL, nota-se que esse resultado é muito maior para a atividade da FAL.

Rosler e colaboradores (1997), em estudos com plântulas de milho, verificaram que a atividade FAL e TAL estavam em um mesmo peptídeo, porém com regiões catalíticas distintas. Em bactérias, estas enzimas se tratam de proteínas distintas (XUE et al., 2007; LOUIE et al., 2006).

Nos fungos das espécies *P. chrysosporium*, *I. lacteus*, *T. versicolor* e *B. adusta*, a enzima TAL apresenta a temperatura e o pH ótimo é de 55°C a 60 °C e pH entre 9,0 e 10,0 (XUE et al., 2007). Esses valores para fungos estão bem distantes nos encontrados para a cultura de *Bauhinia forficata* Link, onde o pH ótimo foi de 8,5 a 8,8 e temperatura de 37°C a 40°C, isso porque as células de onde a TAL foi extraída vieram de regiões quentes e de partes da planta onde a incidência de luz é muito maior que nas demais partes de outros órgãos da planta.

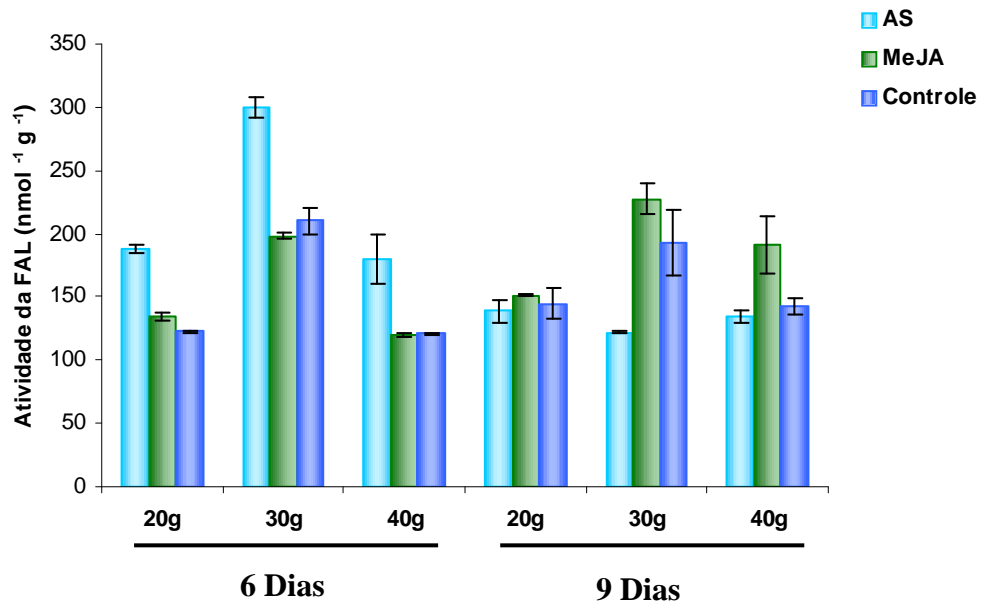


Figura 19. Atividade da enzima Fenilalanina Amônia Liase (FAL), elicitadas com MeJA e AS 1 $\mu\text{mol/l}$, em concentrações de sacarose 20,30 e 40g/L, durante 6 e 9 dias.

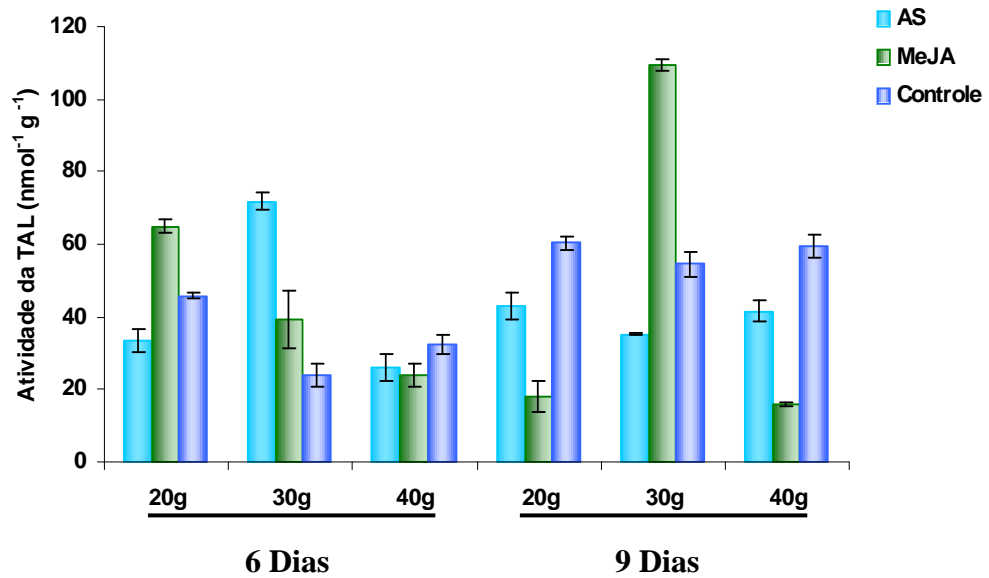


Figura 20. Atividade da enzima Tirosina Amônia Liase (TAL), elicitadas com MeJA e AS 1 $\mu\text{mol/l}$, em concentrações de sacarose 20,30 e 40g/L, durante 6 e 9 dias.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. A assepsia das sementes de *Bauhinia forficata link* foi eficiente utilizando o tratamento 2 com o antifúngico Benlax, na concentração de 2%, em combinação com hipoclorito de sódio a 0,5% e solução de álcool 70%.
2. O meio de cultura MS basal, suplementado com 30g/L de sacarose, em combinação com os reguladores de crescimento 2,4-D e Cinetina, na concentração de 1µg/L, apresentou o melhor desempenho e uma alta taxa de divisão celular.
3. O elicitor MeJA foi ativo em diferentes tratamentos, tanto o meio intra como extracelular, apresentando-se como um bom modulador de produção de compostos fenólicos, proteínas totais e açúcares redutor.
4. AS apresentou ação de elicitação nas células de *Bauhinia forficata Link*, mas não foi tão eficiente quanto o MeJA.
5. A modulação com adição de elicitores, como MeJA e AS, associados a sacarose, foram capazes de aumentar o nível de fenólicos e proteínas, nas suspensões de *Bauhinia forficata Link*, principalmente a concentração de 30g/L de sacarose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-BARRY, J. A.; ABDEL-HASSAN, I. A.; AL-HARIEM, M. H. H. Hipoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Cairo, v. 59, n. 3, p. 149-155, 1997.
- AHMED, N.; Advanced glycation end products – role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research Clinical Practice**. Limerick, v. 67, n. 2, p. 3-21, 2005.
- ANNA, S.; JANUSZ, M. W. K.; Salicylate and methyl jasmonate differentially influence diacetylene accumulation pattern in transformed roots of feverfew. **Plant science**. Smetana, v. 163, n. 1, p. 1147-1152 2002.
- ASSIS, J. S.; MALDONADO, R.; MoñOZ, T.; ESCRIBANO, M. I.; MERODIO, C.. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit, **Postharvest Biology and Technology**, Madrid, v. 23, n. 1, p. 33-39, 2001.
- ATSUSHI O.; TAKAFUMI, S.; KAZUMARI O, T. K.; JINICHIRO, K.N. S. H. N.; HISAKAZU Y. Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. **Plant Molecular Biology**, Tokyo, v. 65, n. 2, p. 177-187, 2007.
- AZEVEDO, C. R.; MACIEL, F. M.; SILVA, L. B.; FERREIRA, A.T.S.; CUNHA, M. MACHADO, O. L. T; FERNANDES, K. V. S.; OLIVEIRA, A. E. A.; XAVIER, F. Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 1435-1444, 2006.
- BEST, C. H.; SMIT, R. G.; SCOLT, D. A. An insulin-like material in various tissues the normal and diabetic animal. **American Journal Physiology**, Dakota, v. 68, n. 1, p. 161-182, 1924.
- BEUM, J. K.; DONNA, M. G.; MICHAEL L. S.; Effect of subculture and elicitation on instability of Taxol production in *Taxus* sp. Suspension cultures. **Biotechnology Program**. Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 1666-1673, 2004.
- BHAGWATH, S. G. & HJORTSO, M. A. Statistical analysis of elicitation strategies for triarubrine A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. **Journal Biotechnology**, Louisiana, v. 80, n. 2, p. 159-187, 2000.

- BONORA, E.; BONADONA, R. C.; DELPRATO S.; GULLIG, S. A.; MATSUDA M, F. R. A.; In vivo glucose metabolism in obese and without hypertension, **Diabetes**, Texas, v. 42, n. 1, p. 764-772. 1993.
- BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds, **Phytochemistry**, Tolosan, v. 68, n. 3, p. 2722-2735, 2007.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAVNA, S. CHANDRAJEET, B.; PARTHA, R. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food Chemical Toxicology**, Uttarakhand, v. 46, n. 2, p. 2376-2383, 2008.
- BRESCIANI, F.; PRIEBE, J. P.; YUNES, R.A.; DALMA, J. DELLE, M. F.; DE CAMPOS, F.; DE SOUZA, M. M.; CECHINEL, F.V. Pharmacological phytochemical evaluation of *Adiantum aneatum* growing in Brazil. **Zetschrift fur Naturforschung**, Alemanha, v. 58c, n. 3/4, p. 191-194, 2003.
- CABRAL, A. A.; PULIDO, H. G.; GARAY, B. R.; MORA, A. G. Plant regeneration of *Carica papaya* L through somatic embryogenesis in response to light quality gelling agent and phlorridzin. **Scientia Horticulturae**, Guadalajara, v. 118, n. 2, p. 155-160, 2008.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos In: TORRES, A. C. CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. A cultura de tecidos e transformação genética de plantas. BRASÍLIA, **Embrapa SP1 Embrapa CNDH**, v. 1, p. 87-132, 1998.
- CARICATI-NETO-NETO, A.; PEREIRA, O. C. M.; BASTOS-RAMOS, W. P. Effects of the aqueous and alcoholic extracts of *Bauhinia forficata* on blood glucose in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Botucatu, v. 18, n. 1 p. 726A, 1985.
- CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L. JORGE, A. P.; DE SOUZA, E.; HORST, H.; WOEHL, V. M.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti hyperglycemic potencial rulein diabetes. **Chemico-Biological Interactions**, Florianópolis, v. 163, n.3, p. 177-191, 2006.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação

- estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, Florianópolis, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- CERVONE, F.; HAHN, M. G.; DE LORENÇO, G.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interaction XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. **Plant Physiology**, Athens, v. 90, n. 3, p. 542-548, 1989.
- CHAKRABORTY, M. ANITHA K. AND ADINPUNY, M. Accumulation of phenylpropanoids derivatives in chitosan- induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. **Journal of Plant Physiology**, Kolhapur, v. 165, n. 1 p. 1-9, 2008.
- CHANG-HAI. HUANG. CHIEN-YOUNG. Methods to improve the fertility of poinsettia. **Scientia Horticulturae**, Taiwan, v. 1, n. 2, p. 3-4, 2008.
- CHATURVEDI, H. C.; JAIR, M.; KIDWAI, N. R.; Cloning of medicinal plants through tissue culture a review. **Journal experimental Biology**, Lucknow, v. 11, n. 3, p. 45-48, 2007.
- COLLIER, E. WATKINSON, A. CLELAND, C.F. ROTH, J. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. **Journal Biological Chemistry**, Meryland, v. 262, n. 2, p. 6238-6247, 1987.
- COLLIP, B. J. A new hormone present in plant tissue. **Journal of Biological Chemistry**, Edmonton, v. 1, n. 3, p. 513-543, 1923.
- COVENTRY, H. S.; DUBERY, I. A. Lipopolysaccharides from *Bulkholderia cepacia* contribute to an enhance defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, Roscoff, v. 85, n. 2, p.149-158, 2001.
- DA SILVA, K. L.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL F. V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (leguminosae) **Zeitschrift Naturforschung**, Itajaí, v. 55, n. 3, p. 478-480, 2000.
- DA SILVA, K. L.; CECHINEL, F. V. Plantas do gênero *Bauhinia* composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, Itajaí, v. 25, n. 4, p. 449-454, 2002.
- DAYAKAR, V. B.; VICTOR, M. L. V.; JIANG, D.; FRANK R. S.; COREY, D. B.; LOURDES, I. A.; JORGE, M. V.; Transcriptome analysis of Arabidopsis roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. **New Phytologist**, Yucatan, v. 179, n. 1, p.209-223, 2008.
- DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential

- of kaempferol-3,7-O- (α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves **Journal of Natural Products**, Florianópolis, v. 67, n. 3, p. 829-832, 2004.
- DE SOUZA, W. R. **Estudo do efeito elicitor do ácido salicílico e do polissacarídeo extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) em cultura de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*)**. 2005 97p. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas – Farmácia e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN. Micropropagação. [S.I]: **Academic Press**, Amsterdam, v. 1, n.5, p. 18-26, 1984.
- DI COSMO, F. & MISAWA, M. Plant Cell and tissue culture: Alternatives for Metabolites **Production, Biotechnology Advances**, Toronto, v. 3, n. 4, p. 425-453, 1995.
- DUANGJAI, S.; PREEYADA, D.; SENHA, P. Optimization of cell growth and 20-hydroxycyclopropane production in cell suspension culture, **Chinese Journal of Biotechnology**, Kaen, v. 23, n. 2, p. 1033-1036, 2007
- EILERT, U. & CONSTABEL., F. Elicitation of sanguinarine accumulation in *Piper somniferum* cells by fungal homogenates – an induction process. **Journal Plant Physiology**, Orlando, v. 125, n. 2, p. 167-172, 1986.
- FANG, S.; RYO, Y.; SATOSHI, S.; SUSUMU, H.; NORIKOZU, N.; TAKUJI, N.; KIYOSHI, Y.; MAYUMI, H.; HIROSHI, M.; SETSUKO, K. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX2) is involved in the soybean response to flooding. **Phytochemistry**, Tsukuba, v. 69, n. 5, p. 1295-1303, 2008.
- FERRER, J. L.; AUSTIN, M. B.; STEWART, C. J.; NOEL, J. P. Structure and function of enzyme involved in the biosynthesis of phenylpropanoids, **Plant Physiology and Biochemistry**, La Jolla, v. 46, n. 3, p. 356-370, 2008.
- FRANCO, L. J.; MILECH, A.; BRAGA, C. D. C.; MALERBI, D.; CAMPOS, G. P.; ALMEIDA, L.; SCHMIDT, M. I.; ALBUQUERQUE, R. H. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do Diabetes Mellitus no Brasil. **Ministério da Saúde**, Brasília, Censo de Diabetes, p. 1-32, 1998.
- FUMIHIKO S.; YASUYUKI Y.; Engineering Formation of Medicinal compounds in Cell Cultures **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, Takayama, Ikoma, v. 1, n.5, p. 311-345, 2008.

- FUNK, C.; GUGLER, K.; BRODELIUS, P. Increased secondary product formation in plant cell suspension culture after treatment with a yeast carbohydrate (elicitor). **Phytochemistry**, Zürich, v. 26, n. 3, p. 401-405, 1987.
- GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J.. A Cultura de Tecidos Em Fitopatologia. MANUAL DE FITOPATOLOGIA. SÃO PAULO, SP: EDITORA AGRONÔMICA CERES LTDA., v. 1, p. 494-506, 1995.
- GAUTHERET, R. J.; Sur la possibilité de réaliser la cultura indefine des tissus tubercules de carrota. **Comptes rendus Hebdomadaires des Séances de L'Academie dès Sciences**, New Jersey, v. 118, n.1, p. 121-220, 1939.
- GAUTHERET, R. La culture des tissus vegetaux. Son actuel comparaison avec la culture des tissus animaux. **Actualites Science**.New Jersey. v. 1, n.2, p. 23-35, 1937.
- GEISSMAN, T. A. CROUT, D.H.G. Organic Chemistry of secondary plant metabolism San Francisco, Freeman, **Cooper & Company**, San Francisco, p. 592, 1969.
- GEORG, H. PETER, D. Structural and function of glycoglycerolipid in plants. **Progress in Lipid Research**, Mühlenberg, v. 46, p. 225-243, 2007.
- GERSHENZON, J. Secondary metabolites and plant defense In: TAIZ., L.; ZEIGER, E, Plant physiology. 3^a edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2002 **Chapter** 13, p. 283-308.
- GOZZO, F. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n.3, p. 4487-4503, 2003.
- GUNJAN, P.; ASHOK, S. Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation, **Biochemical Engineering Journal**, New Delhi, v. 40, n. 5, p. 218-226, 2008.
- HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. **Math. Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien.**, v. 111, p. 69-92, 1902.
- HAGENDOORN, M. J. M.; POORTINGA, A. M.; SANG, H. W.; VAN DER PLAS, L. H.; VAN WALRAVEN, H. S. Effect of elicitor on the plasma membrane of *Pentunia hibrida* cell suspensions. **Plant Physiology**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 1261-1270, 1991.
- HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Athens, v. 34, n. 5, p. 387-412, 1996.

- HAHN, M. G.; ALBERSHEIM, P. Host-Pathogen Interaction – XIV, Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology**, Colorado, v. 62, n. 3, p. 107-111, 1978.
- HAHN, M. G.; CHEONG, J. J.; ALBA, R.; ENKERLI, J.; COTÊ, F. Oligosaccharide elicitors: structure and recognition, In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF EUROPEAN FOUNDATION FOR **PLANT PATHOLOGY**. 2., Strasbourg, 199, Proceedings, Dordrecht: Kluwer Academic, p. 99-116, 1993.
- HARTINIE, M.; AZLAN, G. J. *In vitro* germination and plantlet establishment of *Labisia pumila* (BI) F Vill **Scientia Horticulturae**, Kota Kinabalu, v. 115, n. 4, p. 91-97, 2007.
- RÖSLER, J. KREKOL, F. AMRHEIN, N. SCHMID, J. Has Tyrosine Ammonia-Lyase activity, **Plant Physiology**, Zürich, v. 113, n. 1, p. 175-179, 1997.
- HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A. & MORENO, P. R. H. (2001). Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3^a. ed. Editora Universidade/UFRGS, Porto Alegre.
- HERMANN, K.M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, West Lafayette, v. 50, n. 3, p. 473-503, 1999.
- HIROFUMI, H.; KO, K.; ATSUSHIKO S.; MASAMI, S. Auxin is required for the assembly of A-type cyclin-dependent kinase complexes in tobacco cell suspension culture. **Journal of Plant Physiology**, Ikoma, Nara, v. 164, n.3, p. 1103-1112, 2007.
- HIROKO, S. LE-SUNG, S. KENG, U. KATSUICHIRO, K. SHINSUKE, F. Adaptive mechanism of *Echinochloa crus-galli* Beauv.var. *formosensis* Ohwi under salt stress: Effect of salicylic acid on salt sensitivity. **Plant Science**, Tsukuba, v. 174, n. 5, p. 583-589, 2008.
- HOSSAIN, M. T.; SOGA, K.; WAKABAYASHI, K.; KAMISAKA, S.; FUJII, S.; YAMAMOTO, R.; HOSON, T. Modification of chemical properties of cell walls by silicon and its role in regulation of the cell wall extensibility in oat leaves. **Journal Plant Physiology**, Toyama, v. 164, n. 2, p. 385-393, 2007.
- HOUHUA, L.; HENRYK, K.; THILO, C. F.; MAGDA, V. H.; GERT, F.; DIETER, T. W. S.; THOMAS, H.; IRIS, S. Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins, and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Bords), **Planta**, Hannover, v. 226, n. 4, p. 1243-1254, 2007.

- JIAN, Y. C.; PENG, F. W.; WEI, F. K.; QUI, H. P.; JI, C. Z.; JING, M. L.; SI, B. W.; WEI, P.H.; Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. **Pastharvest Biology and Technology**, Beijing, v. 40, p. 64-72, 2006.
- JING, Q. A.; ERJUN, L.; XIANG J. R.; XIÃO Q. Y.; A novel ML protein from *Manduca sexta* may function as a key accessory protein for lipopolysaccharide signaling, **Molecular Immunology**, Kansas City, v. 45, n. 10, p. 2772-2781, 2008.
- JONG, J. C.; YANG D. C.; Methyl jasmonate as a vital substance in plants, **Trends in Genetics**, Suwon, v. 19, p. 146-149, 2003.
- JORGE, A. P.; HORST, H.; DE SOUZA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, Florianópolis, v. 149, p. 9-96, 2004.
- JULIANE, C. Ação hipoglicemiante da *unha-de-vaca*. **Revista Médica Farmacologia Química e Fisiologia**, Florianópolis, v. 2, p. 165-169, 1929.
- JULIANE, C.; Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos clínicos e experimentais. **Jornal dos Clínicos**, Florianópolis, v. 3, p. 93-112, 1941.
- JULIANE, C.; Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos clínicos e experimentais. **Revista Sudamericana de Endocrinologia, Imunologia e Quimioterapia**, Florianópolis, v. 14, n. 3, p. 326-334, 1931.
- KANAI, R. & EDWARDS, G. E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C3, C4 and Crassulacean acid metabolism plant using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 52, p. 484-490, 1973.
- KHAN, N. P.; NAG T. N.; CHANDRAJAIN S.; MOHAN S. **United States Patent**, v. 3, p. 945-988, 1976.
- KIDBY, D. K & DAVIDSON, D. J. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. **Analytical Biochemistry**, Noisy-LeGrand, v. 55, n. 1, p. 321-325, 1973.
- KOCH, W.; WAGNER, C. & SEITZ, U. Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. **Planta**, Copenhagen, v. 206, p. 523-532, 1998.
- KOEHLER, C. M. & TIENSON, H. L.; Redox regulation of protein folding in the mitochondrial intermembrane space. **Biochimica et Biophysica Acta**, Copenhagen, v. 1793, n. 1, p. 139-145, 2009.

- KOGL, F. & SMIT, A. J. Über die chemie des wuchsstoffs. Akad. Wstenschap. Amsterdam Proceedings. **Section Science**, Copenhagen, v. 34, p. 1411-1416, 1931.
- KORKINA, L. G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From Plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology** (Noisy-LeGrand, France) n. 1, v. 53, p.15-25, 2007.
- LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; KELLENBERGER, G. G.; A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation, **Journal Molecular Biology**, London, v. 47, n.1, p. 69-74, 1970.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n.5259, p. 680-685, 1970.
- LOUIE, G. V.; BOWMAN, M. E.; MOFFITT, M. C. BAIGA, T. J.; MOORE, B. S.; NOEL, J. P. Structural Determinants and Modulation of substrate specificity in Phenilalanine-Tyrosine Ammonio-Lyase. **Chemistry & Biology**, California, v. 13, n. 1, p. 1327-1338, 2006.
- MANN, J. Secondary Metabolism. **Oxford: Clarendon Press**, California, v. 3, p. 374. 1987.
- MARASCHIN, M.; SUGUI, J A.; WOOD, K V.; BONHAN, C.; BUCHI, D F.; CANTAO, M P.; CAROBREZ, S G.; ARAUJO, P S.; PEIXOTO, M L.; VERPOORTE, R.; FONTANA, J. D. Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical approach in *Mandevilla velutina* cultured cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto**, v. 35, p. 633-643, 2002.
- MELLO, M. O.; AMARAL, A. F. C.; MELO, M. Sucrose metabolizing enzymes in cell suspension cultures of *Bauhinia forficata* Link, *Curcuma zedoaria* and *Phaseolis vulgaris*, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Piracicaba, v. 36, n. 9, p. 1085-1092, 2001.
- MELLO, M. O.; DIAS, C. T. S.; AMARAL, A F. C.; MELO, M. Growth of *Bauhinia forficata* Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Phaseolus vulgaris* L. Cell Suspension cultures with carbon sources, **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n 3, p. 481-485, 2001.
- METRAUXS, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Fribourg, v. 107, n. 1, p. 13-18, 2001.
- MILLER, C. O.; SKOOG, F.; SALTZA, F. M.; Kinetin cell division factor from desoxyribonucleic acid. **Journal American Chemical society**, Fribourg, v. 77, 1392p, 1955.
- MING, C.; JING, Z.; LIMEING, X. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars, **Carbohydrate Polymers**, Paris, v. 71, p. 411-415, 2008.

- MOHAMED, E. I.; HAOUARI, J., ROSADO, A.. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: A review. **Blood Cells, Molecules, and Diaseases**. California, v. 41, p. 119-123, 2008.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physilogy Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MYUNG, M. O. H.; HAROLD, N.; TRICK, C. B.; RAJASHAKA, R. Secondary metabolisms and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. **Journal Plant Physiology**, Tokio, v. 5, p. 1-11, 2008.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERRSCHIMIDT, R. phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annul Review of Phytopatology**, Palo Alto-CA, v. 30, p. 369-389, 1992.
- OLIVEIRA, A. E. A.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; XAVIER N. J.; PEREIRA, A. C.; VIEIRA, J. G. H.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER, F. J. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. **Protein and Peptide Letters**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p. 15-21, 1999.
- OLIVEIRA, A.E.A.; MACHADO, O.L.T.; GOMES, V.M.; XAVIER NETO, J.; PEREIRA, A.C.; VIEIRA, J.G.H.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. **Protein and Peptide Letters**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p. 15-21, 1999
- OLIVEIRA, C.; FELIX, W.; MOREIRA, R. A.; TEXEIRA, R. A.; DOMINGUES, L.; D. Expression of frutalin na α -D-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, Rio de Janeiro, v. 60, p. 188-193, 2008.
- OLSEN, K.M.; LEA, U. S.; SLIMESTAD, R.; VERHEUL, M.; LILLO, C. Differentialexpression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis, **Journal of Plant Physiology**, Madrid Spain, v. 165, p. 1491-1499, 2008.
- PANIZZA, S. Plantas que curam (Cheiro de mato). 15^a ed. **IBRASA**, São Paulo, 279 pp, 1997.
- PAOLO, R.; MARISOL, L. B.; PAOLO, P.; NICOLINA, T. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotyps [*Citrus sinensis* (L) osbech]. **Postharvest Biology and Technology**. India, v. 49 p. 348-354, 2008.
- PEPATO, M. T.; BAVIERA A. M.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-

- induced diabetic rats. **BMC Complementary and alternative medicine**, Florianópolis, v. 4, p. 1-7, 2004
- PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L.; Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Florianópolis, v. 81, p. 191-197, 2006.
- PINHEIRO, T. S.; JOHANSSON, L. A.; PIZZOLATTI, M. G.; BIAVETTI, M. W. Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Journal Pharmacology Biomedicine Analysis**. Florianópolis, v. 41, p. 431-436, 2006.
- PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Química Nova**, Florianópolis, v. 26, p. 466-469, 2003.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1977, 289 pp.
- PULOK, K.; MUKHERJE, E.; KUNTAL, M.; KAKALI, M.; PETER, J.; HOUGHL, N. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potential. **Journal Ethnopharmacology**, India, v. 106, p. 1-28, 2006.
- RADIN, N. S. Preparation of lipids extracts **Methods in Enzymology**, Cairo, v.14, n. 1, p. 245-254, 1969.
- RATES, S. M. K. Plants or source of drugs. **Toxicon**, Florida, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RICCI, P.; PANABIERES, F.; BONNET, P.; MAIA, N.; PONCHET, M.; DEVERGNE, J. C.; MARAIS, A.; CARDIN, L.; MILAT, M. L.; BLEIN, J. P.; Proteinaceous elicitors of plant defense responses. Oligosaccharide elicitors: Structure and recognition. In: **PATHOLOGY**. 2., Strasbourg, 1993. Proceedings, Dordrecht: Kluwer Academic, p. 121-135, 1993.
- ROBERT, E.; MINTO, B.; BLACKLOCK, J. Biosynthesis and function of polyactylins and allicol natural products. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 233-306, 2008.
- RODRIGUES, A. C.; GOLDBAUM, T.; NERY, M. Diabetes Mellitus tipo 1 In: BENSENOR I. M. et al., Medicina em Ambulatório-diagnóstico e tratamento Editora **Sarvier**, 1^a Edição, São Paulo, p. 401.
- RORY, F.; DEGNHARDT, P. & BONHARN, S. transcript profiling demonstrates absence of loss of a single RPL2a paralog. **Planta**, Zürich, v. 15, p. 12-16, 2008.

RÖSLER, J. KREKEL, F. AMRHEIN, N. SCHMID, J. Maize Phenylalanine Ammonia-Lyase has Tyrosine Ammonia-Lyase activity, **Plant Physiology**, Zürich, v. 113, n. 1, p. 175-179, 1997.

RUSSO, E. M. K.; REICHEL, A. A. J.; DE-SÁ, J. R.; FURLANETTO, R. P.; MOISÉS, R.C. S.; KASAMATSU, T. S.; CHACRA, A R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Florianópolis, v. 23, p. 11-20, 1990.

SAUNDERS, J. A.; MCCLURE, J. W. Phytochrome controlled phenilalanine ammonia lyase activity in *Hordeum vulgare* plastids, **Phytochemistry**, Miami, v. 14 p. 1285-1289, 1975.

SCHAFFRATH, U.; SCHEINPFLUG, H.; REISSENER, H. J. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. **Physiology Molecular Plant Pathology**, Florida, v. 46, p. 293-307, 1995..

SCHOCH, G.; NICOV, G. N.; ALWORTH, W. L.; WERCK-REICHHART, D. Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid elicited cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, p. 1022-1031, 2002.

SEJALON-DELMAS, N.; MATEOS, F. V.; BOTTIN, A.; RICKAUER, M.; DARGENT, R.; ESQERRÉ-TUGAYÉ, M. T. Purification, elicitor activity, and cell wall localization of a glycoprotein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, a fungal Pathogen of tobacco. **Phytopathology**, Paris, v. 87, n. 9, p. 899-909, 1997.

SILVA, F. R. M. B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M. G.; WILLRICH, M. A. V.; DE SOUSA E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Florianópolis, v. 83, p. 33-37, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 3ª edição Ed. Universidade / UFRGS/Ed. UFSC, 2001.

SOUZA, W. R. **Estudo do efeito elicitor do ácido salicílico e do polissacarídeo extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) em cultura de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*)**. 2005, 97 pp. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas- Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

- SREEDHAR, R. V.; ROOHIE, P.; MAYA L.; VENKATACHALAM L.; BHAGYALAKSHMI N. Biotic elicitors enhance flavour compounds during accelerated curing of vallina beans. **Food Chemistry**, New york, v. 122, n. 2, p. 461-468, 2009.
- SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential regulation of phenylalanine ammonia lyase activity and protein level by light in tomato seedlings, **Plant Physiology and Biochemistry**, Tokyo, v. 46, p. 444-451, 2008.
- TANI, M., FUKUI, H., SHIMOMURA, M., TABATA, Structure of endogenous oligogalacturonides inducing shikonin biosynthesis in *Lithospermum* cell cultures **phytochemistry**, Zürich, p. 2719-2723, 1992.
- THAI, A; EISENBARTH, S. The natural history of IDDM. **Diabetes Reviews**, New York, v. 1, p. 1-14, 1993.
- TITANJI, V. P.; WAGWA, A. A. NGEMENYA, M. Applications Biotechnology techniques to the study of medicinal plants. **African Journal Medical Science**, v. 9, p. 23-36, 2007.
- TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. J.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANE, E. Glossário de Biotecnologia Vegetal. BRASILIA: **Embrapa Hortaliças**, p. 128, 2000.
- TOWBIN, H; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. U.S.A. v. 76, n. 9, p. 4350-4354.
- TRACY, T.; LILLING, Z.; TODD, A.; JESSICA, Y.; MLADEN, V.; ALLEN, V. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic β -cells. **Febs Letters**, Florida, v. 582, p. 1375-1380, 2008.
- TROMPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**. Canada, n. 2, v. 37, p. 80-169, 2007.
- UMEMOTO, N.; KAKITANI, IWAMATSU, A.; YOSHIKAWA M.; YAMAOKA, N.; ISHIDA, I. The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein, **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Tokyo, v. 94, p. 1029-1034, 1997.
- VARGAS-RECHIA, C., REICHER F., SIERAKOWSKI, M. R., HEYRAUD A., DRIGUEZ, H. & LIENART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea*

- courbaril* acts as a signaling molecule. **Plant Physiology**, Grenoble, v. 116, p. 1013-1021, 1998.
- VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**. Tokyo, Maruzen, v. 5, p. 101-103, 1982.
- VENÂNCIO T. M., AZEVEDO, C. R., OLIVEIRA, A. E. A., MACHADO, O. L. T., CUNHA, M. D. GOMES, V. S. XAVIER, J.F. Presença de insulina durante o desenvolvimento de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L], em sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. e folhas de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link, mororó). 51 **Congresso Nacional de Botânica, Brasília. Resumos**, p. 14, 2000.
- VENÂNCIO T. M.; AZEVEDO, C. R.; OLIVEIRA, A. E. A.; MACHADO, O. L. T.; CUNHA, M. D.; GOMES, V. S.; FILH, X.; J. Presença de insulina durante o desenvolvimento de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], em sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. e folhas de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link, mororó). **51 Congresso Nacional de Botânica, Brasília. Resumos**, p. 14, 2000.
- VENÂNCIO, T. M.; OLIVEIRA, A. M. A.; SILVA, L. B.; MACHADO, O. L. T.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER, J. F. A protein with amino acid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna unguiculata* (cowpea). **Brazilian Journal of medical and Biological Research**. Rio de Janeiro, v. 36. p. 1167-1173, 2003.
- VICKERY, M. L.; VICKERY, B. Secondary plant metabolism. **London: McMillian**, v. 2, p. 1-2, 1981.
- WINK, M. Physiology of Secondary Product Formation in Plants. In: Secondary Products from Plant Tissue Culture, ed. Charlwood, B. V. & Rhodes, M.J.C., **Clarendon Press, Oxford**. p. 23, 1990.
- XUE, Z.; MCCLUSKEY.; M. CANTERA.; K. BASSAT, A.B.; SARIASLANI, F. S.; HUANG, L. improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme, **Enzyme and Microbial Technology**, India, v. 42, p. 58-64, 2007.
- YEH, G. T.; EISENBERG, D. M.; KAPTCHUK, T. J.; PHILLIPS, R. S.; Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. **Diabetes Care**, New York, v. 26, p. 1277-1294, 2003.
- YINGSANGA, P.; SRILAONG, V.; KANLAYANRAT, S.; NOICHINDA, S.; MCGLASSON, W. B. Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and

POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs, Rongrien and see-chompoo, **Postharvest Biology and Technology**, Zürich, postc-8876.

YUE-ZHONG, S. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, Madrid, v. 61, p. 10, 2008.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine decarboxylase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Rockeville, v. 40, p. 779-784, 1965.

WHETTEN, R. & SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, North Carolina, v. 7, 100-113, 1995.

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