

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**USOS E APLICAÇÕES DA CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM  
SUSPENSÃO DE LARANJEIRA-PERA (*Citrus sinensis*)**

AUTORA: ELISÂNGELA FUMAGALI

Projeto de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - área de Fitoquímica e Biotecnologia - área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá.

MARINGÁ-2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**USOS E APLICAÇÕES DA CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM  
SUSPENSÃO DE LARANJEIRA-PERA (*Citrus sinensis*)**

Autora: ELISÂNGELA FUMAGALI

Orientador: Arildo Braz de Oliveira

Co- Orientadora: Regina Correia Gonçalves

Projeto de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - área de Fitoquímica e Biotecnologia, área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá.

MARINGÁ-2009

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3. MATERIAIS MÉTODOS</b> .....	13
3.1. Material vegetal e cultura de células .....	13
3.2. Adição de elicitores .....	13
3.3. Extração e análise dos limonóides .....	14
3.4. Preparação de padrões .....	14
3.5. Extração, isolamento e caracterização dos polissacarídeos .....	15
3.5.1. Fracionamento dos polissacarídeos .....	15
3.5.2. Caracterização dos polissacarídeos .....	16
3.5.3. Determinação dos carboidratos totais.....	16
3.5.4. Composição monossacarídica dos polissacarídeos.....	16
3.5.5. Determinação da homogeneidade e peso molecular dos polissacarídeos.....	17
3.5.6. Análise dos polissacarídeos para determinação da posição das ligações glicosídicas.	17
3.5.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	17
3.5.8. Reações de biotransformação empregando cultura de células de <b>C.sinensis</b> .....	18
<b>4. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO</b> .....	19
<b>5. RESULTADOS ESPERADOS</b> .....	20

<b>6. INFRAESTRUTURA EXISTENTE PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS</b>	
<b>7. EQUIPE EXECUTORA E LOCAL DE REALIZAÇÃO DE EXPERIMENTO .....</b>	<b>21</b>
<b>8. ORÇAMENTO .....</b>	<b>22</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>24</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA (1) - Estrutura da Limonina .....	8
FIGURA (2) - Estrutura do Valenceno .....	12

# USOS E APLICAÇÕES DA CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE LARANJEIRA-PERA (*Citrus sinensis*)

Elisângela Fumagali (Doutoranda/Uem), Talita Perez Cantuaria Chierrito (PIBIC/Fundação Araucária /Uem), Regina Aparecida Correia Gonçalves (Co-orientadora), Arildo José Braz de Oliveira (Orientador), @-mail: [arildooliveira@yahoo.com.br](mailto:arildooliveira@yahoo.com.br).

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde - Maringá-PR

**Resumo:** A cultura de células em suspensão de laranja-pera (*Citrus sinensis*) já demonstrou a capacidade de produção de limonóides, mas em concentrações ainda inferiores ao desejado, deste modo o presente trabalho visa induzir o aumento na produção dos mesmos, por intermédio da adição de elicitores no meio de cultura, tais como os polissacarídeos de *Cereus peruvianus*, polissacarídeos de *Stevia rebaudiana*, polissacarídeos de *Klebsiella oxytoca*, pectina e extrato de levedura.

**Palavras-chaves:** *Citrus sinensis*, células em suspensão, elicitores, limonóides.

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da produção de compostos químicos de interesse, com menores investimentos de tempo e capital aplicados, é o grande objetivo da biotecnologia. Quando comparado às moléculas principais encontradas nas plantas, os compostos secundários são geralmente produzidos em baixa concentração. Por isso, diferentes estratégias, incluindo

sistemas de cultura *in-vitro*, tem sido estudadas extensivamente para aumentar a produção dos compostos secundários pelas plantas (KUTNEY, 1996; BOUGARD et al, 2001 e SATO et al, 2001). As culturas de células *in-vitro* são uma das alternativas, porque os metabólitos secundários de interesse são obtidos sob um ambiente controlado, não obstante das mudanças das condições climáticas e do solo (COLLIN, 2001). As plantas cultivadas ou em seus habitats naturais geralmente apresentam concentrações variadas dos compostos em questão, que podem depender da época específica da colheita da planta (SALMORE and HUNTER, 2001; PURICELLI et al, 2002 e RALPHS and GARDNER, 2001). Além disso, sua exploração pode causar a erosão genética gradual.

Derivados triterpênicos são produzidos em alta concentração e curtos períodos de tempo, em cultura de células em suspensão pelas mudanças nas condições nutricionais e elicitoras (KAMISACO et al. 1984, KUTNEY et al. 1993). A adição de elicitores pode ter sucesso devido à função dos triterpenos como defesa química contra patógenos e herbívoros. Extrato de levedura e oligogalacturonídeo tem induzido a produção de metabólitos secundários (FLORES-SANCHEZ et al. 2002, YOON et al. 2000).

Os “Citros” são cultivados no mundo todo. Existem basicamente quatro espécies comerciais especiais de Citros, dentre elas destaca-se o *Citrus sinensis* (laranjas doces). Uma grande variedade de metabólitos secundários são encontrados em espécies do gênero *Citrus*, os principais são os flavonóides e os limonóides. Os limonóides demonstraram propriedades em inibir a formação de tumores quimicamente induzidos na boca, estômago, intestino delgado, cólon, pulmão e pele de animais experimentais (BERHOW et al., 2000), além de atividade antimalárica (ASHRAF et al., 2002).

A limonina (**1**) é uma dilactona triterpenóide intensamente amarga, e é encontrada distribuída em todo o gênero. A presença da limonina (**1**) nos sucos de laranja gera um

grande problema econômico para a indústria, devido seu sabor amargo (SHIN HASEGAWA et al., 1984)

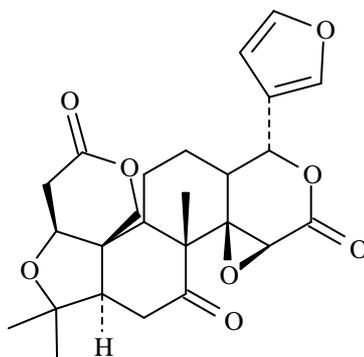


Figura (1) - Estrutura da limonina

A cultura de calos e células em suspensão vem sendo utilizada, visando o estudo da biossíntese de metabólitos secundários economicamente importantes (inviáveis de se sintetizar em laboratório), possibilitando ainda a propagação de linhagens celulares que possuam capacidades biossintéticas alteradas.

Quando células vegetais são submetidas a estresses ambientais, há um aumento transiente da produção de alguns metabólitos secundários específicos para cada espécie vegetal. Exemplos disto são a produção de vindolina em plântulas de *Catharanthus roseus* (AERTS e DE LUCA, 1992), isoprenóides em folhas de *Pueraria Lobata* (SHARKEY e SINGSAAS, 1995) e do derivado glicosilado de cianidina 3- dimalonil em mesocótilos estiolados de *Sorghum bicolor* (LO e NICHOLSON, 1998). Este fenômeno é denominado elicitação, sendo que dois tipos principais de agentes elicitores conhecidos: bióticos e abióticos (TOWERS e ELLIS, 1993). Os elicitores de natureza biótica são compostos capazes de induzir respostas de defesa de células vegetais contra infecções, em particular a síntese de novo de fitoalexinas, ou a liberação de fitoantocianinas.

A elicitação de um cultivo celular induz à síntese de novo de compostos do metabolismo secundário, alguns dos quais não encontrados na planta intacta, como as dihidro-piranocumarinas isoladas a partir de culturas de células de salsa (TIETJEN et al., 1983). Além disto, a elicitação pode determinar aumentos de produção de compostos presentes nos cultivos celulares, como observado para as antraquinonas em suspensões celulares de *Cinchona* (WINJNSMA, 1985).

A eficácia do tratamento com um elicitor depende de uma série de fatores e de que a resposta de indução é restrita a determinadas vias biossintéticas. A escolha correta do agente de elicitação é de fundamental importância, não havendo regras que possam indicar qual a melhor combinação elicitor/cultura celular que deverá ser utilizada. Além disso a concentração do elicitor, a densidade celular, a idade das culturas, o momento de adição do elicitor ao cultivo, o período de contato entre as células e o elicitor e as condições nutricionais do meio de cultura são fatores que precisam ser considerados.

A elicitação de culturas celulares de *Cicer arietinum* com baixas doses de polissacarídeos (5-10 mg/ 40 mL de meio de cultura) determinou o acúmulo majoritário de conjugados da fitoalexina pterocarpano em vacúolos, enquanto altas doses deste elicitor (30-80 mg) prontamente induziram aumentos da fração aglicona (BARZ e MACKENBROCK, 1994).

Os compostos com ação elicitora envolvem enzimas (celulares, hemicelulares e pectinases, e.g) que determinam a formação de fragmentos de parede celular, os quais atuam como elicitores, peptídeos - elicítina e criptogéina (KELLER et al., 1996; VIARD et al., 1994; SEO et al., 1999), oligossacarídeos – oligossacarinas (FRY et al., 1993), glicopeptídeos, lipídios ou derivados de ácidos graxos. Muitos destes compostos são produtos de degradação de parede celular de microorganismos ou plantas (BLECHERT et al., 1995; NISHIUCHI e IBA, 1998).

Elicitores de natureza abiótica cita-se a radiação ultravioleta, baixas ou altas temperaturas, pH, reguladores de crescimento (NISHIUCHI e IBA, 1998), ácido 12- oxo-fitodienólico (PARCHMANM et al., 1997), ou íons de metais tóxicos: Al, Cd, Ga, In e La (SNOWDEN et al.,1995).

Diversas respostas bioquímicas parecem estar envolvidas na elicitação de células, incluindo o efluxo de eletrólitos através da ativação de um sistema de troca de íons  $K^+/H^+$  a nível de membrana plasmática, alteração do potencial de membrana e ativação do sistema de oxi-redução da membrana plasmática, gerando espécies reativas de oxigênio (VERPOORTE e MARASCHIN, 2001).

A elicitação de culturas de células vegetais apresenta como vantagem a possibilidade de indução do aumento da produtividade dos cultivos em momento específico do processo produtivo.

A produção metabólitos primários como proteínas, ácidos graxos e polissacarídeos á partir da cultura de calos e células em suspensão também é possível. A produção de polissacarídeos em cultura de tecidos de calos, por exemplo, tem sido verificada nas espécies *Melittis melissophyllum* (SKRZYPEZAK-PIETRASZEK e HENSEL, 2000) e *Silene vulgaris* (GUNTER e OVODOV, 2002). As culturas de calos de ambas as espécies produzem os mesmos tipos e quantidades de polissacarídeos que são produzidos pelas plantas cultivadas na natureza.

Em geral, a produção de diferentes compostos nas plantas é mediada por fatores ambientais, variando com o estado fisiológico e com variações sazonais (SALMORE e HUNTER, 2001; RALPHS e GARDNER, 2001). Assim, se por um lado a cultura de células garante as condições controladas contornando as variações ambientais, por outro lado permite direcionar de forma controlada a síntese destes compostos. Níveis aumentados de polissacarídeos, quando comparados com os produzidos pelas plantas doadoras, foram

obtidos com a adição de diferentes fontes de carbono no meio de cultivo de calos de *S. vulgaris* (GUNTER e OVODOV, 2002). Os polissacarídeos produzidos por plantas e calos da referida espécie apresentaram princípios imunoativos (POPOV et al., 1999). A adição de reguladores de crescimento, tais como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na cultura de calos de *Polianthes tuberosa*, também induziu a produção aumentada de cada uma das frações que compõe os polissacarídeos nesta espécie (HONDA et al., 1996).

Nos últimos anos cultura de células de plantas também vem sendo utilizada nas transformações de importantes classes de compostos tais como os fenilpropanóides, terpenóides e alcalóides (FRANSSEN e WALTON, 1999). Muitas vezes estas biotransformações fornecem substâncias com atividades biológicas importantes e que normalmente não estão presentes na natureza (SUGA e HIROTA, 1990). As enzimas presentes nas culturas destas células são capazes de catalisar reações estereo e regioseletivamente, bem como resolver misturas racêmicas ou transformar compostos pró-quirais, de maneira similar às enzimas de microorganismos, com vantagens sobre as sínteses químicas.

Diversas reações de biotransformação por cultura de células de plantas foram descritas nos últimos anos (GIRI et al., 2001) como, por exemplo: hidroxilações, glicosilações, oxido-reduções de álcoois e cetonas, epoxidação, reduções de duplas ligações, reduções de nitrocompostos. A cultura de células em suspensão de *Citrus* foram anteriormente empregadas em reações de hidroxilação e oxidação do valenceno (2) (DRAWERT et al., 1984), além deste aspecto já está bem descrito na literatura a capacidade apresentada por células de *Citrus* na realização da glicolização de flavonóides aglicônicos via glicosiltransferases (FRYDMAN et al., 2004) e também como uma fonte conhecida de lipases e outras hidrolases (BUGG et al., 1997), o que as tornam uma excelente fonte de enzimas, abrindo a possibilidade que possamos empregá-las como um catalisador biológico.

O sistema é mais efetivo quando:

As reações de biotransformação são únicas para cada planta.

Ex: Transformação do valenceno em cultura de *Citrus*:

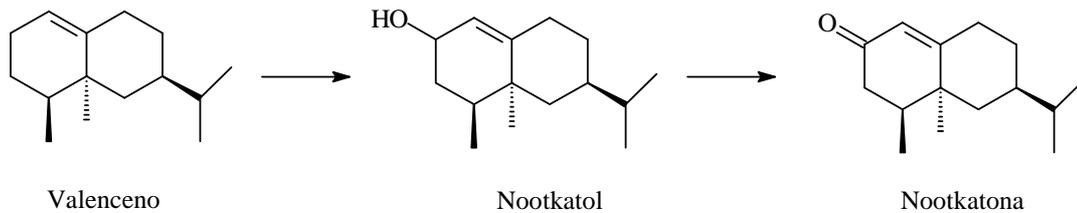


Figura (2) - Estrutura valenceno

## 2. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da adição de elicitores (polissacarídeos, extrato de levedura e ácido jasmônico) ao meio de cultura usado para cultivo de células em suspensão de *Citrus sinensis* sobre a biossíntese e produção de limonóides aglicônicos.

- Verificar capacidade de produção de polissacarídeos em cultura de calos e células em suspensão de *C. sinensis*.

- Isolar e caracterizar os polissacarídeos em cultura de células em suspensão de *C. sinensis*.

- Avaliar e verificar a capacidade das células em suspensão de *C. sinensis* de realizar reações de hidrólise e glicolização de substratos exógenos.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### **3.1. Material vegetal e cultura de células**

As sementes laranjeira-pera (*Citrus sinensis*) adquiridas junto ao comércio local serão esterilizadas em soluções de hipoclorito 0,5% por 15 min, *Folicur* 0,1% por 15 min e em seguida lavadas em água destilada estéril, serão inoculadas em meio de cultura Murashige e Skoog (MS, 1962) e cultivados à 28°C na ausência de luz. Após as sementes estéreis serão utilizados como explantes e transferidos para o meio MS suplementado com 30 g sacarose, 0,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1,5 mg/L de cinetina (CIN) e ágar (0,8%) e depois incubados à 28°C na ausência de luz para indução e formação dos calos, que após a terceira geração de subcultivo serão submetidos ao doseamento dos limonóides totais e o estudo do perfil de crescimento em líquido (células em suspensão).

### **3.2. Adição de elicitores**

Um total de 0,6 gramas de calos de laranja irão ser colocados em 50 ml de meio líquido MS acrescidos dos fitorreguladores 2,4-D e CIN nas mesmas concentrações utilizadas para a indução dos calos, adicionar-se-ão inicialmente ao meio 2 mL de uma solução a 2% (p/v) dos polissacarídeos (ROMERO et al., 2005) utilizados como elicitores: Pectina, polissacarídeos de *Cereus peruvianus*, polissacarídeos de *Klebsiella oxytoca*, polissacarídeos de *Stevia rebaudiana*, e outros elicitores, como extrato de levedura e ácido jasmônico. Após o pH será ajustado para 5,8, serão autoclavados por 15 min a 121°C e depois cultivados à 28°C em agitador orbital (120 rpm), na ausência de luz por um intervalo de 4 semanas. As células em suspensão irão ser retiradas após esse período, filtradas e pesadas (peso fresco), congeladas para posterior liofilização e verificação de peso seco.

### **3.3. Extração e análise dos limonóides**

Após a liofilização as células irão ser submetidas à extração em acetona sob refluxo durante 4 horas, o extrato será filtrado, evaporado e estocado a - 20° C para posterior análise. Os limonóides serão analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em um cromatógrafo líquido Shimadzu 10 AVP empregando-se uma coluna Zorbax SB-C18 e detecção no ultravioleta a 210 nm.

O sistema eluente empregado consistirá de um sistema ternário eluído isocaticamente com 49% H<sub>2</sub>O, 41% MeOH, and 10% CH<sub>3</sub>CN com um fluxo de 1 mL/min (SOLEMAIN et al., 2005). As amostras e o padrões serão dissolvidos em MeOH 50% antes da injeção. Todas as amostras serão filtradas em uma membrana Millipore de 0,45 µm e injetadas com um 50 µL.

### **3.4. Preparação de padrões**

Como os padrões de limonóides não são disponíveis comercialmente eles serão isolados, identificados a partir de sementes de *Citrus sinensis*. O isolamento dos limonóides será feito a partir da extração de sementes de laranjeira-pêra (~200 g), as quais irão ser secas, trituradas (turbólise) e a seguir extraídas sob refluxo em hexano (para eliminação de óleos), depois serão submetidas à extração em refluxo com acetona (limonóides agliconas) e por último uma extração sob refluxo com metanol (limonóides glicosídeos). O extrato acetônico será evaporado e depois submetida à cromatografia em camada delgada (CCD) e depois à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), empregando como fase móvel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: acetona (90:10,v:v) e fase estacionária a silicagel G60, com o objetivo de se isolar os limonóides aglicônicos, que terão suas estruturas determinadas por espectroscopia de

ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), infravermelho e espectrometria de massas.

Soluções padrões serão preparadas dissolvendo 5 mg de cada composto em 5 ml de acetonitrila ou acetonitrila:água (1;1 v/v). As soluções irão ser diluídas em seis concentrações diferentes: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg/mL de acetonitrila.

### **3.5. Extração, isolamento e caracterização dos polissacarídeos**

As células serão liofilizadas e a seguir trituradas e depois submetidas a extração sob refluxo com acetona para retirada de pigmentos, gorduras e outros interferentes e serão extraídas sob refluxo com água destilada fervente, as soluções aquosa quente, resultante da filtração à vácuo será precipitada com 2-3 volumes de etanol. O material será repurificado quantas vezes for necessário.

#### **3.5.1. Fracionamento dos polissacarídeos**

Os extratos ricos em polissacarídeos serão dissolvidos em tampão Tris-HCl a 0.1 M (pH 7,0), e depois aplicados e fracionados em coluna de Sephacryl S-300 HR ou Sephacryl S-200 (Pharmacia-LKB), empregando o mesmo tampão. As diferentes frações obtidas serão reunidas, dialisadas, concentradas e liofilizadas. Cada fração obtida será dissolvida em água e depois aplicada em colunas de troca iônica ou Sephadex G-25 (1.5 x 50 cm). Os eluatos obtidos a partir de cada fração serão concentrados e liofilizados.

#### **3.5.2. Caracterização dos polissacarídeos**

Os polissacarídeos serão caracterizados pela determinação do teor de carboidratos totais e a determinação da composição monossacarídea.

### **3.5.3. Determinação dos carboidratos totais**

O teor de carboidratos totais dos polissacarídeos serão estimados por medida colorimétrica, utilizando a reação com fenol (5% p/v em água) e ácido sulfúrico concentrado. As medidas de absorvância serão realizadas em 450 nm e 490 nm (CHAPLIN, 1994).

### **3.5.4. Composição monossacarídica dos polissacarídeos**

A composição monossacarídica dos polissacarídeos obtidos após o fracionamento e suas porcentagens relativas serão determinadas após a sua hidrólise total com uma solução de ácido trifluoroacético 2M (TFA) por 8 h a 100 °C, seguida de sua conversão metil em acetato de alditóis por redução com NaBH<sub>4</sub>, metilação com MeOH/HCl e acetilação com Ac<sub>2</sub>O-piridina sucessivamente (SASSAKI et al.2008).

### **3.5.5. Determinação da homogeneidade e peso molecular dos polissacarídeos**

A homogeneidade e o peso molecular (*PM*) dos polissacarídeos obtidos após o fracionamento serão determinados por cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC), empregando um sistema de multidetecção por refractometria

diferencial (Waters) e um aparato de espalhamento a laser multiangular (MALLS; Dawn DSP-F, Wyatt Technology) adaptados em fluxo.

### **3.5.6. Análise dos polissacarídeos para determinação da posição das ligações glicosídicas**

As amostras de polissacarídeos serão parcialmente *O*-metilada com NaOH–Me<sub>2</sub>SO–MeI (CIUCANU et al., 1984). Os polissacarídeos per-*O*-metilados serão convertidos em acetatos de polissacarídeos *O*-metilados por tratamentos sucessivos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% por uma hora em banho-de-gelo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8% por 16 h a 100 °C, redução com NaBD<sub>4</sub> e acetilação com Ac<sub>2</sub>O–piridina. Os produtos serão analisados por cromatografia a gás capilar acoplada a espectrometria de massas (GC–MS) e identificados por seu modelo típico de fragmentação e tempos de retenção (SASSAKI et al., 2005), este procedimento será realizado com o objetivo de se determinar como estão ligados os resíduos de açúcares presentes nas ramificações da cadeia principal. Alguns outros procedimentos visando esclarecer a posição das ligações glicosídicas como a oxidação por periodato, acetólise, hidrólises ácidas diversas, hidrólise enzimática e reações de degradação (CHAPLIN, 1994).

### **3.5.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN) serão realizadas em um espectrômetro Varian modelo Mercury Plus 300,00 MHz com Transformada de Fourier. As análises serão realizadas a 50 °C, as amostras solúveis em água serão dissolvidas em D<sub>2</sub>O e as insolúveis em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>. As análises por RMN bidimensional homonuclear e hetero nuclear (COSY, HMBC, HSQC, HSQC-DEPT, NOESY, TOCSY)





D) Manutenção da cultura de calos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E) Manutenção de cultura de células em suspensão	X	X	X	X	X	X	X					
F) Extração e isolamento de polissacarídeos obtidos de culturas de calos e células em suspensão.	X	X	X	X	X	X	X	X				
G) Caracterização dos polissacarídeos	X	X	X	X	X	X	X					
H) Identificação dos polissacarídeos	X	X	X	X	X	X	X	X				
I) Avaliação do potencial de uso das células em suspensão de <i>C. sinensis</i> em reações de biotransformação				X	X	X	X	X	X	X	X	X
J) Divulgação de resultados preliminares em congressos							X	X				
L) Elaboração de artigo científico									X	X	X	X
M) Redação							X	X	X	X	X	
N) Defesa da Tese												X

## 5. RESULTADOS ESPERADOS

Uso e aplicações dos polissacarídeos em aplicações farmacêuticas (farmacotécnica, farmacologia), uso das células como biocatalisadores em reações de químicas, estudo visando estimular e aumentar a produção dos limonóides de *Citrus*, pois os mesmos apresentam um grande potencial como aditivos alimentares e atuam na prevenção do câncer e diminuição dos níveis de colesterol sérico e também podem ser usados como produto de partida para obtenção de antimaláricos uma vez que apresentam uma ação antimalárica moderada.

## 6. INFRAESTRUTURA EXISTENTE PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Para que se tenha um trabalho com qualidade, é necessária uma infra-estrutura adequada, com equipamentos como: autoclave, pHgâmetro, capela de fluxo laminar, câmara para controle de luminosidade e temperatura, agitador orbital 120 (rpm), freezer, liofilizador, estufa de secagem, balança de pesagem, infravermelho, bastão de vidro, pinças, estiletes, azulejos, funil de vidro, frascos de vidro, gral de porcelana, pipeta volumétrica, vidro relógio, liquidificador, coluna cromatográfica, materiais como: papel de filtro, papel filme, fita adesiva, seringa descartável, elicitores, membrana filtrante, membrana millipore, sílica gel, ágar, meio de cultura com seu respectivos sais, papel kraft, citrato de sódio, hormônios 2,4D e CIN, sacarose, água de coco, reagentes como: acetona, hexano, metanol, acetonitrila, HCl, NaOH, fenol, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, álcool 96%, solução de folicur 0,1%, hipoclorito 0,5%.

## **7. EQUIPE EXECUTORA E LOCAL DE REALIZAÇÃO DE EXPERIMENTO**

Talita Perez Cantuaria Chierrito (PIBIC/Fundação Araucária /Uem), Graciete Balestro e Cecília Watanabe (Técnicas de laboratório), Elisângela Fumagali (Doutoranda/Uem), Regina Aparecida Correia Gonçalves (Co-orientadora), Arildo José Braz de Oliveira (Orientador).

Localidade: Laboratório Química Farmacêutica e Laboratório de Agronomia, ambos na Uem (Universidade Estadual de Maringá).

## **8. ORÇAMENTO**

Está representado na tabela abaixo, os reagentes e materiais de consumo, alguns itens já temos no laboratório (Adquiridos via projeto do Edital Universal do CNPq e do FINEP) e

outros serão adquiridos por envio do projeto a agências de fomento (CNPq, Fundação Araucária).

Rubrica	Qtde.	Valor (R\$)	Justificativa da necessidade para o projeto
Coluna C-18 ODS, 5 $\mu$ 250 x 4,6mm	01	2.023,00	Análise por cromatografia dos limonóides
Cartucho p/ Pré-Coluna C-18-ODS	01 Pct c/ 10 un.	773,00	Proteção da coluna cromatográfica
Kit p/ filtração de amostra para Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): seringa de 5 mL com ponta de metal e membranas filtrantes p/ HPLC poro de 0,2 micrometros tipo PTFE-F (pacote com 100)	01	600,00	Proteção da coluna cromatográfica e pré-purificação das amostras
Seringa p/ CLAE 50 $\mu$ l	01	171,31	Injeção de amostras
Tubos de ressonância magnética nuclear, Gold Label, 1cx, 5 um.	01	200,00	Identificação e elucidação da estrutura dos compostos biotransformados
Solventes comuns (metanol, etanol, clorofórmio, hexano, acetato de etila, isopropanol, diclorometano, dimetilsulfóxido ...)	100 litros	1.000,00	Extração, processos de separação cromatográficas
Solventes grau para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): metanol, acetonitrila, ..	15 litros	1.500,00	Análise (identificação e quantificação) dos produtos produzidos pelas células em suspensão.
Reagentes (borohidreto de sódio, iodeto de metila, brometo de cetiltrimetilamônio, reagente sililante, lithium methylsulfanyl carbanion,...)	01	1.000,00	Reações de preparação e de derivados
Reagentes para preparação de meios de cultura (ágar, sais inorgânicos, vitaminas, fitorreguladores, tampões)	01	1.250,00	Preparação de meios de cultivo
Vidrarias em geral (pipeta, erlenmeyer, béquer, proveta, balões volumétricos.....)	01	800,00	Material para preparação de soluções

Rubrica	Qtde.	Valor (R\$)	Justificativa da necessidade para o projeto
Solventes deuterados (clorofórmio, metanol, dimetilsulfóxido, água)	100 ml	500,00	Identificação e elucidação da estrutura dos compostos isolados
Materiais em geral (filmes em PVC, fita crepe, papel craf, estiletes, luvas, etc.	01	500,00	Usos diversos
Extrator Soxhlet, capacidade de 300 mL e capacidade de extração de 200 mL	01	950,00	Extração de limonóides e dos polissacarídeos

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, R. J.; DE LUCA, V. Phytochrome is involved in the light-regulation of vindoline biosynthesis in catharanthus. *Plant Physiol.*, Lancaster, v. 100, no. 2, p. 1029-1032, Oct. 1992.

ASHRAF T. KHALIL, GALAL T. MAATOOQ, AND KHALID A. El Sayed Limonoids from *Citrus reticulata*, *Z. Naturforsch* 58c, p.165-170, 2002.

BARZ, W.; MACKENBROCK, U. Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpans in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, The Hague, v. 38, p. 199–211, 1994.

BERHOW M. A., HASEGAWA S., AND MANNERS G.D., Citrus Limonoids- Functional Chemicals in Agriculture and Food. Berhow and Hasegawa, American Chemical Society, Washington DC, 2000.

BLECHERT, S.; BRODSCHELM, W.; HOLDER, S.; KAMMERER, L.; KUTCHAN, T. M.; MUELLER, M. J.; XIA, Z. Q.; ZENK, M. H. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, D.C., v. 92, no. 10, p. 4099-4105, May 1995.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.*, Shannonv, v. 161, no. 5, p. 839–851, 2001.

BUGG. TIMOTHY D. H.; LEWIN, ANDREW M.; CATLIN, ERIC R. Regiospecific Ester Hydrolysis by Orange Peel Esterase - An Undergraduate Experiment. *J. Chem. Educ.*, v. 74, p. 105, 1997.

CHAPLIN, M. F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. (Ed.). *Carbohydrate analysis: a practical approach*. 2nd. ed. Oxford: Oxford University, 1994. p. 1-40.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, v. 131, p. 209-217, 1984.

COLLIN, H. A. Secondary product formation in plant tissue cultures. *J. Plant Growth Regul.*, New York, v. 34, no. 1, p. 119–134, May 2001.

CORSARO, M. M.; CASTRO, C. D.; NALDI, T.; PARRILLI, M.; TOMÁS; J. M and REGUÉ, M. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR characterization and secondary structure of the K2 polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* strain 52145. *Carbohydrate Research*, v. 340 2212–2217, 2005.

DRAWERT, F.; BERGER, R. G.; GODELMANN, R. Regioselective biotransformation of valencene in cell suspension of *Citrus* sp. *Plant Cell Reports*, v. 3, p. 37-40, 1984.

FLORES-SANCHEZ, J. I.; ORTEGA-LOPEZ, J.; MONTES- HORCASITAS, M. C.; RAMOS- VALDIVIA, A. C . Boisyntesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant. Cell Physiol.*, v. 43, p. 1502-1509, 2002.

FRANSSEN, M. C. R.; WALTON M. J. Biotransformations. In: WALTON, M. J.; BROWN, D. E. (Ed.). *Chemicals from plants, perspectives on plant secondary products*. London: Imperial College, 1999. p. 277–325.

FRY, S. C.; ALDINGTON, S.; HETHERINGTON, P. R.; AITKEN, J. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol.*, Lancaster, v. 103, no. 1, p. 1-5, Sept. 1993.

FRYDMAN, A.; WEISSHAUS, O.; BAR-PELED, M.; HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W.; MARIN, F. R.; LEWINSOHN, E.; FLUHR, R.; GRESSEL, J.; EYAL, Y. *Citrus* fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of *Citrus*. *Plant J.*, v. 40, p. 88-100, 2004.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; OWEN, P. W.; NARASU, M. L. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, v.19, p.175-199, 2001.

GUNTER, E.A., OVODOV, Y.S. An alterate carbon source for enhancing production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus. *Carbohydr. Res.*, v. 18, p. 1641-1645, 2002.

HONDA, Y.; INAOKA, H.; TAKEI, A.; SUGIMURA, Y.; OTSUIJI, K. Extracellular polysaccharides produced by tuberose callus. *Phytochemistry*, v. 41, p. 1517-1521, 1996.

KAMISACO W, MORIMOTO K, MAKINO I, ISOI K. Changes in triterpenoid content during the growth cycle of cultured plant cells. *Plant Cell Physiol.*, v. 25, p. 1571-1574, 1984.

KELLER. H., BLEIN J.P., BONNET. P., RICCI. P. *Plant Physiol.* 110,p.365,1996.

KUTNEY, J. P. Plant cell culture combined with chemistry-a powerful route to complex natural products. *Pure Appl. Chem.*, London, v. 68, no. 11, p. 2073-2080, 1996.

KUTNEY, J. P.; SAMIJA, M. D. ; HEWITT, G. M. ; BUGANTE, E. C. ; GU, H. Anti-inflammatory oleanane triterpenes from *Tripterygium wilfordii* cell suspension cultures by fungal elicitation. *Plant Cell Rep.*, v. 12, p. 356-359,1993.

LO, Sze-Chung Clive; NICHOLSON, Ralph L. Reduction of light-Induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls: implications for a compensatory role in the defense response. *Plant Physiol.*, Lancaster, v. 116, no. 3, p. 979–989, Mar. 1998.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, Lund, v. 15, p. 473–495, 1962.

NISHIUCHI, T.; IBA, K. Roles of plastid fatty acid desaturases in defense response of higher plants. *J. Plant Res.*, Tokyo, v. 111, no. 4, p. 481-486, Dec. 1998.

PARCHMANN, S.; GUNDLACH, H.; MUELLER, M. J. Induction of 12-Oxo-Phytodienoic Acid in Wounded Plants and Elicited Plant Cell Cultures. *Plant Physiol.*, Lancaster, v. 115, p.1057, 1997.

POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; OVODOVA, R. G.; BUSHNEVA, O. A.; OVODOV, Y. S. Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 21, p. 617-624,1999.

PURICELLI, L.; INNOCENTI, G.; DELLE MONACHE, G.; CANIATO, R.; FILIPPINI, R.; CAPPELLETTI, E. M., *Nat. Prod. Lett.* 16, p.95-100, 2002.

RALPHS, M.H., GARDNER, D.R. Alkaloid levels in Duncecap (*Delphinium occidentale*) and Tall larkspur (*D. barbeyi*) grown in reciprocal gardens: separating genetic from environmental influences. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 29, p. 117-124, 2001.

ROMERO FERIA, R.; LAZO, E.; NOYOLA PONCE, T.; CERDA GARCÍA ROJAS, C.; RAMOS VALDIVIA, A. Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*, *Biotechnology*, v. 27, p. 839-843, 2005.

SALMORE, A. K.; HUNTER, M. D. Elevational trends in defense chemistry, vegetation, and reproduction in *Sanguinaria canadensis*. *Chem. Ecol.*, v. 27, p. 1713-1727, 2001.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation *Carbohydr. Res.*, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R.V.; CIPRIANI, T.R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis, *J. chromatography A* , p. 215-222, 2008.

SATO, F., HASHIMOTO, T., TAMURA, K., CHOI, K.B., MORISHIGE, T., FUJIMOTO, H., AND YAMADA, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, p.367-372, 2001.

SEO, S.; SANO, H.; OHASHI, Y. *Plant Cell*, 11, p.289, 1999.

SHARKEY, T.D., SINGSAAS, E.L. *NATURE*, 374, p.769, 1995.

SHIN HASEGAWA, RAYMOND D. BENNETT AND V. P. MAIER, Biosynthesis of limonoids in *Citrus* seedlings. *Phytochemistry*, v.23, no 8, p.1601-1603, 1984.

SKRZYPEZAK-PIETRASZEK, E.; HENDEL, A. Polysaccharides from *Melittis melissophyllum* L. herb and callus. *Pharmazie*, v. 55, p. 768-771, 2000.

SNOWDEN, K. C.; RICHARDS, K. D.; GARDNER, H. C. *Plant Physiol.*, v. 107, p. 341, 1995.

SOLEMAIN, A.; PARVIN, Z.; ESMAEIL, M. Quantification of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 221, p. 202-207, 2005.

SUGA, T.; HIROTA T. Biotransformação of exogenous substrates by plant cell cultures. *Phytochemistry*, v. 20, p. 2393-2406, 1990.

TIETJEN, K.B.; HUNKLER, D.; MATERN, U. *Eur.J.Biochem*, 131, p. 401, 1983.

TOWERS, G. H. N.; ELLIS, S. Secondary metabolism in plant tissue cultures transformed with *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenesis*. In: Human Medicinal Agents from Plants, Kinghorn, AD; Balandrin, MF. American Chemical Society, Washington, DC, 1993.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do Metabolismo de Plantas Mediciniais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Argos Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna.*, Chapecó, 2001. p. 381-431.

VIARD, M. P.; MARTIN, F.; PUGIN, A.; ANDERSON, L.; BLEIBAUM, J.; FAN, C.; HAWKINS, D.; RADKE, S. E.; DAVIES, H. M. 1994.

WINJNSMA, R.; GO J., T.K.A., VAN WEERDEN, I.N., HARKES, P.A.A., VERPOORTE, R., SVENDSEN, a.b. *Plant Cell Rep*, 4, p.241, 1985.

YOON HJ, KIM HK, MA CJ, HUH H .Induced accumulation of triterpenoids in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures using a yeast elicitor. *Biotechnol. Lett.* 22: 1071- 1075, 2000.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)