

Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

LUCIANA MOREIRA INÁCIO

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA AUMENTAR A
PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE EM CULTURAS
CELULARES DE *Solanum lycocarpum*

RIBEIRÃO PRETO- SP
2020

Luciana Moreira Inácio

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA AUMENTAR A
PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE EM CULTURAS
CELULARES DE *Solanum lycocarpum*

Tese de Doutorado apresentada à
Universidade de Ribeirão Preto –
UNAERP, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor no
Programa de Doutorado em
Biotecnologia, na área de Biotecnologia
aplicada à saúde humana e animal.
Orientadora: Profa. Dra. Suzelei de
Castro França

Ribeirão Preto
2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

1373e Inácio, Luciana Moreira, 1973-
Estratégias biotecnológicas para aumentar a produção de
metabólitos de interesse em culturas celulares de *Solanum
lycocarpum* / Luciana Moreira Inácio. – Ribeirão Preto, 2020.
97 f.: il.: color.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suzelei de Castro França.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. *Solanum lycocarpum*. 2. Lobeira. 3. Metabólitos secundários.
4. Cultura de células. 5. Amida de ácido hidroxicinâmico. I. Título.

CDD 660

LUCIANA MOREIRA INÁCIO

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS
DE INTERESSE EM CULTURAS CELULARES DE SOLANUM LYCOCARPUM.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.


Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

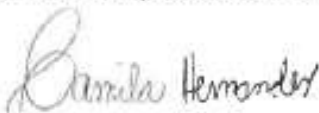
Data da defesa: 24 de setembro de 2020

Resultado: Aprovada


BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Suzetei de Castro França
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof. Dr. Antonio Luis de Oliveira
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - FFCL


Prof. Dra. Camila Hernandez
Albert Einstein


Prof. Dra. Ana Maria Soares Pereira
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof. Dra. Adriana Aparecida Lopes
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

Dedico esta tese ao meu marido, às minhas filhas, à minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*) que se privaram de minha presença e me incentivaram para que eu pudesse realizar este sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, visto que, sem Ele, não teria forças para vencer tantos desafios.

Ao meu esposo Ronan, pelo apoio incondicional, assim como às minhas filhas, pela compreensão e pelo incentivo.

À minha orientadora, professora Suzelei de Castro França, pelos ensinamentos sem fim, incentivo, dedicação e paciência com que conduziu magnificamente este trabalho.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia da UNAERP pelas contribuições e pelos conhecimentos compartilhados, especialmente à professora Adriana Lopes, pelas orientações e análises realizadas.

Aos técnicos dos laboratórios, que foram incansáveis em auxiliar nos experimentos realizados.

Aos colegas, pelas trocas de experiências, pelo apoio e pelo companheirismo.

Aos demais funcionários que possibilitaram ambiente agradável e materiais sempre disponíveis.

Às estagiárias Ana Carolina, Nina e Lyamara pela dedicada participação nos experimentos.

Ao prof. Dr. Jairo K. Bastos pelos padrões disponibilizados.

À CAPES, pelo financiamento oferecido pela Bolsa Taxas.

O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível (Max Weber).

RESUMO

Metabólitos secundários são compostos químicos presentes nas células de plantas superiores, produzidos em pequena quantidade, utilizados há tempos em produtos farmacêuticos, pesticidas e aromatizantes. *Solanum lycocarpum*, planta predominantemente do Cerrado, conhecida como lobeira por ser a principal fonte de alimento do lobo guará, apresenta grande interesse farmacológico e comercial, por ser rica em glicoalcaloides em seus frutos e em polifenóis em suas folhas. As infusões de folhas e flores são utilizadas popularmente para tratamento de bronquites, úlceras, antiespasmódico e antiepilético, enquanto o polvilho de frutos tem tratamento satisfatório para o controle do diabetes. A *S. lycocarpum* e o lobo guará mantêm uma relação de sobrevivência. Com a ameaça de extinção desse mamífero, a lobeira também corre o risco de desaparecer. Uma alternativa biotecnologicamente reprodutível e ecologicamente correta para obtenção de metabólitos secundários dessa espécie, de relevância para a indústria, é a cultura de células vegetais, por não depender de condições climáticas, desmatamento de áreas para plantio e possibilitar melhor assepsia e condições de cultivo. As culturas de calos de *S. lycocarpum*, oriundos de explantes de folhas, apresentaram-se friáveis e possibilitaram a inserção de células em suspensão. Análises fitoquímicas por cromatografia líquida em extratos etanólicos dessas células não comprovaram a presença de glicoalcaloides esteroidais, mas mostraram a presença de quatro lignanamidas, de m/z 625,2542 e 625,2544, com tempos de retenção 9.1, 9.7, 10.3 e 10,5 min, descritas na literatura como grossamida (cis/trans), toreliamida A ou canabisina F. As lignanamidas grossamida e canabisina F são compostos de grande interesse biotecnológico, devido à sua atividade neuroprotetora, inibindo a enzima acetilcolinesterase, um dos mecanismos necessários para impedir o avanço de doenças, como a de Alzheimer, que acomete 24 milhões de pessoas no mundo. Nesse extrato, foi isolada e identificada uma amida de ácido hidroxicinâmico, a N-cafeoil putrescina, substância encontrada em algumas espécies de *Solanum*, mas nunca identificada em *Solanum lycocarpum*, cuja principal atividade biológica é antioxidante. Experimentos biotecnológicos de estimulação da produção de lignanamidas presentes na lobeira foram realizados com os elicitores biótico e abiótico, extrato de fungo *Botryosphaeria rhodina* e metil jasmonato, respectivamente. O tratamento mais promissor foi a utilização de metil jasmonato 50 μ M, inserido no 22º dia de cultura de células em suspensão de *S. lycocarpum*, por 7 dias. Este experimento apresentou um aumento de 147% da área do pico da lignanamida de tempo de retenção 9,7 min no meio de cultura da amostra elicitada em comparação com o meio de cultura da amostra controle (sem elicitação). Comparando-se a área total desse pico do meio de cultura e células elicitadas com meio e células da amostra controle, obteve-se um aumento de 23%. A elicitação com metil jasmonato, além de proporcionar um aumento da área do pico da lignanamida de interesse, possibilitou a excreção dela para o meio de cultura, possibilitando novos trabalhos de sua produção, reutilizando-se as células de lobeira.

Palavras-chave: *Solanum lycocarpum*. Lobeira. Metabólitos secundários. Cultura de células. Lignanamidas. Amida de ácido hidroxicinâmico.

ABSTRACT

Secondary metabolites are chemical compounds present in higher plants cells, produced in small quantities, used for a long time in pharmaceuticals, pesticides and flavorings. *Solanum lycocarpum*, a plant predominantly from Cerrado, known as lobeira, for being the main food source of the guará wolf, has great pharmacological and commercial interest, as it is rich in glycoalkaloids in its fruits and in polyphenols in its leaves. Leaves and flowers infusions are popularly used to treat bronchitis, ulcers, antispasmodics and antiepileptics, while the fruit powder has satisfactory treatment for diabetes control. *S. lycocarpum* and the guará wolf maintain a survival relationship. This mammal is threatened with extinction, lobeira is also in danger of disappearing. A biotechnologically reproducible and ecologically correct alternative to obtaining this secondary metabolites species, relevance to industry, is the plant cells culture, as it does not depend on climatic conditions, deforestation areas for planting and allows better asepsis and cultivation conditions. *S. lycocarpum* callus cultures originating from leaf explants, were friable and allowed the cells insertion in suspension. Phytochemical analyzes by liquid chromatography in ethanolic extracts of these cells did not prove steroidal glycoalkaloids presence, but showed the presence of four lignanamides, with m/z 625.2542 and 625.2544 and retention times 9.1, 9.7, 10.3 and 10, 5 min, described in literature as grossamide (cis / trans), torelamide A or cannabisin F. Lignanamide grossamide and cannabisin F are compounds of great biotechnological interest, due to their neuroprotective activity, inhibiting acetylcholinesterase enzyme, one of the necessary mechanisms to prevent the diseases advance, such as Alzheimer's, which affects 24 million people worldwide. In this extract, a hydroxycinnamic acid amide, N-caffeyl putrescine, was found and identified, this substance was found in some species of *Solanum*, but never identified in *Solanum lycocarpum*, whose main biological activity is antioxidant. Biotechnological experiments to stimulate lignanamides production present in lobeira were carried out with the biotic and abiotic elicitors, fungus extract *Botryosphaeria rhodina* and methyl jasmonate, respectively. The most promising treatment was the use of 50 mM methyl jasmonate, inserted on the 22nd day of cell culture in suspension of *S. lycocarpum*, for 7 days. This experiment showed a 147% increase in the lignanamide peak area of retention time 9.7 min in the culture medium of the elicited sample compared to the culture medium of the control sample (without elicitation). Comparing to the total area of this peak of the culture medium and cells elicited with medium and cells of the control sample, an increase of 23% was obtained. The elicitation with methyl jasmonate, in addition to providing an increase in the peak area of the lignanamide of interest, made it possible to excrete it into the culture medium, enabling new work on its production, reusing the lobeira cells.

Keywords: *Solanum lycocarpum*. Lobeira. Secondary metabolites. Cell culture. Lignanamide. Hydroxycinnamic acid amide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de formação e propagação de calos de folhas.....	18
Figura 2 – Classes e subclasses de metabólitos isolados do gênero <i>Solanum</i>	22
Figura 3 – <i>Solanum lycocarpum</i> (a) folhas, (b) flores e (c) frutos.....	25
Figura 4 – Estados brasileiros com ocorrência de <i>Solanum lycocarpum</i> confirmada.....	26
Figura 5 – Estrutura da solasonina e solamargina.	27
Figura 6 – Classificação das lignanamidas e suas estruturas químicas.....	29
Figura 7 – Proposta de rota biossintética de lignanamidas em plantas.....	30
Figura 8 – Fórmula estrutural das Toreliamidas A, B e C.....	31
Figura 9 – Fórmula estrutural da lignanamidas canabisina F (17).....	32
Figura 10 – Algumas lignanamidas presentes em raízes de <i>S. melongena</i> : melongenamida E, melongenamida F, melongenamida G.....	33
Figura 11 – Via de biossíntese de HCAA em plantas.....	35
Figura 12 – Calos de lobeira <i>in vitro</i>	48
Figura 13 – Células de lobeira em suspensão	48
Figura 14 – Curva de crescimento de células em suspensão	49
Figura 15 – Cromatogramas de extratos de células de <i>S. lycocarpum</i> após extração ácido-base após o início da cultura (A) 3 dias, (B) 6 dias, (C) 15 dias, (D) solamargina (E) solasonina.....	50
Figura 16 – Cromatograma do extrato etanólico bruto de lobeira	52
Figura 17 – Cromatograma do pico base (BPC) do extrato etanólico bruto de <i>S. lycocarpum</i> com sinais de substâncias com m/z 625,25.....	52
Figura 18 – Espectro de massas da fragmentação das substâncias de m/z 625,25 do extrato etanólico bruto de células de lobeira nos tempos de retenção (A) 9,1 min, (B) 9,7 min, (C) 10,3 min e (D) 10,5 min	53
Figura 19 – Comparação das fórmulas moleculares, fórmulas estruturais e massa exata de grossamida, toleriamida A e canabisina F	54
Figura 20 – (A) Cromatograma do extrato etanólico bruto e (B) perfis da banda de absorção de possíveis lignanamidas.....	55
Figura 21 – Perfil da banda de absorção de lignanamida	56
Figura 22 – Frações do extrato de <i>S. lycocarpum</i> após separação por cartucho SPE, cujas eluições foram em ACN: H ₂ O (A) (25:75), (B) (50:50), (C) (100:0) e (D) AcOEt/ACN	57

Figura 23 – Cromatograma da fração separada por SPE ACN:H ₂ O (50:50) em CLAE, modo preparativo	58
Figura 24 – Espectros UV das substâncias coletadas (L1, L2, L6 e L7) que possuem perfil semelhante aos de lignanamidas comparados aos da literatura	58
Figura 25 – Espectro de ¹ H da amostra N-cafeoil-putrescina (600 MHz; DMSO-d ₆)	59
Figura 26 – Espectro de ¹³ C da amostra N-cafeoil-putrescina (150 MHz; DMSO-d ₆)	60
Figura 27 – Mapa de contorno HSQC da amostra N-cafeoil-putrescina (600 MHz; DMSO-d ₆)	61
Figura 28 – Mapa de contorno HMBC da amostra N-cafeoil-putrescina (600 MHz; DMSO-d ₆)	62
Figura 29 – Fórmula estrutural da N-cafeoil-putrescina	63
Figura 30 – Cromatograma de íons totais (TIC) e espectros MS/MS das substâncias com t _R 1.90 e 3.41 min. da amostra L ₁	64
Figura 31 – Cromatograma (A) do tratamento 10 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B), 9,7 min (C), 10,3 min (D) e 10,5 min (E)	68
Figura 32 – Cromatograma (A) do tratamento 12 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B), 9,3 min (C), 9,7 min (D) e 10,3 min (E)	68
Figura 33 – Cromatograma (A) do tratamento 14 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B) e 9,7 min (C)	69
Figura 34 – Cromatograma (A) do tratamento 15 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B), 9,7 min (C), 10,3 min (D) e 10,6 min (E)	70
Figura 35 – Gráfico comparativo dos tratamentos do experimento de elicitação com extrato de fungo (100 µg/mL) e MeJa (500µM)	71
Figura 36 – Gráfico comparativo dos tratamentos do experimento de elicitação com extrato de fungo (10 µg/mL) e MeJa (50µM)	72
Figura 37 - Área total (meio de cultura e células) do pico de t _R 9,7 min do experimento de elicitação realizado no 20 ^o dia de cultura.....	73
Figura 38 - Área total (meio de cultura e células) do pico de t _R 9,7 min do experimento de elicitação realizado no 22 ^o dia de cultura.....	73
Figura 39 – Cromatograma (A) do tratamento 15 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B), 9,7 min (C), 10,3 min (D) e 10,6 min (E)	76
Figura 40 – Fórmula estrutural da cis/trans grossamida	76
Figura 41 – Fórmulas estruturais de grossamida, toleriamida A e canabisina F	78

Figura 42 – Espectro MS/MS do extrato etanólico bruto com íon fragmento 298, nos tempos de retenção 10,3 (A) e 10,6 min (B).....	79
Figura 43 – Esquema da via do chiquimato para formação de lignanamidas e fenolamidas.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fitoquímica, Propriedades biológicas e classificação dos compostos de <i>Solanum</i> (modificada)	22
Tabela 2 – Dados de RMN 1H e 13C da substância isolada	63
Tabela 3 – Numeração dos tratamentos do experimento de elicitação para estimulação da produção de lignanamidas em <i>S. lycocarpum</i> em suspensão	65
Tabela 4 – Íons precursores, íons fragmentos e área dos picos das amostras do experimento de elicitação, para os picos cujos íons precursores são 625.25 [M+H] ⁺ e 647.23 [M+Na] ⁺	66
Tabela 5 – Análise das amostras de meio de controle e elicitação e área dos picos de íons precursores 625.25 [M+H] ⁺ e 647.23 [M+Na] ⁺	67
Tabela 6 – Comparação da fragmentação de massas de compostos com mesma massa exata 625,2544	77
Tabela 7 – Dados UV de possíveis lignanamidas encontradas no extrato etanólico bruto de <i>S. lycocarpum</i>	80
Tabela 8 – Dados UV de algumas lignanamidas encontradas em sementes de <i>Cannabis sativa</i> L.	80
Tabela 9 – Dados de RMN 1H e 13C da N-cafeoil-putrescina em comparação com a N-cafeoil-putrescina da literatura.....	81
Tabela 10 – Dados de MS e MS/MS das substâncias com t _R 1.90 e 3.41 min. da amostra L1 em comparação com a N-cafeoil-putresina da literatura ^{a,b}	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUAE	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
H ₂ O	Água
HCAAs	<i>Hydroxycinnamic acid amides</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IES-EM	Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Eletrospray</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeJa	Metil Jasmonato
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i>
UHPLC-q-ToF <i>Time-Of-Flight</i>	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole</i>
t _R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS <i>IN VITRO</i>	17
1.2	FAMÍLIA SOLANACEAE	20
1.2.1	Gênero <i>Solanum</i>	21
1.2.1.1	<i>Solanum lycocarpum</i>	24
1.3	GLICOALCALOIDES ESTEROIDAIIS EM <i>S. lycocarpum</i>	27
1.4	LIGNANAMIDAS	28
1.4.1	Lignanamidas Em Espécies <i>Solanum</i>	32
1.5	AMIDAS DE ÁCIDO HIDROXICINÂMICO	34
2	JUSTIFICATIVA	37
3	HIPÓTESE	38
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1	INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Solanum lycocarpum</i> PARA PRODUÇÃO DE CALOS.....	40
5.1.1	Estabelecimento De Suspensões Celulares De <i>S. lycocarpum</i>	41
5.2	CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>S. lycocarpum</i>	41
5.3	PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE LOBEIRA.....	42
5.4	ANÁLISE POR CLUAE q-ToF/MS PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE EM CULTURA DE CÉLULAS DE <i>S. lycocarpum</i>	42
5.5	ANÁLISE EXPLORATÓRIA E ISOLAMENTO DE METABÓLITOS DE <i>S. lycocarpum</i>	43
5.5.1	Análise Analítica Exploratória por CLAE-UV	43
5.5.2	Extração e Isolamento	43

5.6	IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIA ISOLADA	44
5.6.1	Espectroscopia de RMN 1D e 2 D	44
5.6.2	Espectrometria de Massas CLAE-MS/MS	44
5.7	EXPERIMENTO DE ELICITAÇÃO	45
5.7.1	Análise Das Amostras Do Experimento De Elicitação Em CLUAE q-ToF/MS.....	47
6	RESULTADOS	48
6.1	OBTENÇÃO DE CULTURAS DE <i>S. LYCOCARPUM IN VITRO</i>	48
6.2	CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	49
6.3	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	49
6.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTO DE INTERESSE.....	59
6.5	ELICITAÇÃO BIÓTICA E ABIÓTICA DE METABÓLITOS DE INTERESSE	64
7	DISCUSSÕES	74
7.1	CULTIVO DE CÉLULAS E ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	74
6.2	ELICITAÇÃO PARA IMPULSIONAR A PRODUÇÃO DE LIGNANAMIDAS.	83
8	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Plantas são fontes de produtos naturais, produzem diversos compostos, conhecidos como metabólitos secundário, impulsionadas a se protegerem de insetos, de patógenos microbianos e de animais. Esses metabólitos são utilizados como fármacos, aromatizantes, corantes, cosméticos e inseticidas para controle de pragas (OCHOA-VILLARREAL et al. 2016).

Mais de 200.000 metabólitos secundários foram encontrados e identificados em plantas, mas nem todos tiveram suas atividades investigadas. Recentemente, os produtos naturais voltaram a ser de interesse para indústrias de biotecnologia, ampliando, principalmente, a gama de produtos farmacêuticos do mercado (OCHOA-VILLARREAL et al., 2015).

A produção de metabólitos secundários em plantas é de aproximadamente 1% do peso seco, dependendo do desenvolvimento da planta e de seu estágio fisiológico. Esses compostos desempenham papel fundamental nas interações planta/ambiente, planta/planta e planta/patógeno (SAHRAROO et al., 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população do mundo necessita de medicamentos tradicionais para uso diário, dentre eles, medicamentos anti-infecciosos e anticarcinogênicos que são 65% derivados de plantas. Em face desse percentual, existe uma preocupação ambiental com a degradação ambiental e perda de espécies pela exploração, para atender a demanda do mercado (DIAS et al., 2016).

A utilização de plantas inteiras para obtenção de compostos de interesse industrial pode acabar com sua diversidade genética, assim como problemas de fluxos climáticos e ambientais podem modificar o perfil químico de plantas, prejudicando a produção de bioativos de interesse. Para minimizar tais problemas, as culturas de células ou de órgãos vegetais tornaram uma promissora opção à extração natural de plantas (SIVANANDHAN et al., 2014).

O cultivo de células vegetais em laboratório, também denominado cultivo *in vitro*, apresenta expressivas vantagens como cultivo em condições controladas, baixo risco de contaminação (REBELO et al., 2020), além de fornecer uma produção sustentável e contínua de compostos naturais, independente de condições geoclimáticas (DIAS et al., 2016).

A produção sustentável de metabólitos secundários de plantas pode ser realizada de maneira promissora a partir de fábricas de células vegetais, que oferecem culturas em larga escala de forma contínua, com rigoroso controle de produção e qualidade, em que o produto pode ser obtido em qualquer localidade, livre de microrganismos, de pesticidas ou de herbicidas e as espécies de plantas podem ser conservadas, sem risco de extinção (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016).

1.1 CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS *IN VITRO*

O início do cultivo de células vegetais *in vitro* deu-se há mais de um século. Inicialmente, em 1902, propôs-se a primeira explicação sobre a totipotência das células de plantas. A escala industrial ocorreu apenas em 1950, com a produção de orquídeas a partir da cultura de tecidos. Os tipos de cultura de tecidos vegetais podem ser: cultura do meristema apical, cultura axilar de brotos, cultura de calos, cultura de células em suspensão, cultura de protoplastos e cultura embrionária (GAIKWAD; SINGH; GILHOTRA, 2017).

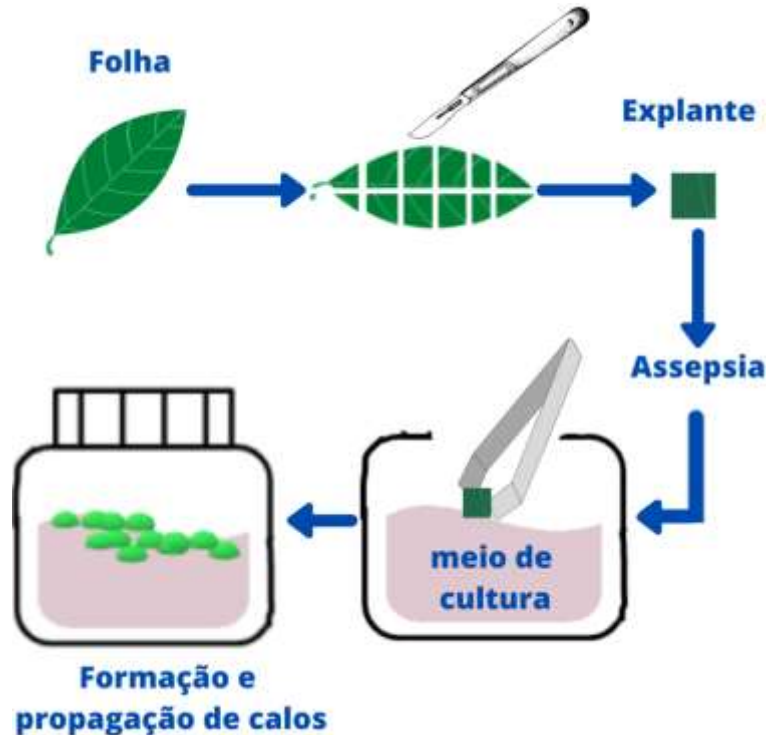
O estabelecimento e manutenção de culturas *in vitro* dependem do meio utilizado e de fitorreguladores. Dentre os meios mais utilizados em culturas de tecidos vegetais está o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) que combina dentre alguns de seus elementos, como vitaminas, micronutrientes e macronutrientes (THAYARUBAN, 2015).

Os reguladores de crescimento, auxina, citocinina e giberelina, têm como principal função influenciar o crescimento e o desenvolvimento de tecidos e de células vegetais, sendo as duas primeiras as mais utilizadas. A concentração utilizada depende da espécie, do tecido ou do órgão cultivado. A formação de raízes é favorecida com uma maior concentração de auxinas; calos (células desdiferenciadas) são desenvolvidos, muitas vezes, por combinação de auxina e citocinina. Citocinina promove, por sua vez, divisão celular e formação de partes aéreas (OSENÍ et al., 2018).

Calos são células desdiferenciadas a partir de um processo em que tecidos vegetais são submetidos a processos para reverter suas células para um estágio menos diferenciado em sua própria linhagem, semelhante a uma célula-tronco, que possui pluripotencialidade (totipotência). A desdiferenciação pode ser induzida pela remoção de explante de tecido vegetal, desinfecção e sua acomodação em meio de

cultura a fim de que haja reprogramação das células, que adquirirão estado desdiferenciado (FEHÉR, 2019), cujo esquema é apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema de formação e propagação de calos de folhas



Fonte: Autora

O estabelecimento de biomassa de calos altamente produtivos é um dos protocolos para produção em larga escala. Calos têm capacidade ilimitada de crescimento, sintetizando compostos valiosos presentes na planta original. Derivadas de calos, as suspensões celulares são mantidas em frascos e o aumento de escala é obtido em biorreator. A otimização das condições da cultura, como pH, temperatura, velocidade de agitação, fitorreguladores e fontes de carbono são essenciais em todas as etapas (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016).

Calos são, assim, biorreatores naturais, devido à sua rápida multiplicação celular e produção exponencial de substâncias naturais de interesse industrial *in vitro*. Esses calos podem ser inseridos em meio líquido, em que tem-se culturas de células vegetais em suspensão (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

Nas culturas de células vegetais em suspensão, busca-se obter uma cultura de células finas, já que os agregados celulares constituem-se um dos grandes desafios biotecnológicos, pois influenciam a fisiologia, a diferenciação e a morfologia das células (MAVITUNA; YOON; PARK, 2016).

A cultura de suspensão de células, dentro de um período de cultivo de duas a quatro semanas, apresenta um ciclo biossintético condensado para se estudar a cinética de crescimento, facilitando a implementação de condições ideais para a produção de vários compostos medicinais em quantidades significativas (SIVANANDHAN et al., 2014).

A necessidade de se melhorar as estratégias para aumento de escala de produção de plantas para ornamentação, para produção de biocombustíveis e de compostos de interesse do setor farmacêutico em vegetais gerou diferentes técnicas de produção *in vitro* (MAMUN; EGERTSDOTTER; AIDUN, 2015).

A elicitação é uma estratégia promissora para o incremento de metabólitos secundários em culturas vegetais *in vitro*, devido à sua relativa eficiência, à operação acessível e a custo reduzido, possibilitando uma maior obtenção de compostos de interesse biotecnológico. Para realizar a elicitação, utilizam-se compostos que estimulam a síntese metabólica de algumas substâncias, desempenhando um papel relevante nas vias biossintéticas, seja para o aumento da produção de compostos ou para a produção de novos compostos. A produção de metabólitos secundários é desencadeada e ativada pelos elicitores, que acionam a resposta de defesa das células de plantas (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013).

Os elicitores naturais podem ser abióticos e bióticos. Os abióticos não possuem origem biológica, tais como luz ultravioleta, pH, temperatura, detergentes, campo elétrico e íons metálicos. Os bióticos são extratos de levedura, fúngicos ou microbianos, entre outros (MA et. al.; 2017).

Ao contrário dos elicitores abióticos, os elicitores bióticos apresentam composição complexa, muitas vezes indefinida. Dentre os elicitores bióticos, destacam-se os elicitores fúngicos, que podem ser homogenato de micélio, derivados da parede celular fúngica e frações de polissacarídeos. A tiarrina, por exemplo, foi aumentada em três vezes em culturas de raízes transformadas de *Ambrosia artemisiifolia*, utilizando-se o filtrado autoclavado da parede celular de *Protomyces gravidus*, que é um de seus patógenos (NARAYANI; SRIVASTAVA, 2017).

Estudos de elicitação originaram-se de extratos de fungos e mais recentemente, o metil jasmonato (MeJa), estimulando a síntese de bioativos com atividades de relevância para a indústria farmacêutica (LIU et al.; 2018). Os jasmonatos podem ser produzidos por fungos, como por exemplo, o *Botryosphaeria*

Rhodina (LOURENÇO et al., 2016). Jasmonatos acionam mecanismo de defesa em plantas, respondendo pela estimulação de diversos metabólitos secundários em calos, suspensão de células e cultura de tecidos vegetais (MENDOZA et al., 2018).

Zhang e colaboradores (2016) obtiveram maior produção de lignanas em raízes de *Isatis indigotica* Fort elicitando essa cultura com metiljasmonato, assim como houve um aumento de solasodine em cultura de raízes de *Solanum trilobatum* L.

Um dos inconvenientes da elicitação é que não se pode prever se o elicitor será eficiente para acúmulo de metabólitos em determinada cultura (AHMED; BAIG, 2014). A concentração do elicitor, tempo de exposição, idade e estágio da cultura são fatores que influenciam a produção e o acúmulo de bioativos em cultura de células (MURTHY; LEE; PAEK, 2014).

1.2 FAMÍLIA SOLANACEAE

A família Solanacea tem grande relevância para o universo científico, pois possui aproximadamente 90 gêneros e mais de 3000 espécies amplamente utilizadas na alimentação, na ornamentação e medicamentos. Entre as espécies, vale destacar o tomate, a berinjela, o pimentão e as pimentas (POZZATTI et al., 2017).

Desempenhando papel central na alimentação humana desde o início da civilização, a família Solanaceae é estudada para que se possam identificar seus metabólitos e proteínas, assim como suas principais atividades. Grande parte das pesquisas foi realizada com tomate, batata e tabaco, em virtude de sua importância econômica (GHATAK et al., 2017).

Os gêneros que merecem destaque nessa família são: *Capsicum*, *Lycium* e *Solanum* (SAMUELS, 2015).

Uma das espécies vegetais mais consumidas no mundo, o gênero *Capsicum* destaca-se por conter aproximadamente 50.000 variedades de pimenta. Na indústria farmacêutica, são relevantes graças à presença de capsaicinoides, de carotenoides, de flavonoides entre outras, utilizados contra doenças oxidativas (ANTONIO, WIEDNEMANNA; VEIGA JUNIOR, 2018).

Capsicum chinense cv. Guaraci, Cumari do Pará, é uma pimenteira que possui capsaicinoides com atividades antimutagênica, antioxidante e anticarcinogênica (SMOZINSKI; SANTOS, 2019). Já a *Capsicum annuum* var.

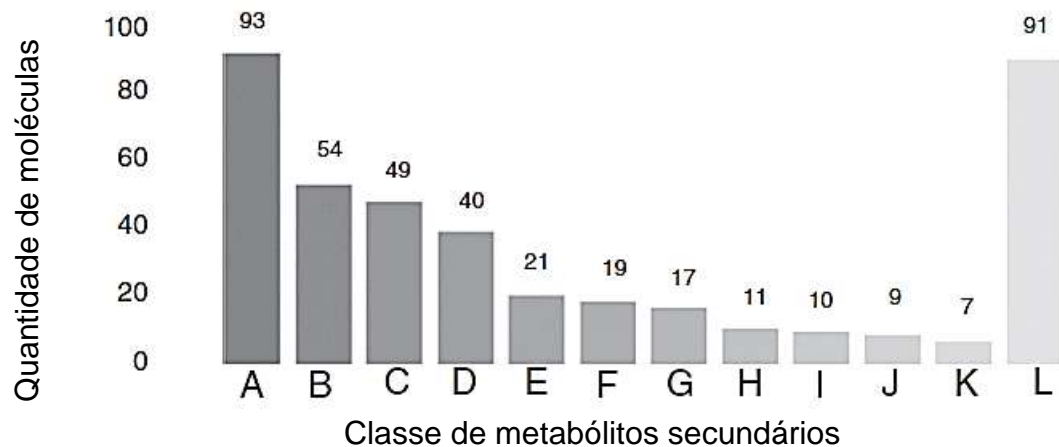
grossum, rica em grossamida e boehmenana, possui atividades neuroprotetivas e anti-inflamatórias (NAGUNO et al., 2019).

A atividade antioxidante é uma das características das espécies *Lycium*. Em *Lycium barbarum*, dímeros de amidas fenólicas, intituladas licumamidas A, B e C, como também NE-cumaroil tiramina e NE-ferroil tiramina possuíam tal atividade bem pronunciada (GAO et al., 2015). A espécie *Lycium ruthenicum* é utilizada para amenizar sintomas da menopausa, tratamento de furúnculos e doenças cardíacas. A prevenção do estresse oxidativo em doenças cardiovasculares com essa espécie deve-se, principalmente, aos polifenóis (WANG et al., 2018).

O gênero *Solanum* possui aproximadamente 350 espécies distribuídas em diferentes regiões fitogeográficas do nosso país, cujas atividades farmacológicas relevantes são analgésica, antialérgica, antianêmica, antiasmática, antibacteriana, anticâncer, anticonvulsivante, antidepressivo, antifúngico, anti-helmíntico, anti-inflamatório, antileishmanial e antiviral (AL SINANI; ELTAYEB, 2017).

1.2.1 Gênero *Solanum*

O gênero *Solanum* apresenta mais de 700 moléculas de interesse, com mais de 400 estruturas químicas distintas, divididas em 54 classes de metabólitos secundários, com destaque aos glicoalcaloides esteroidais, alcaloides esteroidais, saponinas, esteroides, flavonas, alcaloides, ácidos graxos, amidas, lignanamidas, alcaloides tropânicos e cumarinas, como apresentadas na Figura 2 (BARROS et al., 2018).

Figura 2 – Classes e subclasses de metabólitos isolados do gênero *Solanum*

A Glicoalcaloides esteroidais	B Alcaloides esteroidais	C Saponinas
D Esteroides	E Flavona	F Alcaloides
G Ácidos graxos	H Amida	I Lignanamida
J Alcaloides tropânicos	K Cumarina	L outros

Fonte: BARROS et al. (2018).

Grande parte dessas classes já foi investigada quanto às suas atividades biológicas. Na Tabela 1, estão apresentados alguns metabólitos com propriedades biológicas relevantes em espécies de *Solanum* (KAUNDA; ZHANG, 2019).

Tabela 1 – Fitoquímica, Propriedades biológicas e classificação dos compostos de *Solanum* (modificada)

Composto	Fonte vegetal	Propriedades biológicas
Saponinas esteroidais		
Torvosida N	<i>S. torvum</i>	Anticâncer
Diosgenona	<i>S. nudum</i>	Hepatoprotetiva
Nuatigenosideo	<i>S. sisymbriifolium</i>	Anti-hipertensiva
Dioscina	<i>S. indicum</i> <i>S. melongena</i>	Antimelanogênica
Saponina SC-1, SC-2, SC-3, SC-4, SC-5, SC-6	<i>S. chrysotrichum</i>	Antifúngica
Indiosida H	<i>S. violaceum</i>	Anticâncer
Alcaloides esteroidais		
Solasonina	<i>S. americanum</i> <i>S. amygdalifolium</i> <i>S. asperum</i> <i>S. crinitum</i> <i>S. erianthum</i> <i>S. khasianum</i> <i>S. lycocarpum</i>	Leishmanicida, Antidiabética, Esquistossomicida

Composto	Fonte vegetal	Propriedades biológicas
Solamargina	<i>S. abutiloides</i> <i>S. aculeastrum</i> <i>S. asperum</i> <i>S. buddleifolium</i> <i>S. americanum</i> <i>S. anguivi</i> <i>S. crinitum</i> <i>S. erianthum</i>	Leishmanicida, Antidiabética, Esquistossomicida, Tripanocida
Khasianina	<i>S. incanum</i> <i>S. khasianum</i> <i>S. lycocarpum</i> <i>S. khasianum</i> <i>S. nigrum</i> <i>S. surattense</i> <i>S. xanthocarpum</i>	Anticâncer Antibactericida, Moluscicida
Solasodina	<i>S. aculeastrum</i> <i>S. surattense</i> <i>S. torvum</i>	Anticâncer Depressor SNC Anti-inflamatória
Solanopubamina	<i>S. schimperianum</i>	Antifúngica
16-Dehidropregmolona	<i>S. lyratum</i>	Anticâncer
Quercetina	<i>S. anguivi</i>	Anticâncer
Kaempferol 8-C- β -d-galactosida	<i>S. elaeagnifolium</i>	Hepatoprotetor
Lignanais		
Canabisina D	<i>S. melongena</i>	Anti-inflamatória
Melongenamida B	<i>S. melongena</i>	Anti-inflamatória
Composto		
Melongenamida C	<i>S. melongena</i>	Anti-inflamatória
Grossamida	<i>S. melongena</i>	Anti-inflamatória
Outros alcaloides		
<i>N-trans</i> -Feruloiltiramina	<i>S. buddleifolium</i> <i>S. cathayanum</i> <i>S. indicum</i> <i>S. melongena</i> <i>S. lyratum</i>	Antidiabética
Scopolina	<i>S. cathayanum</i> <i>S. lyratum</i> <i>S. septemlobum</i>	Anticâncer
Esteróis		
Tumacosida A e B	<i>S. nudum</i>	Antiplasmódica
Carpesterol	<i>S. capsicoides</i> <i>S. sisymbriifolium</i>	Anticâncer Antifúngica
Cumarinas e cumestanas		
Cumestrol	<i>S. lyratum</i>	Anti-inflamatória
Indicumina A e B	<i>S. indicum</i>	Anti-hepatite B
Ácidos graxos e ésteres		
Ácido Linoleico	<i>S. aculeastrum</i> <i>S. glabratum</i>	Antibacteriana Antioxidante
Ácido Oleico	<i>S. glabratum</i>	Antimicrobiana

Composto	Fonte vegetal	Propriedades biológicas
Compostos fenólicos		
Ácido Galico	<i>S. anguvi</i> <i>S. cernuum</i> <i>S. spirale</i> <i>S. surattense</i>	Anticâncer
Ácido Clorogênico	<i>S. anguvi</i> <i>S. guaraniticum</i> <i>S. incanum</i> <i>S. lycocarpum</i> <i>S. lyratum</i> <i>S. melongena</i> <i>S. surattense</i>	Anticâncer
Outros		
Rutina	<i>S. anguvi</i> <i>S. melongena</i> <i>S. muricatum</i> <i>S. nigrum</i> <i>S. spirales</i> <i>S. lyratum</i>	Anticâncer
Puerariafurana	<i>S. lyratum</i>	Anti-inflamatória
Solaliratina B	<i>S. lyratum</i>	Anti-inflamatória
Zizybeosideo I	<i>S. lycopersicum</i>	Anti-inflamatória

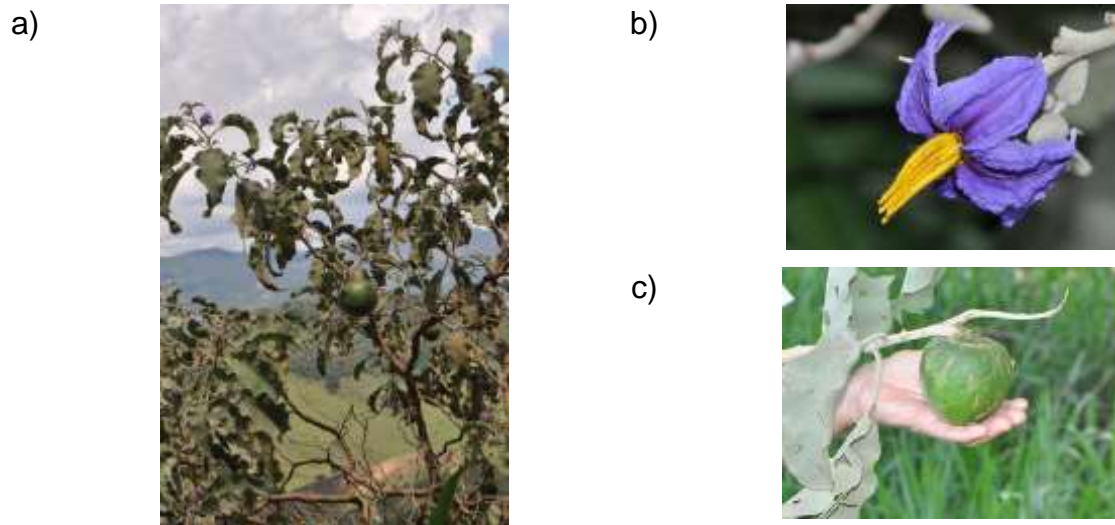
Fonte: KAUNDA; ZHANG, 2019.

Dentre as espécies brasileiras de *Solanum*, destaca-se a *Solanum lycocarpum*. *S. lycocarpum* A. St. Hill é um arbusto encontrado principalmente no Cerrado brasileiro com significativas atividades farmacológicas (OLIVEIRA et al., 2012).

1.2.1.1 *Solanum lycocarpum*

Solanum lycocarpum, cujo nome popular é lobeira ou fruta do lobo, mas que também pode ter outras denominações como jurubebão, jurubeba-de-boi, baba-de-boi, capoeira-branca, berinjela-do-mato e loba, é uma árvore de pequeno porte, de 3 a 5 m de altura, com copa redonda e aberta, com grandes espinhos nos galhos, folhas simples e grandes, frutas globulares de cor verde, polpa carnuda, medindo de 8 a 13 cm de diâmetro (Figura 3), podendo crescer em solos pobres e em condições desfavoráveis, sendo resistente ao corte e à queima (CLERICI et al., 2011).

Figura 3 – *Solanum lycocarpum* (a) folhas, (b) flores e (c) frutos.



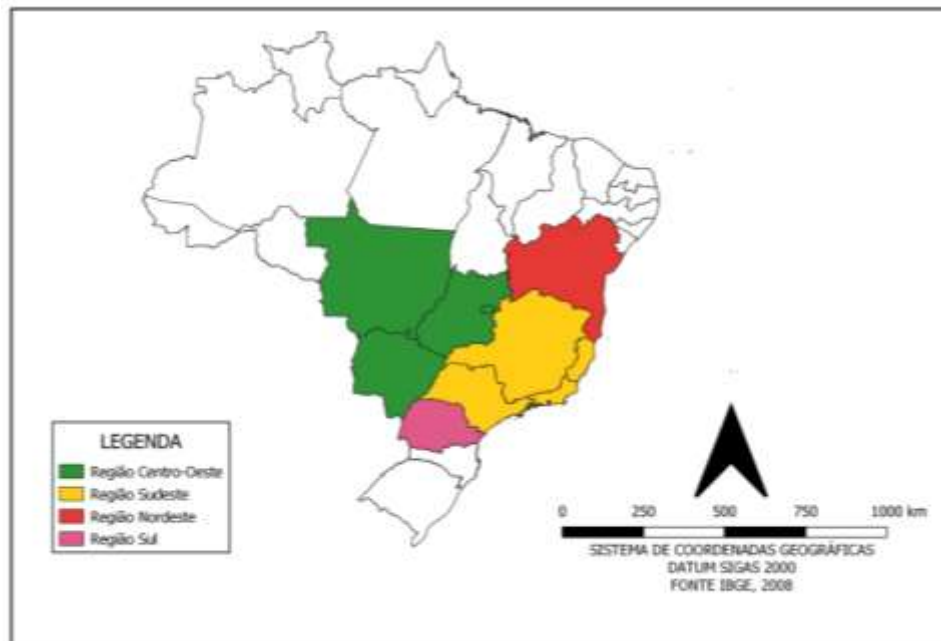
Fonte: PBI *Solanum* PROJECT (2011).

Importante para o equilíbrio do ecossistema, por servir como alimento ao lobo-guará e de outros mamíferos do cerrado (CHAVES FILHO; STACCIARINI-SERAPHIN, 2001), a espécie *S. lycocarpum* pode desaparecer.

A lobeira e o lobo guará tem uma relação de sobrevivência, pois o seu fruto é um dos seus favoritos e suas fezes carregam suas sementes, possibilitando perpetuação dessa planta. No entanto, esse animal encontra-se ameaçado de extinção, devido ao aumento de áreas de plantio e de áreas urbanas, assim como a contração de doenças ao entrar em contato com animais domésticos (RAMOS; SILVA; PASCARELLI, 2018).

A lobeira tem seus domínios geográficos predominantemente no Cerrado e na Mata Atlântica, espalhando-se pelo Brasil de acordo com a Figura 4.

Figura 4 – Estados brasileiros com ocorrência de *Solanum lycocarpum* confirmada



Fonte: Flora do Brasil 2020 em construção (2019)

Na composição de frutos e de folhas estão os glicoalcaloides e polifenóis, utilizados em diversos fármacos e em alimentos. Os glicoalcaloides mais expressivos são solasonina **(2)** e solamargina **(3)**.

Estudos fitoquímicos de raízes e de folhas de *S. lycocarpum* verificaram a presença de terpenoides, compostos fenólicos, taninos e flavonoides, além de alcaloides (MATIAS et al., 2016).

As infusões de flores e de folhas de lobeira são popularmente utilizadas para tratamento de bronquites, úlceras, vermes, influenza, sífilis, apresentando efeito calmante, sedativo, diurético, antiespasmódico e antiepilético, enquanto o polvilho dos frutos tem efeito positivo no tratamento de diabetes (MARTINS et al.; 2015).

As folhas da lobeira são utilizadas em chás contra infecções urinárias e renais, hemorroidas, epilepsia e espasmos (GRANDI, 2014).

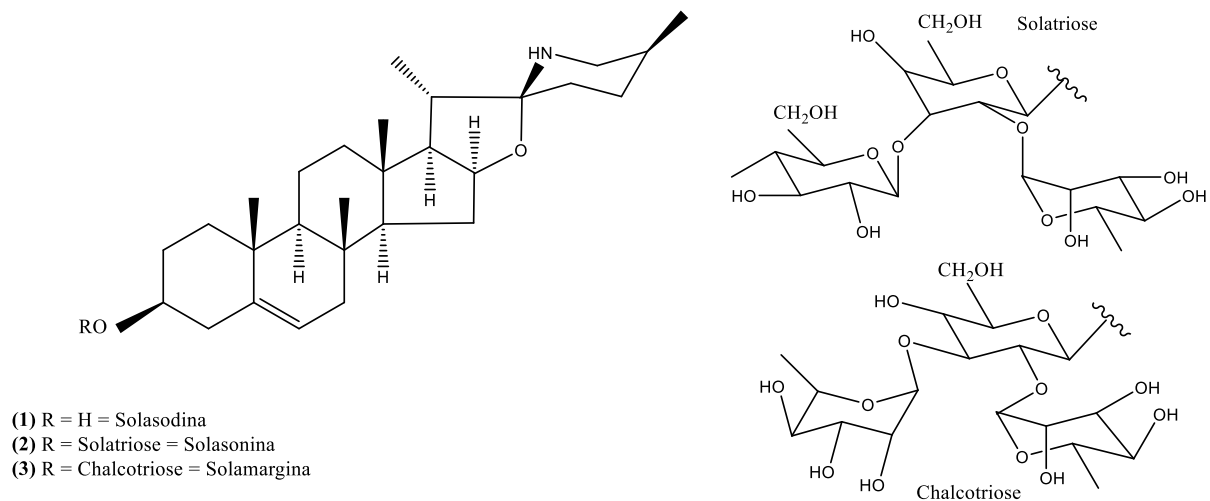
Tanto as folhas quanto a cultura de células de *S. lycocarpum* foram pouco exploradas em relação às suas atividades biológicas e químicas. Desse modo, os glicoalcaloides esteroidais, que possuem atividades anti-inflamatórias e anticâncer, e as lignanamidas, acumuladas em células de folhas dessa espécie e que possuem ação neuroquímica de grande interesse farmacológico, e as amidas de ácido hidroxicinâmico, excelentes antioxidantes, são o foco deste trabalho.

1.3 GLICOALCALOIDES ESTEROIDAIS EM *S. lycocarpum*

Glicoalcaloides esteroidais compõem-se por uma parte glicônica unida a outra parte aglicônica (com um átomo de nitrogênio no heterocíclico), amplamente encontrados nas famílias Solanaceae e Liliaceae, dos quais dentre os mais abundantes estão a solasonina e solamargina (SUN et al., 2010).

Dessas espécies, estão presentes, em *S. lycocarpum*, a solasonina **(3)** e solamargina **(3)**. A fração aglicona desses glicoalcaloides esteroidais é a solasodina **(1)**, e a porção glicosídica é que diferencia as duas moléculas, sendo a solatriose para a solasonina e a chacotriose para a solamargina (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura da solasonina e solamargina.



Fonte: Tioosi et al. (2014).

Esses glicoalcaloides estão presentes em mais de cem espécies de *Solanum* e são de grande interesse devido às suas atividades antiparasitária, antifúngica, antidiabética, contra herpes, antiviral, imunomodulatória e anticâncer (AL SINANI; ELTAYEB, 2017).

O consumo de frutos de *Solanum aculeastrum* Dunal, ricos em solamargina e solasonina, por pacientes com câncer como tratamento alternativo, possibilitou a investigação da citotoxicidade não seletiva e também a inibição da glicoproteína P pela solamargina (BURGER et al.; 2018).

Solasodina é base da composição de um fitoterápico de uso tópico: Curaderm^{BEC5}, utilizado no tratamento de câncer de pele não-melanoma, cujos resultados são muito benéficos. Estudos do uso desse fitoterápico relatam um

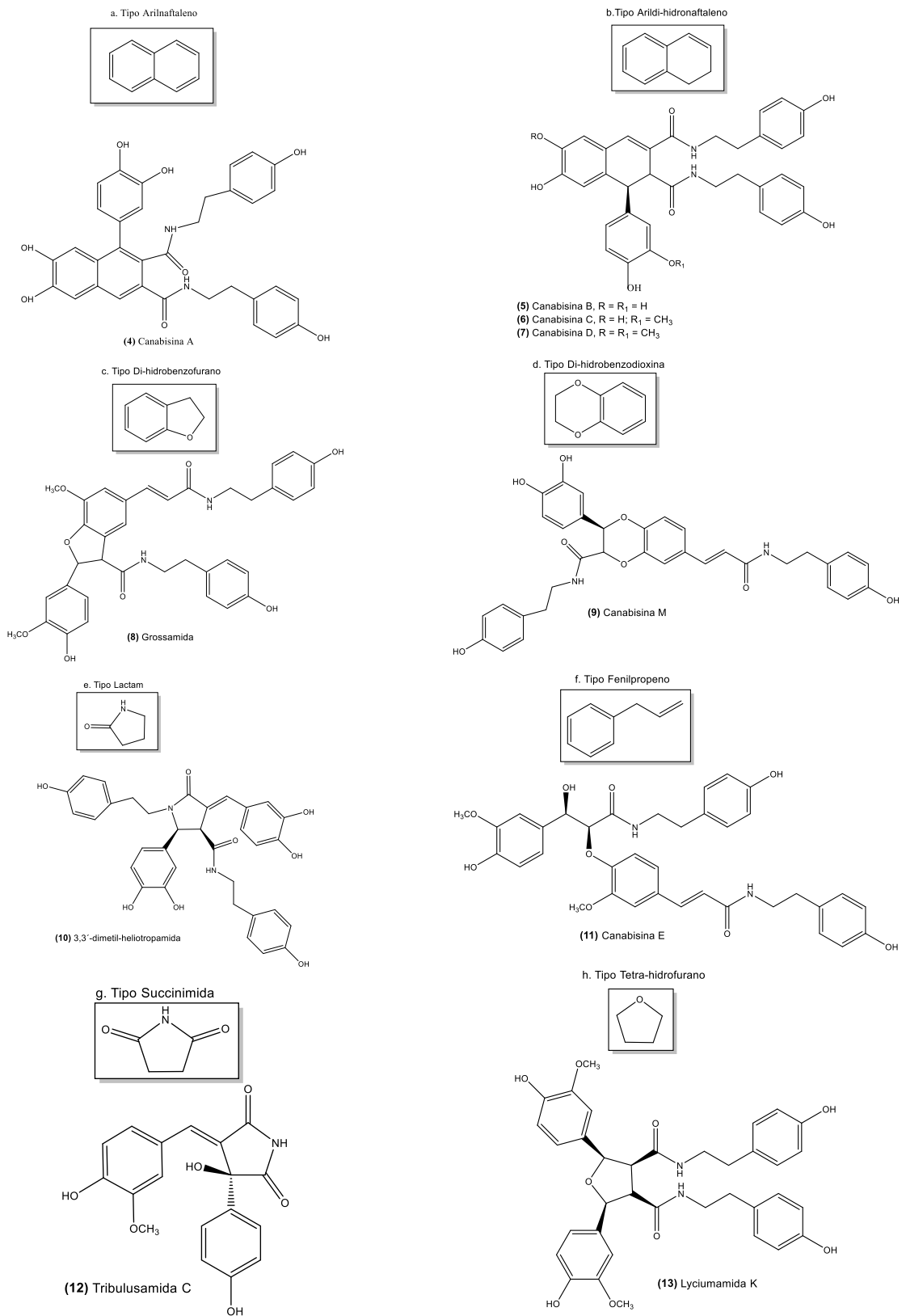
aumento da região lesionada, devido a interação medicamento/células tumorais, seguida de redução da região até eliminação completa do carcinoma basocelular (CHAM; CHAM, 2015).

Aumentar a produção desses glicoalcaloides em células vegetais, possibilitaria maior rapidez para a produção de fitoterápicos, em estudos e presentes no mercado.

1.4 LIGNANAMIDAS

Pertencente à classe das lignanas, as lignanamidas contêm grupos amida, presente em plantas, principalmente nas famílias Cannabaceae e Solanaceae. Mais de 80 lignanamidas já foram identificadas em aproximadamente 26 espécies de plantas e foram divididas em oito subgrupos (Figura 6): (a) arilnaftaleno, (b) arildi-hidronaftaleno, (c) di-hidrobenzofurano, (c) di-hidrobenzodioxina, (e) lactam, (f) fenilpropeno, (g) succinimida e (h) tetra-hidrofurano, com alguns de seus respectivos representantes, canabisina A **(4)**, canabisina B **(5)** C **(6)** e D **(7)**, grossamida **(8)**, canabisina M **(9)**, 3,3'-dimetil-heliotropamida **(10)**, canabisina E **(11)**, tribulusamida C **(12)**, lyciumamida K **(13)** (LEONARD et al., 2020).

Figura 6 – Classificação das lignanamidas e suas estruturas químicas



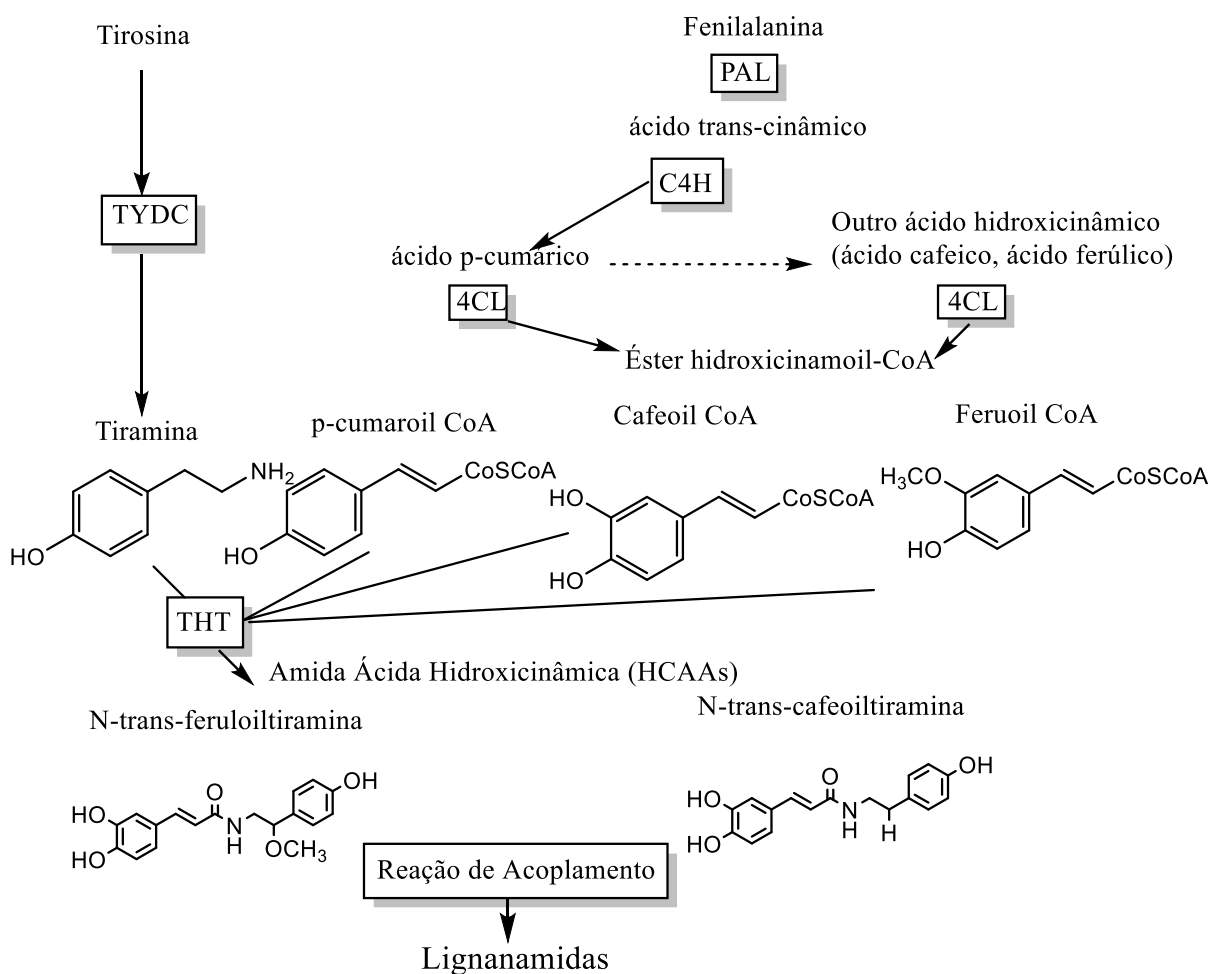
Fonte: LEONARD et al. (2020)

Estudos iniciais das estruturas de lignanamidas sugeriram que essas moléculas fossem obtidas pela condensação dos precursores tiramina e ésteres-

CoA cumárico, cafeico e ácido coniférico, que posteriormente passa por um acoplamento oxidativo, catalisado por uma proteína dirigente, já descrita em biossíntese de lignanas (ANDRE; HAUSMAN, GUERRIERO, 2016).

O mecanismo de biossíntese das lignanamidas ainda não está concluído, no entanto, pesquisas recentes relatam que as lignanamidas são originárias da tirosina e da via do fenilpropanoide, iniciada pela ação fenilalanina amônia-liase. A proposta da biossíntese das lignanamidas é apresentada na Figura 7 (LEONARD et al., 2020).

Figura 7 – Proposta de rota biossintética de lignanamidas em plantas

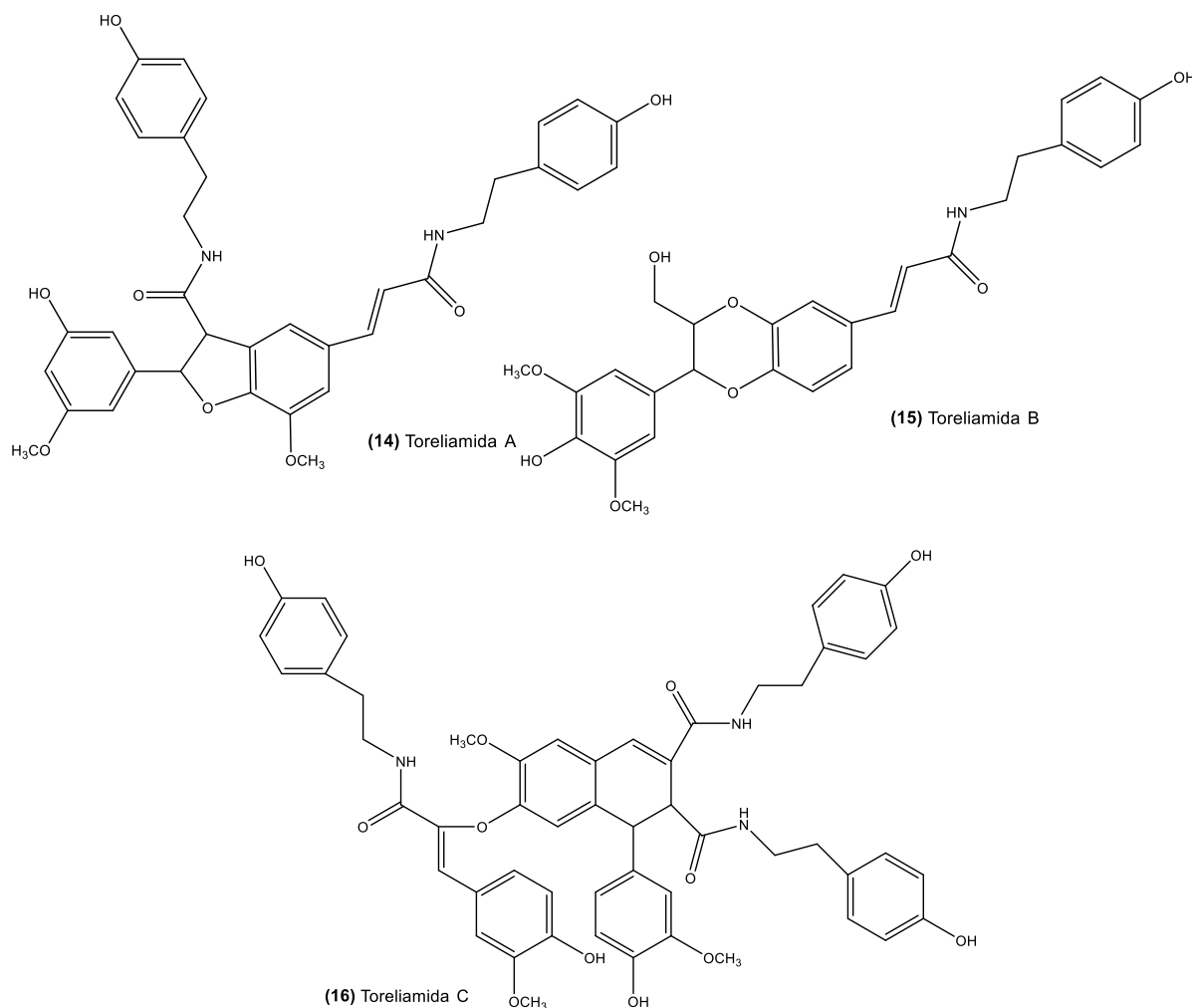


Fonte: LEONARD et al. (2020)

Estudos biotecnológicos desse grupo, restrito na flora, ainda são deficitários, mas merecem destaque por possuírem também atividades biológicas relevantes (CARDULLO et al., 2016). Além de atividade neuroprotetora, outras atividades expressivas desse grupo de compostos são antitumoral e anti-inflamatória (ZHANG et al., 2016).

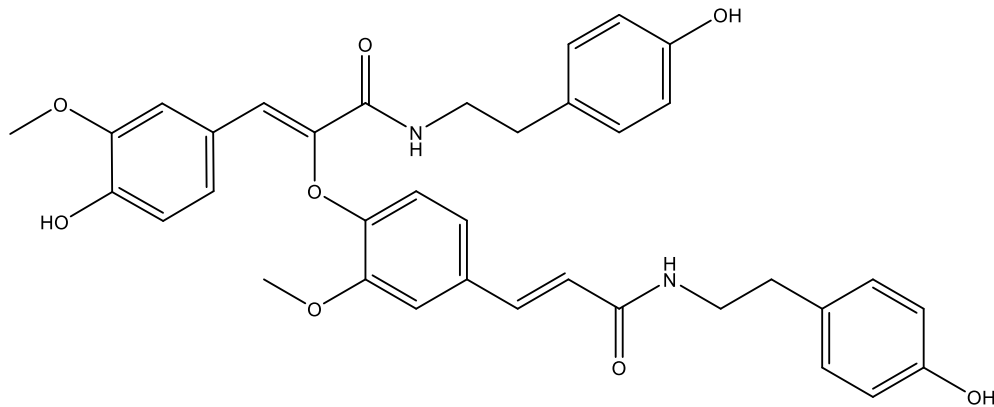
Estudos sobre lignanamidas foram realizados em plantas da tradicional na medicina Tailandesa, como a *Mitrephora thorelii*, da família Annonaceae, a qual também apresentou lignanamidas denominadas toreliamidas A **(14)**, B **(15)** e C **(16)** (Figura 8), obtidas como um pó colorido e amorfo e canabisina F **(17)**, e G, cujas principais atividades biológicas são anticâncer (GE; TANG; YE, 2008).

Figura 8 – Fórmula estrutural das Toremiamidas A, B e C



Essas lignanamidas anteriormente citadas, toreliamida A **(14)** e canabisina F **(17)**, (Figura 9) também foram encontradas em outra espécie asiática, *Chloranthus angustifolius* Oliv., da família Chloranthaceae, usada na medicina popular para tratamento de furúnculos, micose e tumores (LIU et al.; 2015).

Figura 9 – Fórmula estrutural da lignanamida canabisina F (17)



Fonte: LIU et al. (2015)

Na família Solanaceae, pode-se destacar a presença de sete lignanamidas e uma neolignanamida nas raízes de *Lycium chinense*. Na medicina tradicional chinesa, essas raízes são utilizadas no tratamento de pneumonia, tosse, como antipirético, anti-hipertensivo, para abaixar a glicose e os níveis lipídicos, além de ação anti-inflamatória (ZHANG et al., 2013). A atividade anti-hiperlipidêmica de lignanamidas presentes em suas raízes também foi comprovada por Chen et al (2017).

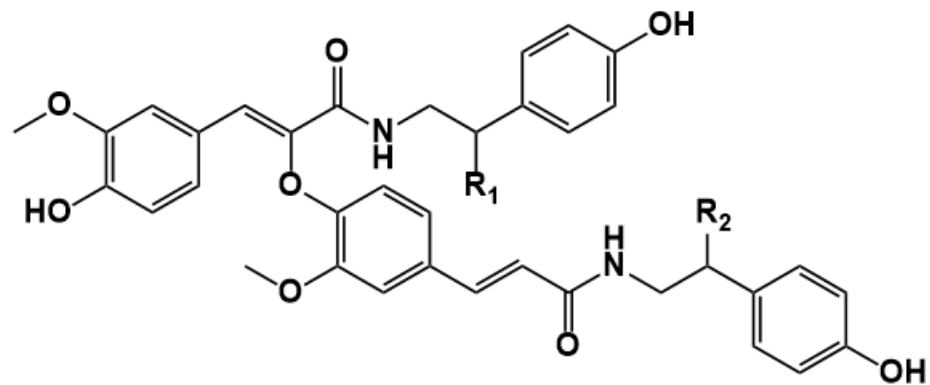
1.4.1 Lignanamidias Em Espécies *Solanum*

Apesar de serem produtos naturais pouco investigados em plantas medicinais, as lignanamidas já foram detectadas em espécies *Solanum*, como *S. nigrum* L, conhecida como erva moura, e *S. melongena* L, berinjela, muito empregada na alimentação.

O extrato bruto de *Solanum melongena* tem propriedades fitofarmacológicas relevantes, como analgésica, anti-inflamatória, promotora de circulação sanguínea, hipnótica e sedativa. Em suas raízes, encontraram-se 10 lignanamidas, das quais duas apresentaram inibições da produção de óxido nítrico (SUN et al., 2014).

Algumas de suas lignanamidas estão representadas na Figura 10.

Figura 10 – Algumas lignanamidas presentes em raízes de *S. melongena*: melongenamida E, melongenamida F, melongenamida G



(21) melongenamida E $R_1 = \text{OH}$

(22) melongenamida F $R_1 = \text{OH}$

(23) melongenamida G $R_1 = \text{OCH}_3$

$R_2 = \text{OH}$

$R_2 = \text{OCH}_3$

$R_2 = \text{OH}$

Fonte: YANG et al., 2019.

Esse metabólito foi encontrado em representantes da família Solanaceae, como em raízes de berinjela (*Solanum melongena* L.) (YOSHIHARA et al., 1981).

Grossamida (8) é uma butiramida de dímeros de FerA de neolignanida benzofurana e que apresenta toxicidade em cultura de células de câncer de próstata (MAGOULAS; PAPAIOANNOU, 2014).

Em atenção aos seus efeitos anti-inflamatórios, investigou-se a ação da grossamida como bioativo anti-neuroinflamatório em células micróglia BV2, induzidas por lipopolissacarídeo. O resultado foi satisfatório, sendo que a grossamida inibiu de maneira efetiva a secreção de mediadores pró-inflamatórios (LUO et al., 2017).

Além de efeitos inseticidas e anti-inflamatórios, a família de lignanamidas tem importantes ações antioxidantes e de inibição da acetilcolinesterase (AChE) (YAN et al., 2015).

As inibições das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase são de demasiada importância para o tratamento da doença de Alzheimer. A inibição dessas enzimas é o princípio dos fármacos presentes no mercado, cujo objetivo é a melhora da independência e da qualidade de vida dos doentes, já que eles apresentam um comprometimento cognitivo de memória, linguagem, atenção e orientação. Com o envelhecimento demográfico, as doenças degenerativas têm alta incidência, atingindo aproximadamente 8,5% dos idosos da América Latina (MORAES; LUCCHETTI; LUCCHETTI, 2018).

Em folhas de *Solanum nigrum*, análises fitoquímicas constataram a presença de seis lignanamidas (incluindo misturas racêmicas destes compostos), das quais se destacou a canabisina F (**17**), com atividades biológicas de grande importância, como inseticida, anti-inflamatória e neuroprotetora. Devido ao grande interesse em prevenir ou tratar distúrbios neurodegenerativos, investigações quanto à sua ação neuroprotetora desses compostos foram realizadas contra lesões de MPP⁺, uma das neurotoxinas responsáveis pela doença de Parkinson, em células SH-SY5Y, advindas de neurônios, cujo resultado satisfatório se apresentou apenas para uma lignanamida (LI et al., 2019).

As atividades biológicas de lignanamidas das espécies *Solanum* apresentam grande relevância para a indústria farmacêutica, principalmente a ação neuroprotetora. Novos medicamentos para controle de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer que é uma das doenças responsáveis em aproximadamente 70% do número de casos de demência mundial e acomete cerca de 24 milhões de pessoas no mundo, são cada vez mais necessários (SHARMA, 2019).

Assim, estudos sobre esses metabólitos devem ser promissores para a área de produtos naturais de plantas, principalmente, para a busca de novos fármacos.

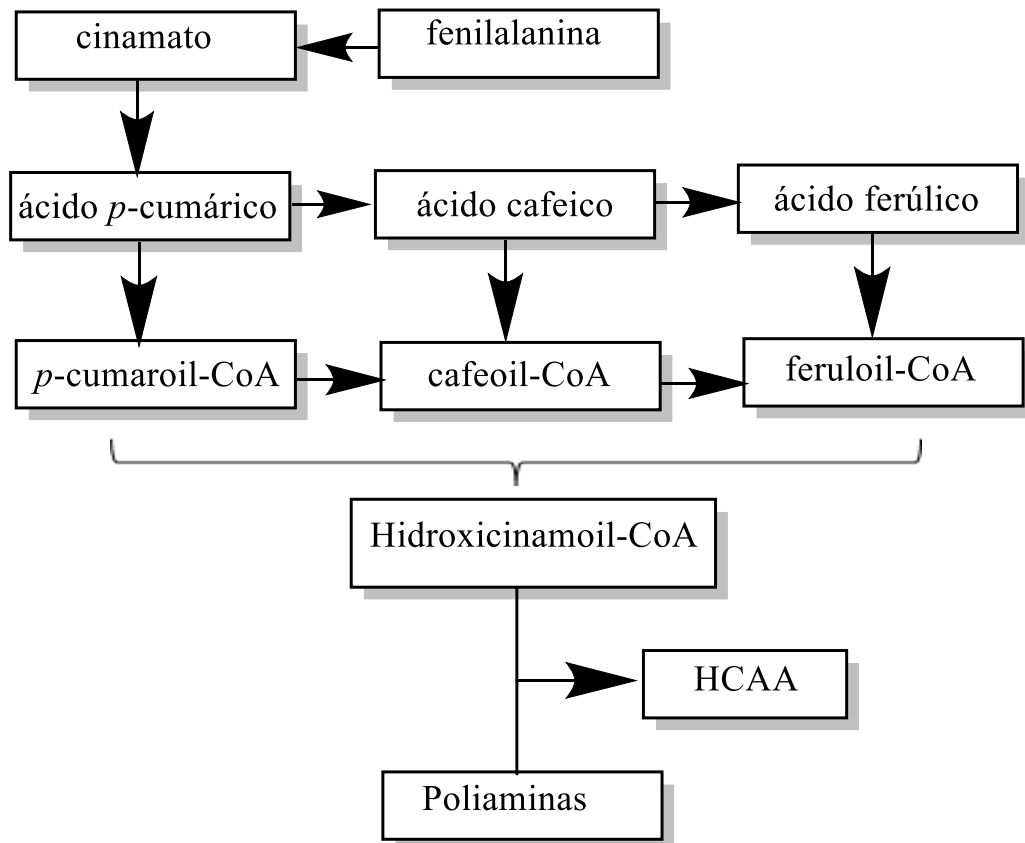
1.5 AMIDAS DE ÁCIDO HIDROXICINÂMICO

Amidas de ácido hidroxicinâmico, mais conhecidas na literatura como HCAAs, são derivados de aril monoaminas ou poliaminas alifáticas que são conjugadas a ácidos fenólicos, principalmente os ácidos hidroxicinâmicos (HCAs). São metabólitos secundários oriundos da via fenilpropanoide, cuja diversidade química variam em plantas superiores. Foram encontradas 17 HCAAs em raízes de *Solanum shimperianum* e 14 HCAAs em raízes e folhas de *Lycium barbarum*, ambas da família Solanaceae (LI et al., 2018).

Peng e colaboradores (2016) destacaram as HCAAs por suas relevantes atividades biológicas, como anti-hipertensiva, anticarcinogênica e antimicrobiana, assim como descreveram sua via biossintética. A biossíntese ocorre com a conversão de fenilalanina em trans-cinamato, que após a hidroxilação, forma o ácido p-cumárico, seguindo para conversão em outros hidroxicinamatos, tais como os ácidos ferúlico, cafeico e sinápico, que servem de via de ramificação para outras biossínteses de HCAA, flavoide e lignina. A etapa final da biossíntese dos HCAAs é

a condensação de poliaminas (espermidina, erpermina e putrescina) com tioésteres de hidroxicinamoil-CoA (Figura 11).

Figura 11 – Via de biossíntese de HCAA em plantas



Fonte: Peng et al., 2016.

Esses compostos estão relacionados com o sistema de defesa da planta. Em folhas de *Solanum dulcamara*, houve um aumento na produção de duas fenolamidas: cafeoil-putrescina e outro metabólito relacionado, devido à exposição de lesmas cinza do campo (CALF et al., 2020).

Essas substâncias também podem ser denominadas como fenolamidas ou fenilamidas (VALETTE et al., 2020).

As fenolamidas cumarioil e cafeoil putrescina podem ser encontradas na espécie *Nicotiana*. Mais de uma dezena desses compostos foram encontrados nas raízes do arroz, sendo que a cafeoil-putrescina foi revelada em menor quantidade (DONG et al., 2015).

Estudos de HCAAs são recentes em espécies de *Solanum*, mesmo tendo sido comprovado que a família Solanaceae biossintetiza tais compostos. Os compostos n-cafeoil-putrescina e n-feruloil-putrescina foram identificados em 14 espécies de

Solanum. Na espécie *Solanum schimperianum* foram isoladas pela primeira vez 16 HCAAs, nas quais encontram-se as amidas de ácido hidroxicinâmico acima citadas (VOYNIKOV et al., 2016).

Análises em berinjelas frescas (*S. melongena*) obtiveram-se diversos compostos fenólicos, apresentando-se em grande proporção a amida de ácido hidroxicinâmico, n-cafeoil putrescina, além de outros ácidos derivados do cafeoil (HORINCAR et al., 2020).

Os compostos fenólicos da berinjela protegem contra o desenvolvimento de câncer, hipertensão, retenção de líquidos e doenças cardiovasculares. Suas atividades antioxidantes são atribuídos aos ácidos 5-cafeoilquínico, 3-acetil-5-cafeoilquínico e também ao HCAA, N-cafeoilputrescina (ANTONIOUS et al., 2020).

Devido às importantes atividades biológicas em espécies de *Solanum*, como antioxidante, anticarcinogênica e neuroprotetora, o estudo de estratégias biotecnológicas para produção de metabólitos de interesse em culturas celulares de *S. lycocarpum* podem contribuir para a melhoria de produção desses metabólitos e facilitar o estudo para futuros fitofármacos.

2 JUSTIFICATIVA

A espécie *Solanum lycocarpum*, rica em glicoalcaloides esteroidais e compostos fenólicos, mantém uma relação de sobrevivência com o lobo guará. O animal alimenta-se, preferencialmente, de seus frutos e dispersa suas sementes em grandes distâncias, por meio de suas fezes. No entanto, o lobo guará está ameaçado de extinção, fato que pode proporcionar também o desaparecimento dessa espécie de planta.

O desaparecimento da lobeira comprometeria a produção de diversos metabólitos secundários de importantes atividades farmacológicas, tal como a solasodina, glicoalcaloide esteroideal presente em seus frutos, que é base para o fitoterápico Curaderm^{BEC5}, utilizado para o tratamento de câncer de pele. Além dos glicoalcaloides, comprometeria também a produção de lignanamidas inibidoras de acetilcolinesterase, que são possíveis aspirantes a novos medicamentos neuroprotetores, principalmente contra a doença de Alzheimer, que acomete milhões de pessoas em todo o mundo, e de HCAAs, com importantes atividades antioxidantes, como proteção do sistema cardiovascular e prevenção da hipertensão.

Uma estratégia biotecnológica para a obtenção de metabólitos de interesse de *S. lycocarpum* sem ameaçar essa espécie de extinção é a cultura de células vegetais. Esse tipo de cultura permite a produção contínua e monitorada de compostos bioativos naturais de plantas, com baixo risco de contaminação, produção em um curto intervalo de tempo e possibilitando, inclusive, secretar tais substâncias para o meio de cultura, permitindo o reaproveitamento das células vegetais em suspensão. Além disso, nas culturas celulares pode-se promover o aumento da produção de metabólitos utilizando técnicas de elicitação, biótica ou abiótica, cuja vantagem é o baixo custo e aumento de produção em um curto período.

Diante do exposto, justifica-se estabelecer procedimentos para obtenção de culturas celulares de *S. lycocarpum*, assim como investigar o perfil químico para conhecimento de seus metabólitos secundários e promover o aumento de sua produção utilizando a técnica de elicitação, a fim de que a cultura celular de lobeira possa representar um avanço ao desenvolvimento de produtos inovadores de elevado interesse para a indústria farmacêutica.

3 HIPÓTESE

As culturas celulares em suspensão de *S. lycocarpum* A. St. Hill obtidas de explante de folhas produzem glicoalcaloides esteroidais, lignanamidas e amidas de ácido hidroxicinâmico.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho consistiu em estabelecer bioprocessos para a produção de metabólitos secundários de *S. lycocarpum* com propriedades farmacológicas relevantes e utilização de estratégias para a estimulação do rendimento dessas moléculas produzidas em cultura *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As principais estratégias adotadas para potencializar a produção de bioativos neste trabalho foram:

1. Estabelecer processo biotecnológico para produção de biomassa acumuladora de metabólitos secundários com propriedades farmacológicas importantes;
2. Investigar perfil químico de metabólitos bioativos de interesse, glicoalcaloides esteroidais, lignanamidas e amidas de ácido hidroxicinâmico, acumulados em culturas de células;
3. Adicionar elicitores para incrementar a produção de metabólitos alvo em cultura de células em suspensão de *S. lycocarpum*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE *Solanum lycocarpum* PARA PRODUÇÃO DE CALOS

Para introdução do explante *in vitro*, foi realizado o procedimento de assepsia das folhas de *Solanum lycocarpum* A. St. Hill, que foram coletadas na coleção de plantas medicinais da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto. Os exemplares estão depositados no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), sob o número HPMU-

Inicialmente, as folhas foram lavadas em água corrente para remoção de impurezas como partículas sólidas e insetos fixos no tecido da folha. Com auxílio de bisturi, explantes foram cortados da folha em quadrados de aproximadamente um centímetro de lado.

O protocolo de desinfecção e introdução *in vitro* foi adaptado de Pasqualini e colaboradores (2019).

Introduziram-se os explantes em frasco com solução de 1% de Cercobin, mantidos por agitação durante 3h. Retirou-se a solução de Cercobin e acrescentou-se solução com 10 mg/L de ampicilina e 10 mg/L de cloranfenicol, em que também foram mantidas sob agitação de 80 rpm por 24h, Essa solução foi retirada e imergiram-se os explantes em solução de 0,5% de hipoclorito de cálcio durante 30 min. Após esse procedimento, os explantes de folhas foram lavados com água estéril e inseridos no meio de cultura.

O meio de cultura foi preparado com 100 mL de MS concentrado, suplementado com 3% de sacarose (Synth), 2 mg/L de ácido naftalenoacético (ANA), da marca Sigma. Utilizou-se água estéril para completar o volume a 1 L, aferiu-se o pH da solução para 6,0 e adicionou-se 0,25% de Gellax (Gellan Gum). A solução de meio foi aquecida até completa dissolução do Gellax. Após o meio esfriar, adicionaram-se aproximadamente 20 mL de meio de cultura em frascos que foram esterilizados em autoclave (101°C) por 20 minutos. Esses frascos com meio de cultura, após o resfriamento, eram utilizados para a formação e para a propagação de calos.

As culturas com explantes foram mantidas no escuro por 60 dias, a uma temperatura de 25°C ± 2°C. Transferiram-se os calos formados para novos frascos

com mesmo meio de cultura. As células de calos da lobeira foram mantidas em fotoperíodos 16/8 h a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em meio MS sólido, e os calos foram repicados a cada 30 dias.

5.1.1 Estabelecimento De Suspensões Celulares De *S. lycocarpum*

Os meios de cultura para suspensão de células têm a mesma composição que o meio preparado no item 5.1, exceto o Gellex.

Para o preparo do inóculo, uma colônia de aproximadamente 12g de massa fresca de calos do estoque foi retirada do meio sólido e adicionada em um frasco Erlenmeyer (volume total de 250 mL e com um volume útil de 100 mL) contendo o meio MS líquido, suplementado com os compostos descritos anteriormente. A adição foi realizada em capela de fluxo laminar em condições assépticas. Os Erlenmeyers foram tampados com papel alumínio e lacrados com filme plástico.

Após essa etapa, os frascos foram colocados em um incubador rotativo (shaker) a 80 rpm, a fim de que as células possam estar homogeneamente em contato com o meio de cultura, e $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 30 dias, período no qual as culturas foram repicadas, a fim de que se obtivesse a propagação de células.

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *S. lycocarpum*

As células em suspensão foram homogeneizadas (esse procedimento minimiza os erros experimentais e padroniza os cultivos) e subcultivadas duas vezes, a cada 30 dias. A homogeneização deu-se misturando vários Erlenmeyers com células, além de meio de cultura em um béquer de 2 L. A quantidade de 25 mL de meio de cultura + células foi ressuspensa em 50 mL de meio fresco.

O experimento foi conduzido em triplicata com duas repetições ($n=6$), ou seja, foram retirados 2 frascos por vez, cujo procedimento foi repetido por mais duas vezes, a fim de minimizar erros. Este início foi contado como tempo zero. Amostras foram retiradas a cada três dias até o tempo de 21 dias (COPPEDE et al., 2014).

Cada amostra foi filtrada e as células foram colocadas em estufa (45°C) por 48h e pesadas, para então passarem pelo processo de extração.

5.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE LOBEIRA

O extrato bruto de *S. lycocarpum* foi obtido a partir de células secas em estufa (45° C) por 48h. Após secagem, a biomassa foi macerada, inserida em Erlenmeyer e etanol PA foi adicionado para extração, na proporção 1:5 em volume. A suspensão foi deixada overnight em shaker rotativo, 80 rpm, protegida de luz, a fim de se evitar a degradação de compostos fotossensíveis (NUR, 2015).

A biomassa foi filtrada em papel de filtro, a parte sólida foi descartada e a parte líquida foi rotaevaporada, obtendo-se assim o extrato seco bruto de células de *Solanum lycocarpum*.

5.4 ANÁLISE POR CLUAE q-ToF/MS PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE EM CULTURA DE CÉLULAS DE *S. lycocarpum*

O extrato bruto de lobeira foi dissolvido em metanol, 500 ppm, filtrado em filtro milipore 22 μ m.

As amostras foram analisadas em um sistema LC-6545 qToF/MS (Agilent Technologies, CA, USA1), do Instituto de Química da UFSCAR, São Carlos-SP, equipado com fonte de ionização “electrospray” (ESI) e analisador de massas “quadrupole time-of-flight”. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1x50 mm, 1.8 μ m) (Agilent), com fluxo de 0,250 mL·min⁻¹, e fase móvel contendo água (A) e metanol (B) ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi: 0 min, 15% B; 15-18 min, 100% B; 18.01 – 21 min, 15% B. O volume de injeção foi de 2 μ L, e a coluna foi mantida a 35°C. A ionização dos analitos foi realizada no modo positivo (ESI+), utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, 3.25 kV; nozzle voltage 500 V; drying gas, 10 l/min; nebulizer: 40 psi; sheath gas temp., 350°C; fragmentor: 310 V; skimmer: 65 V. O gás secante e gás nebulizador utilizado foi o nitrogênio e o argônio foi empregado como gás de colisão. A faixa de detecção foi entre 100-1000 Da. Os dados foram analisados no software Agilent MassHunter (Agilent).

5.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA E ISOLAMENTO DE METABÓLITOS DE *S. lycocarpum*

5.5.1 Análise Analítica Exploratória por CLAE-UV

Extrato etanólico bruto da suspensão de células de lobeira foi preparado na concentração de 5 mg/mL em ACN/H₂O (80:20), analisado por CLAE com detector de matriz de diodos (DAD), em injeções de 20 µL.

A análise exploratória foi executada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu®, acoplado a bombas de modelo LC-6AD Shimadzu, com controlador de sistema CBM-20A Shimadzu, desgaseificador DGU-20A, detectores de arranjo de diodos UV/VIS SPD-M20A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF Shimadzu e software Class VP.

As análises foram realizadas pelo acoplamento de uma coluna analítica Phenomenex Luna C18 de 250 mm x 4,6 mm, 5µ, ao equipamento.

A condição cromatográfica foi otimizada a partir de um sistema gradiente, usando como fase móvel água + 0,1% de ácido fórmico na bomba A e acetonitrila na bomba B, detectada sob $\lambda = 280$ nm a 25° C.

O gradiente de eluição para a fase móvel estabelecido foi: 10% a 100% de ACN de 0-35 min, 100% ACN 35-40 min, retornando à fase inicial (10% ACN 40-42 min). A taxa de fluxo foi de 1 mL/min.

5.5.2 Extração e Isolamento

As células de *S. lycocarpum* foram secas em estufa e maceradas, suspensas em etanol PA, overnight em shaker rotativo, permanecendo no escuro. O extrato foi filtrado, as células descartadas e a suspensão foi concentrada em evaporação a vácuo. Após a concentração do extrato etanólico bruto, a parte solidificada foi separada da parte líquida e ressuspensa em ACN:H₂O (5:95).

A extração em fase sólida foi realizada a partir de adaptação do método de Li e colaboradores (2017). Os compostos foram separados por cartucho SPE, Supelco – Supelclean# LC 18 SPE tube – Sigma Aldrich, matriz de sílica gel, tamanho de partículas 45 µm, tamanho dos poros 0,8 g/cm³, seguindo o protocolo: eluição do cartucho com 6 mL ACN (HPLC – J. T. Baker) (100%), aplicação de 2 mL de

amostra, sob vácuo moderado e na sequência, a coluna foi lavada com a injeção de 6 mL de ACN:H₂O (25:75), ACN:H₂O (50:50), ACN:H₂O (100:0), 10 mL de acetato de etila (HPLC J. T. Baker). As quatro amostras eluídas foram coletadas em tubos de vidro e posteriormente foram secas.

Após nova análise exploratória, a amostra retirada com ACN:H₂O (50:50) foi escolhida para isolamento de substâncias de interesse.

A amostra foi dissolvida em ACN/H₂O (50:50) na concentração de 100mg/mL, filtrada em filtro 45 µm e as coletas das substâncias foram realizadas em CLAE com detector de matriz de diodos (DAD). Também se realizaram injeções de 100 µL (aproximadamente 10 mg por injeção).

A análise por cromatografia líquida foi efetuada pelo mesmo cromatógrafo descrito no item anterior. A coluna semipreparativa usada foi Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, de 250 mm x 9,4mm, 5 µm.

No modo preparativo, a fase móvel constituiu de água (acidificada com 0,1% de ácido fórmico) na bomba A e ACN (HPLC J. T. Baker) na bomba B, no método isocrático ACN-H₂O (30:70) e fluxo de 3 mL/min. O comprimento de onda de detecção foi de 280 nm e a duração de 40 min.

5.6 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIA ISOLADA

5.6.1 Espectroscopia de RMN 1D e 2 D

A análise das substâncias por RMN, deu-se primeiramente com a solubilização das amostras em DMSO-d₆. Para garantir ajustes da homogeneidade do campo magnético e calibração dos espectros, foi adicionando vapores de TMS.

O equipamento de RMN utilizado, pertencente ao Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCAR, São Carlos-SP, foi um espectrômetro Bruker Avance III Instrument (14,1 T/600 MHz). As análises de Hidrogênio foram realizadas em 600 MHz e as análises de Carbono, em 150 MHz.

Os dados foram processados pelo *software* TopSpin 4.0.9 (Brucker BioSpin).

5.6.2 Espectrometria de Massas CLAE-MS/MS

As análises de MS e MS/MS foram realizados em HPLC-MS, Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com um desgaseificador (G1322A), bomba quaternária (G1311A), amostrador automático (G1367B), compartimento de coluna termostato (G1316A), detector de matriz de diodos (G1316A) e API™ 2000 (AB/MDS Sciex, Framingham, MA, EUA) com fonte de ionização por electrospray no modo positivo (ESI+) e analisador de massas triplo quadrupolo, no Instituto de Química da UFSCAR, São Carlos-SP.

As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Welch Materials Xtimate™ C18 (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno I.D., e 5 µm de tamanho de partícula, Edison, Shanghai, China), com fluxo de 1.0 mL min⁻¹, e fase móvel contendo água (A) e acetonitrila (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi: 0-7 min, 5% a 100% de B; 7-9 min. 100% de B, retornando as condições iniciais até 13 minutos. O volume de injeção foi de 25 µL, e a coluna foi mantida a 25°C. A ionização dos analitos foi realizada no modo positivo (ESI+), utilizando os seguintes parâmetros: curtain gas (CUR) 25; IonSpray voltage (IS) 3.0 kV; temperature (TEM) 400 °C; ion source gas 1 (GS1) 40; ion source gas 2 (GS2) 40. O gás utilizado foi nitrogênio. A faixa de detecção utilizada foi de 50 a 850 Da. O software Analyst 1.5.2 (AB/MDS Sciex, Framingham, MA, EUA) foi utilizado para a análise dos dados.

5.7 EXPERIMENTO DE ELICITAÇÃO

O experimento de elicitação foi realizado em cultura em suspensão de *S. lycocarpum* em Erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 100 mL. Para tal, utilizaram-se dois elicitores bióticos: extrato do fungo *Botryosphaeria rhodina* e metil jasmonato (MeJa) (Sigma-Aldrich J2500), em duas concentrações distintas cada um.

O extrato de fungo foi obtido a partir do micélio, o qual, após fermentação por sete dias, em meio M2 (ENG; GUTIÉRRESZ-ROJAS; FAVELATORRES, 1998) em temperatura ambiente, separou-se do meio e cultura por filtração, sendo seco em estufa a 40° C por 48 horas. Em seguida, foi macerado e ressuspendido em água destilada à concentração de 20 mg/mL (SHEI et al, 2003). Esse extrato será chamado de extrato de fungo. Foram utilizadas duas concentrações de extrato de fungo nas suspensões: 100 µg/µL (experimento de 5 dias) e 10 µg/µL (experimento de 7 dias).

Metil jasmonato foi solubilizado em etanol PA, a uma concentração de 0,05 M. Utilizou-se nas culturas em duas concentrações diferentes: 500 μ M (5 dias) e 50 μ M (7 dias).

Os controles foram suspensões de células sem adição de elicitores, sendo o controle negativo para fungo, em que foram adicionados 500 μ L de água destilada e deionizada e controle positivo para MeJa, inseridos nas culturas 100 μ L e 1 mL de etanol PA.

O experimento de elicitação iniciou-se com a homogeneização de células em suspensão, que foram ressuspensas por duas vezes, a cada 30 dias cada. Cada Erlenmeyer de 250 ml foi utilizado com 25 ml de células ressuspensas e 75 ml de meio MS novo.

Os experimentos foram divididos em quatro tratamentos:

- Controle para fungo – apenas células vegetais, meio de cultura e adição de água destilada;
- Controle para MeJa – células vegetais, meio de cultura e solvente etanol;
- Fungo – células vegetais, meio de cultura e solução de micélio de fungo;
- MeJa – células vegetais, meio de cultura e solução de metil jasmonato.

Os elicitores foram inseridos em 20 e 22 dias da cultura (NAMDEO, 2007).

No 20^o dia, foram inseridos em 12 Erlenmeyers para cada experimento: 1 ml de MeJa (concentração final 500 μ M), 500 μ L de solução de parede celular de fungo (concentração final 1 mg/ml), 1 ml de etanol PA e 500 μ L de água destilada e deionizada.

No 22^o dia, o experimento foi repetido com concentrações diferentes: 100 μ L de MeJa (concentração final 50 μ M), 50 μ L de solução de parede celular de fungo (concentração final 100 μ g/ml), 100 μ L de etanol PA e 50 μ L de água destilada e deionizada.

As amostras foram retiradas, em triplicata, para o 1^o e 2^o experimento, respectivamente, em 5 e 7 dias após elicitação. Foram secas em estufa a 40^o C por 48h. Os meios de cultura também foram secos em liofilizador para posterior análise.

A extração etanólica para todas as amostras foi realizada conforme metodologia descrita no item 5.3 e estas levadas à análise em CLUAE q-ToF/MS.

5.7.1 Análise Das Amostras Do Experimento De Elicitação Em CLUAE q-ToF/MS

Os extratos secos de todas as amostras, assim como os meios de cultura após a elicitação, foram dissolvidos em metanol a uma concentração de 250 ppm e filtrados utilizando filtro millipore de 22 μm .

As análises foram realizadas também de acordo com equipamento descrito no item 5.4.

6 RESULTADOS

6.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS DE *S. lycocarpum* IN VITRO

A obtenção de células desdiferenciadas de folhas de *S. lycocarpum* foi satisfatória, pois se obteve calos friáveis e com boa propagação, conforme Figura 12.

Figura 12 – Calos de lobeira *in vitro*



Fonte: Autora

As culturas em suspensão apresentaram poucas células agregadas, as quais se mostraram mais finas e em condições axênicas (Figura 13).

Figura 13 – Células de lobeira em suspensão

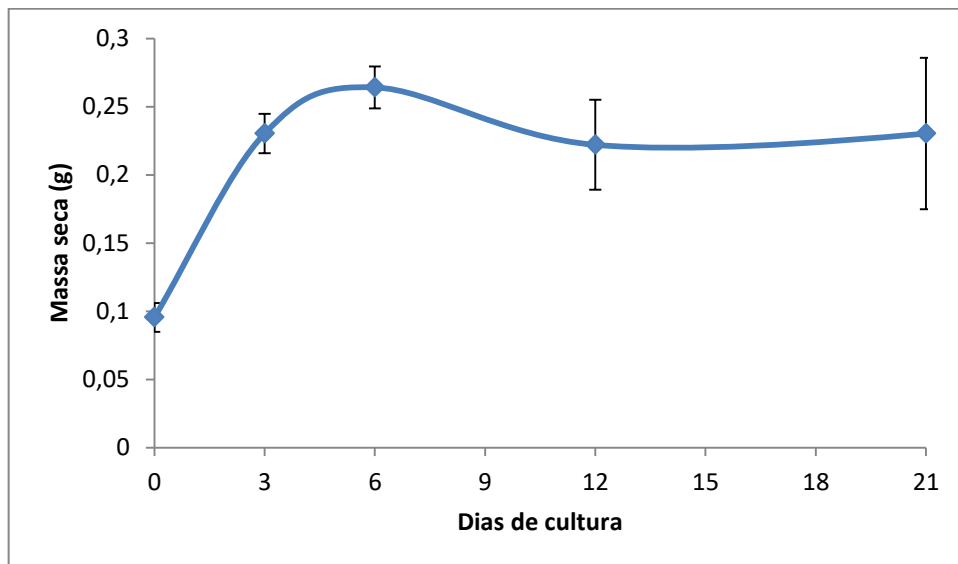


Fonte: Autora

6.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Os resultados de acúmulo de biomassa seca das amostras x período de cultivo estão apresentados na Figura 14.

Figura 144 – Curva de crescimento de células em suspensão



Fonte: Autora

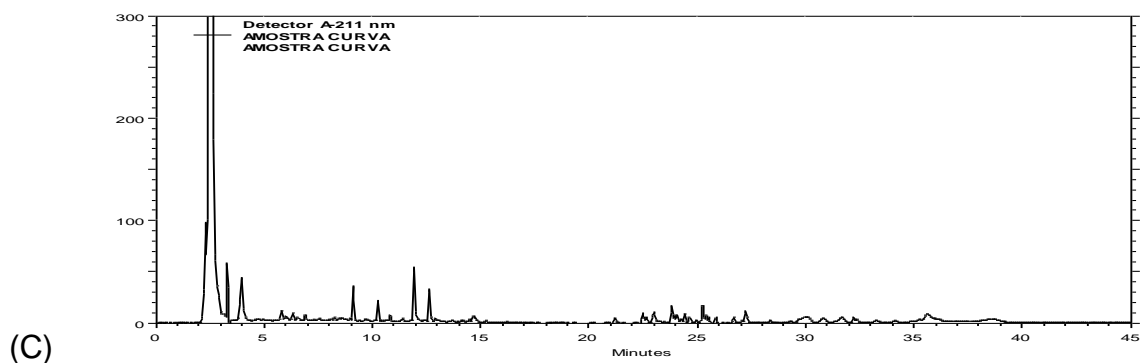
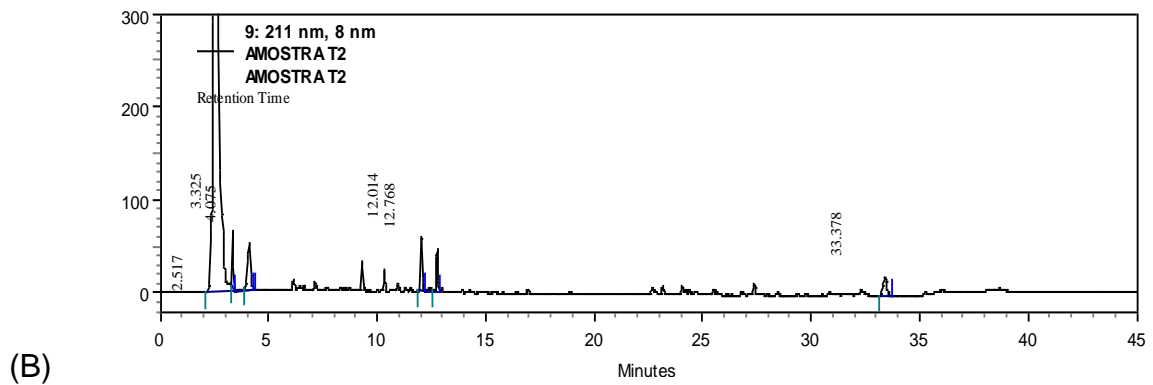
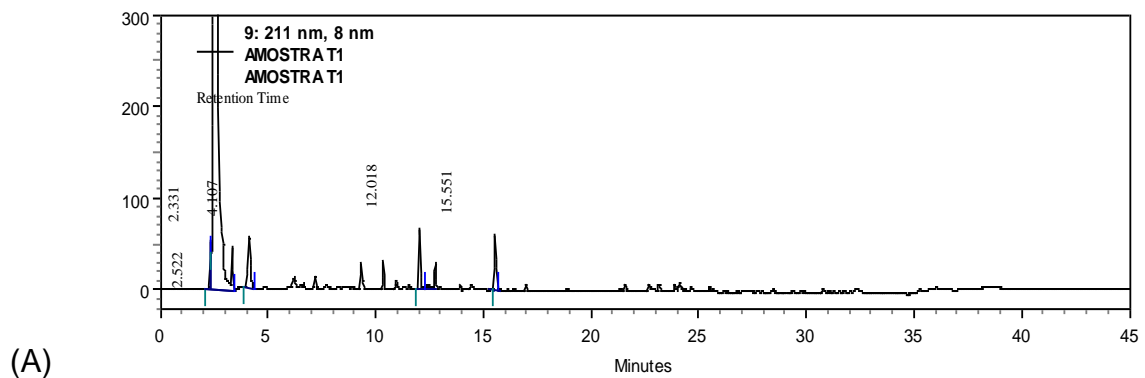
Observou-se que a maior taxa de crescimento ocorreu nos primeiros dias de cultura, cujo máximo foi atingido em 6 dias. Comparando-se a biomassa inicial com a biomassa no seu ápice, ela quase triplicou. A partir do 12º dia, a cultura manteve-se, praticamente, em fase estacionária.

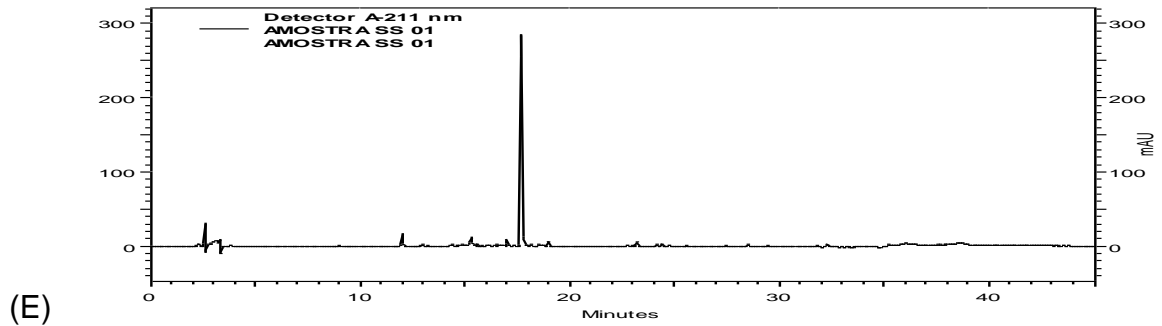
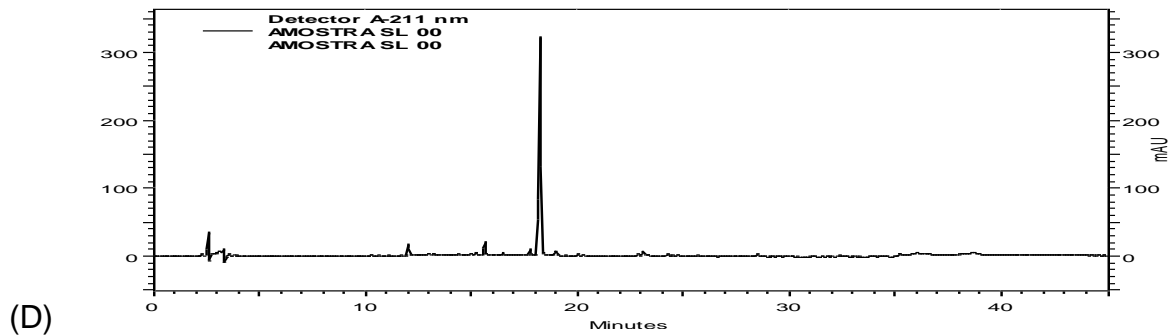
6.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Extratos brutos de lobeira, obtidos das amostras utilizadas na curva de crescimento, foram submetidos à extração ácido-base e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cujo equipamento estava acoplado a um detector UV-VIS com arranjo diodo. A técnica ácido-base para extração de solamargina e solasonina em frutos de *S. lycocarpum* e procedimento analítico foram desenvolvidos por Tiozzi et al (2014).

Foram obtidos cromatogramas em diferentes períodos de desenvolvimento das células e comparados aos cromatogramas dos padrões de glicoalcaloides esteroidais solamargina e solasonina, gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Jairo K. Bastos, conforme Figura 15.

Figura 15 – Cromatogramas de extratos de células de *S. lycocarpum* após extração ácido-base após o início da cultura (A) 3 dias, (B) 6 dias, (C) 15 dias, (D) solamargina (E) solasonina



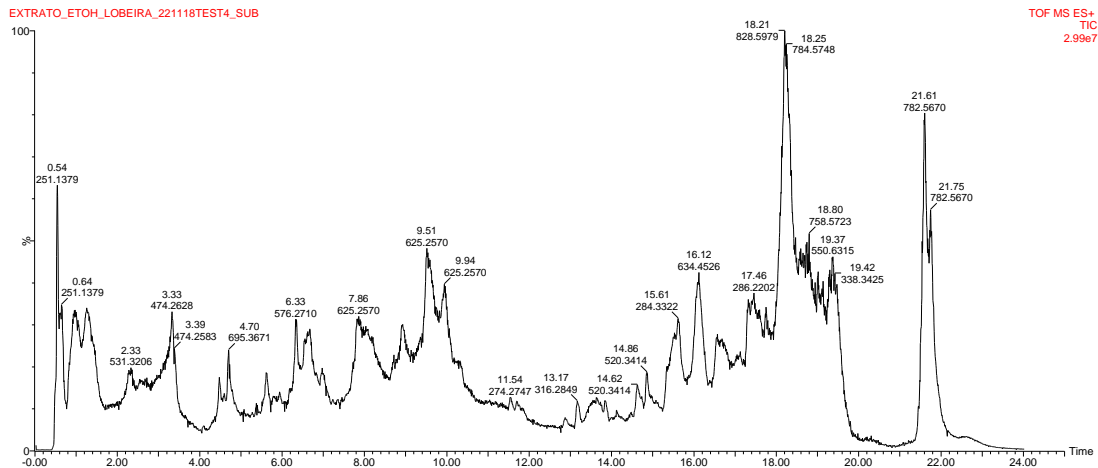


A comparação entre os cromatogramas dos padrões dos glicoalcaloides alvo e os cromatogramas das amostras de lobeira comprovou que as células em suspensão não produzem tais compostos.

A técnica de adição de precursores de glicoalcaloides foi realizada, utilizando como precursores colesterol e arginina separados e combinados, conforme protocolo testado em outras espécies de *Solanum* (OOI et al., 2016), mas não produziu tais substâncias em células desdiferenciadas de *S. lycocarpum*.

Para se obter um perfil químico amplo das células de lobeira, fez-se extração com etanol PA e o extrato etanólico bruto foi analisado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massas (CLAE qToF/MS) como apresentado na Figura 16.

Figura 16 – Cromatograma do extrato etanólico bruto de lobeira



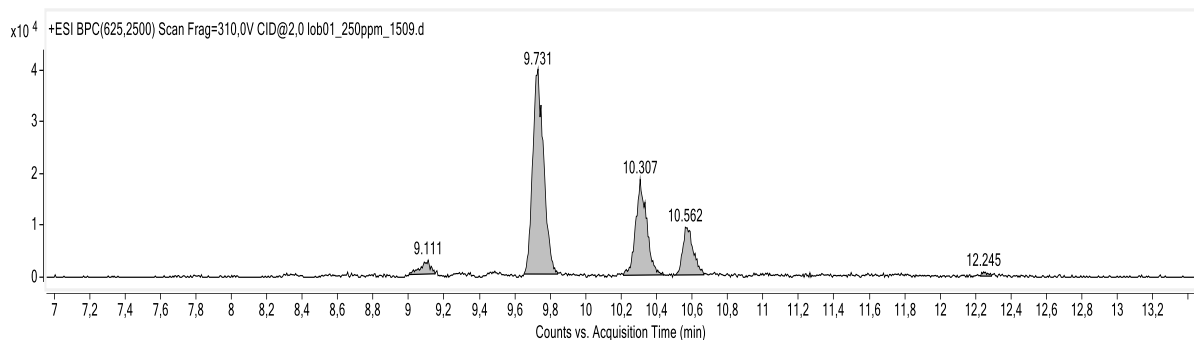
Os dados de espectrometria de massas de alta resolução exibidos no cromatograma da Figura 16 não evidenciam a presença dos compostos de m/z 868,5077 ($[M+H]^+$) ou m/z 884,4989 ($[M+H]^+$), que se referem, respectivamente, à solamargina e à solasonina (BURGER et al., 2018).

Esse resultado analítico por CLAE qToF/MS demonstrou que as células cultivadas não acumularam glicoalcaloides anteriormente descritos na literatura, como acumulados em frutos de *S. lycocarpum*.

Apesar de não apresentar os glicoalcaloides esteroidais, a análise por CLUAE q-ToF/MS apresentou substâncias com m/z 625.2570, $[M+H]^+$.

Para refinar a busca dessas substâncias, foram efetuadas melhorias no método, apresentando o cromatograma desse extrato etanólico bruto de lobeira (Figura 17) apenas substâncias que contêm m/z 625,25.

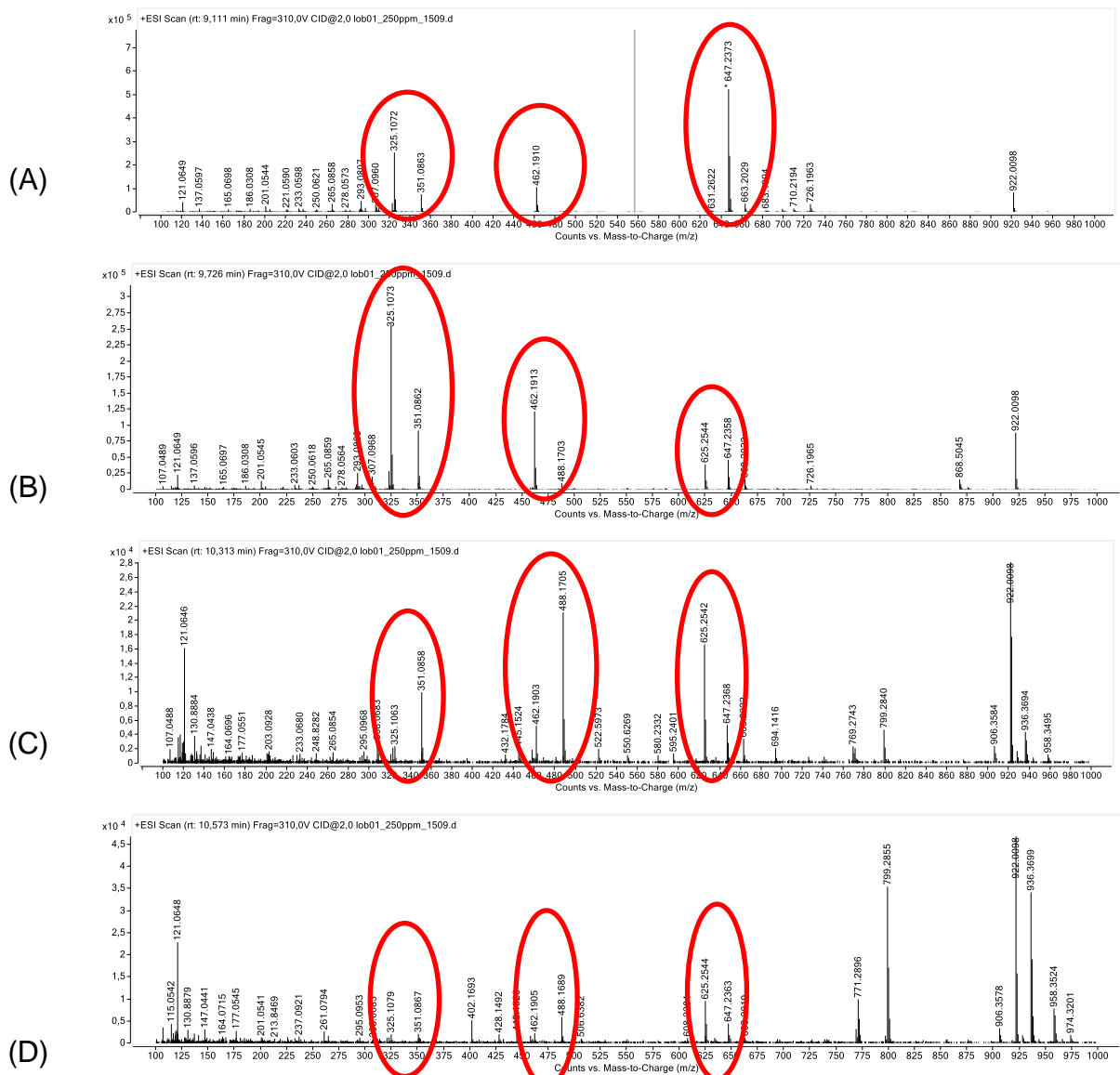
Figura 17 – Cromatograma do pico base (BPC) do extrato etanólico bruto de *S. lycocarpum* com sinais de substâncias com m/z 625,25



As substâncias no cromatograma anterior que possuem sinais de absorvância relativa mais pronunciada e com espectros de massas de m/z 625,25, são aquelas com tempos de retenção 9,1; 9,9; 10,3 e 10,5 minutos.

A análise dos espectros de fragmentação de tais substâncias mostrou fragmentação semelhante, sendo que os sinais dos fragmentos 325,10, 351,08 e 462,19 foram mais intensos em todos eles. Vale ressaltar que a primeira substância apresentou apenas o íon molecular 647,23 Da equivalente à molécula sodiada e não da molécula protonada 625,25 Da (Figura 18).

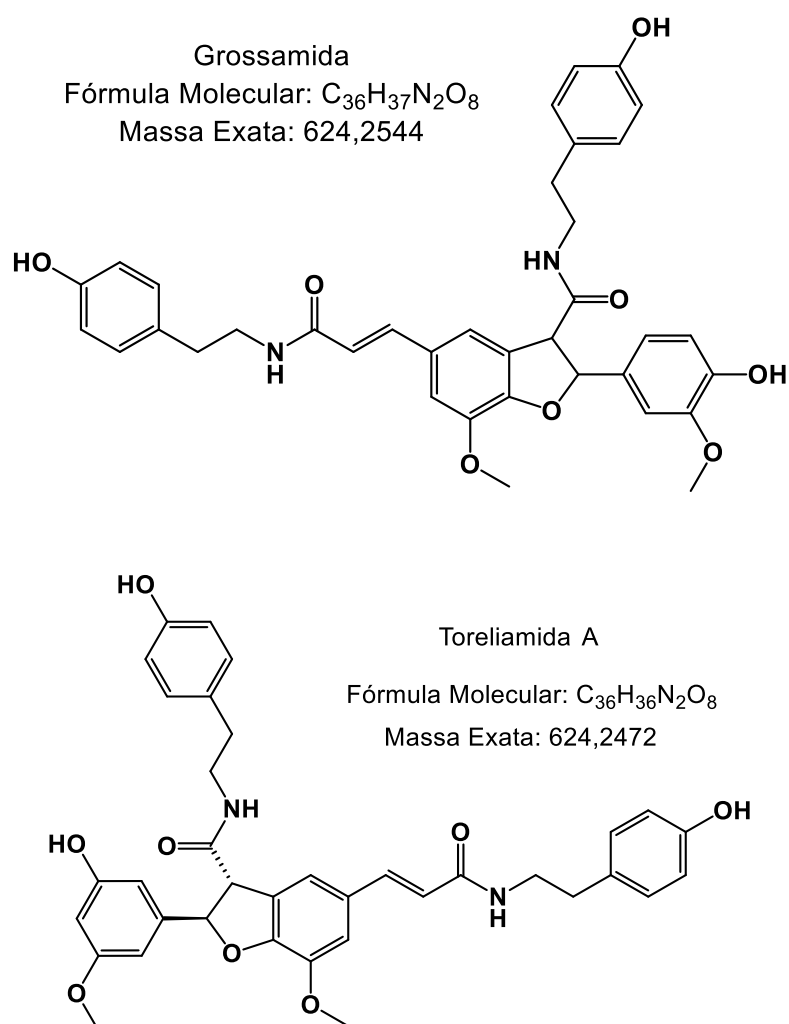
Figura 18 – Espectro de massas da fragmentação das substâncias de m/z 625,25 do extrato etanólico bruto de células de lobeira nos tempos de retenção (A) 9,1 min, (B) 9,7 min, (C) 10,3 min e (D) 10,5 min

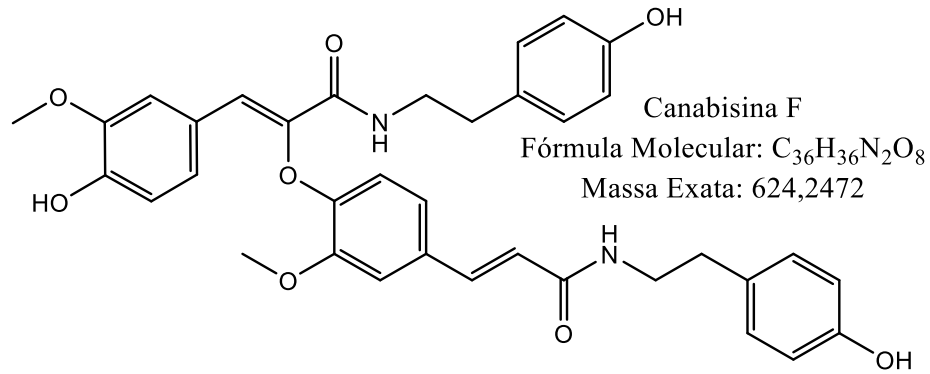


Análises por CLUAE q-ToF/MS não permitiram confirmar de maneira inequívoca quais substâncias estão presentes no extrato, pois os quatro sinais referentes aos t_R 9.1, 9.7, 10.3 e 10.5 min (Figura 18), apresentam os mesmos valores de m/z 625.25, além de íons fragmentos iguais para todas as substâncias.

Os íons m/z 625.2544 e 625.2542, e seus respectivos íons fragmentos de m/z 325.10, 351.08, 462.19 e 488.17, quando comparados com os dados da literatura, sugerem a presença de uma ou mais lignanamidas, como grossamida (BOLLEDULLA et al. 2012), canabisina F (XU et al., 2018) e toreliamida A (GE et al., 2008), que, por serem isômeras e apresentarem mesmos dados de MA, necessitam de outras técnicas para serem identificadas de maneira incontestável (Figura 19).

Figura 19 – Comparação das fórmulas moleculares, fórmulas estruturais e massa exata de grossamida, toleriamida A e canabisina F

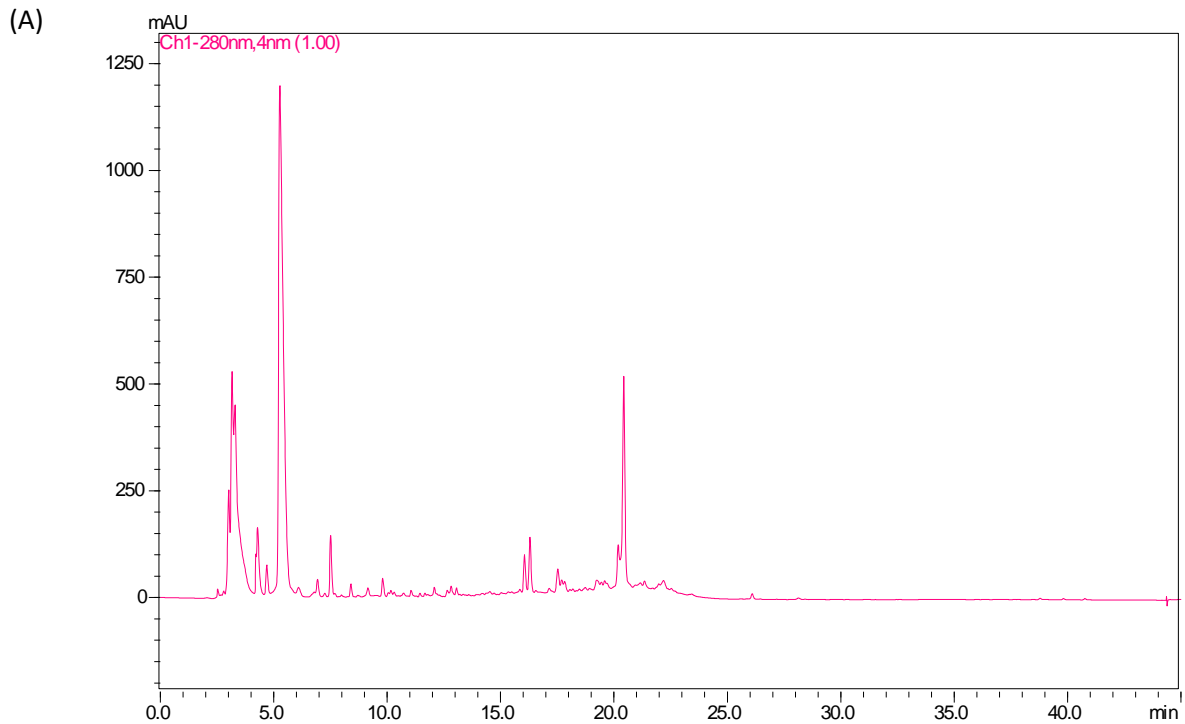


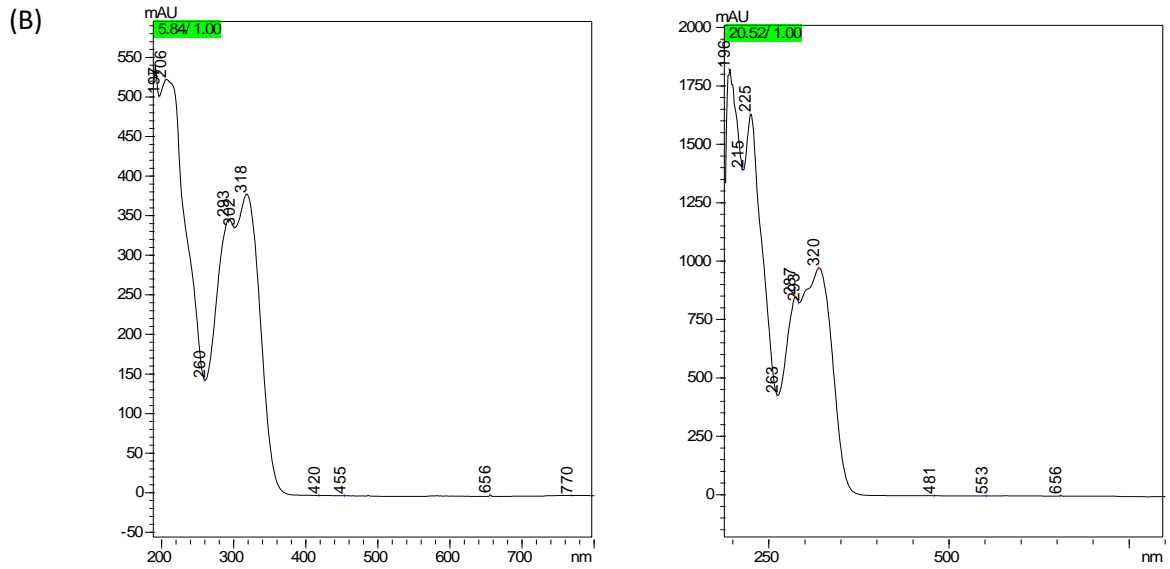


Com a finalidade de se confirmar a presença de lignanamidas no extrato etanólico bruto de *S. lycocarpum*, realizou-se análise em cromatografia por CLAE-UV/VIS utilizando nova fase móvel, para que as substâncias pudessem ser isoladas.

A análise exploratória do extrato etanólico bruto de lobeira em fase móvel (ACN:H₂O) possibilitou um maior espaçamento dos tempos de retenção das substâncias de interesse, cujos perfis UV se assemelham ao perfil de lignanamidas (Figura 20).

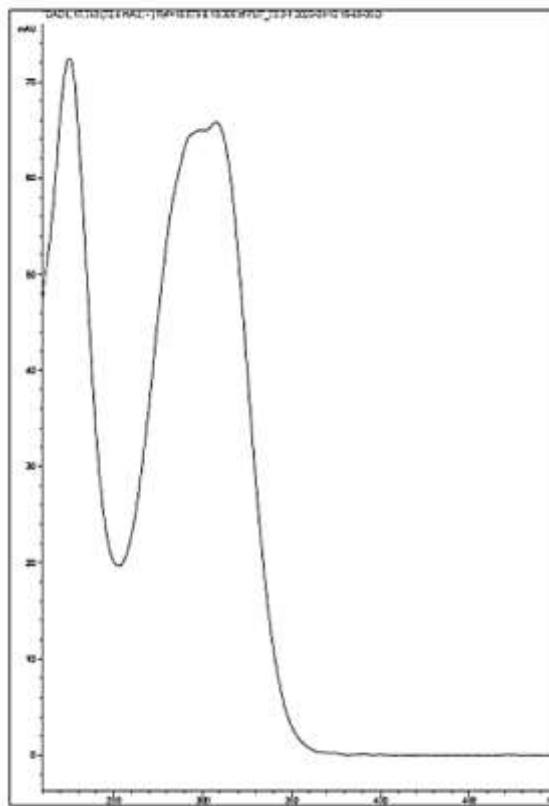
Figura 20 – (A) Cromatograma do extrato etanólico bruto e (B) perfis da banda de absorção de possíveis lignanamidas





Os compostos foram selecionados e comparadas as suas características espectrais de UV com metabólitos da literatura de mesma classe dos compostos de interesse, conforme Figura 21.

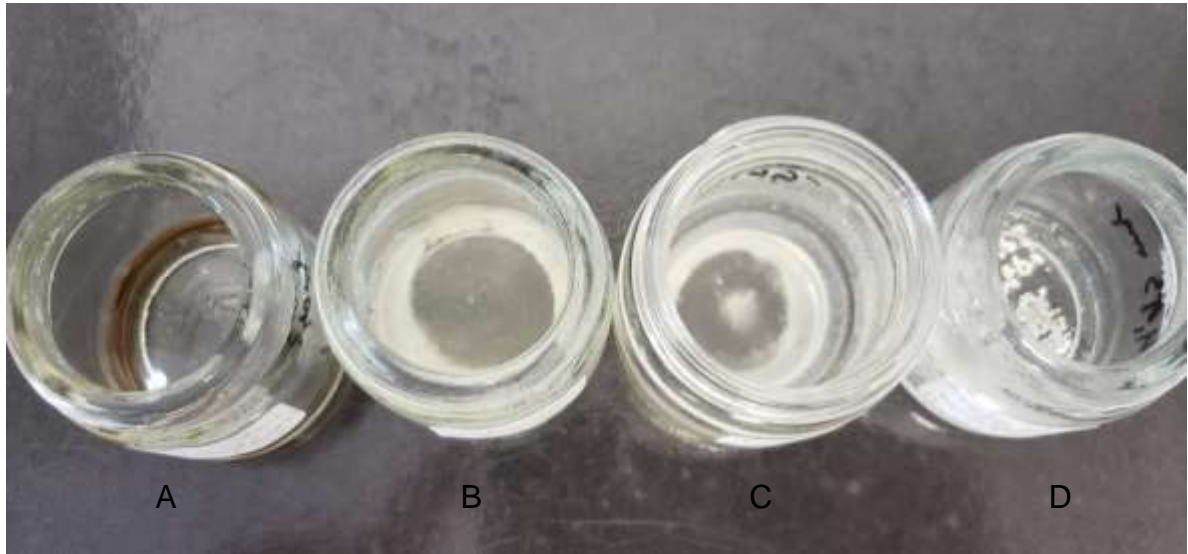
Figura 21 – Perfil da banda de absorção de lignanamida



Fonte: Nigro et al.,2020.

A fim de isolar os compostos de interesse, extração em cartuchos SPE foi efetuada. Foi utilizado 851 mg de extrato etanólico bruto de células em suspensão. As quatro frações foram secas, e três delas apresentaram sólidos cristalinos, conforme Figura 22.

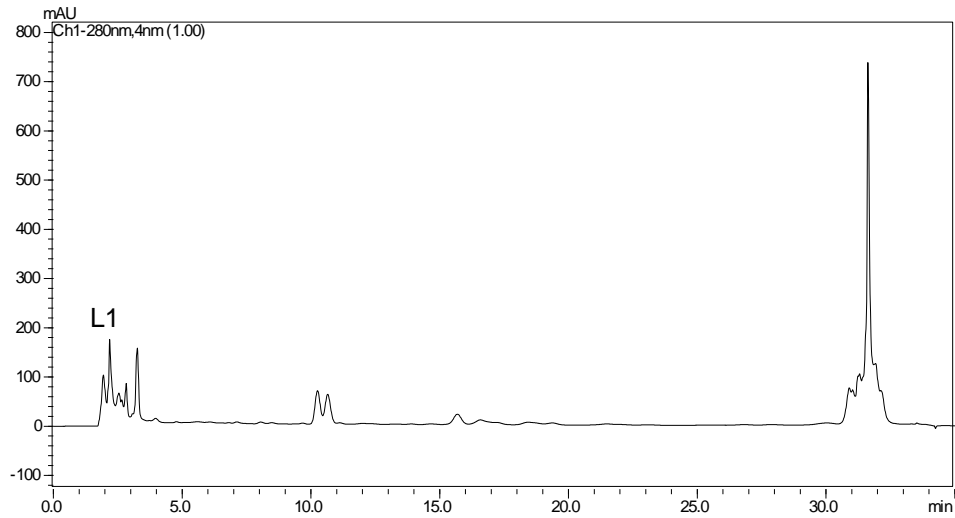
Figura 22 – Frações do extrato de *S. lycocarpum* após separação por cartucho SPE, cujas eluições foram em ACN: H₂O (A) (25:75), (B) (50:50), (C) (100:0) e (D) AcOEt/ACN



As massas obtidas em A, B, C e D foram respectivamente 4,22 mg, 5,88 mg, 6,72 mg e 7,99 mg.

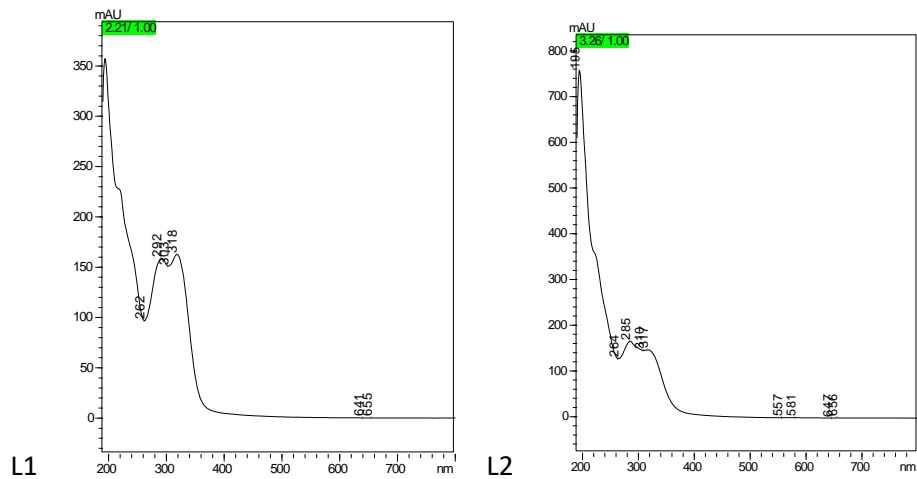
Para o isolamento, adotou-se um método isocrático ACN:H₂O (30:70) e foram coletadas quatro substâncias de tempos de retenção distintos para análise (Figura 23)

Figura 23 – Cromatograma da fração separada por SPE ACN:H₂O (50:50) em CLAE, modo preparativo



Os compostos foram selecionados em comparação com características espectrais de UV de metabólitos de mesma classe dos compostos de interesse (Figura 24).

Figura 24 – Espectros UV das substâncias coletadas (L1, L2, L6 e L7) que possuem perfil semelhante aos de lignanamidas comparados aos da literatura



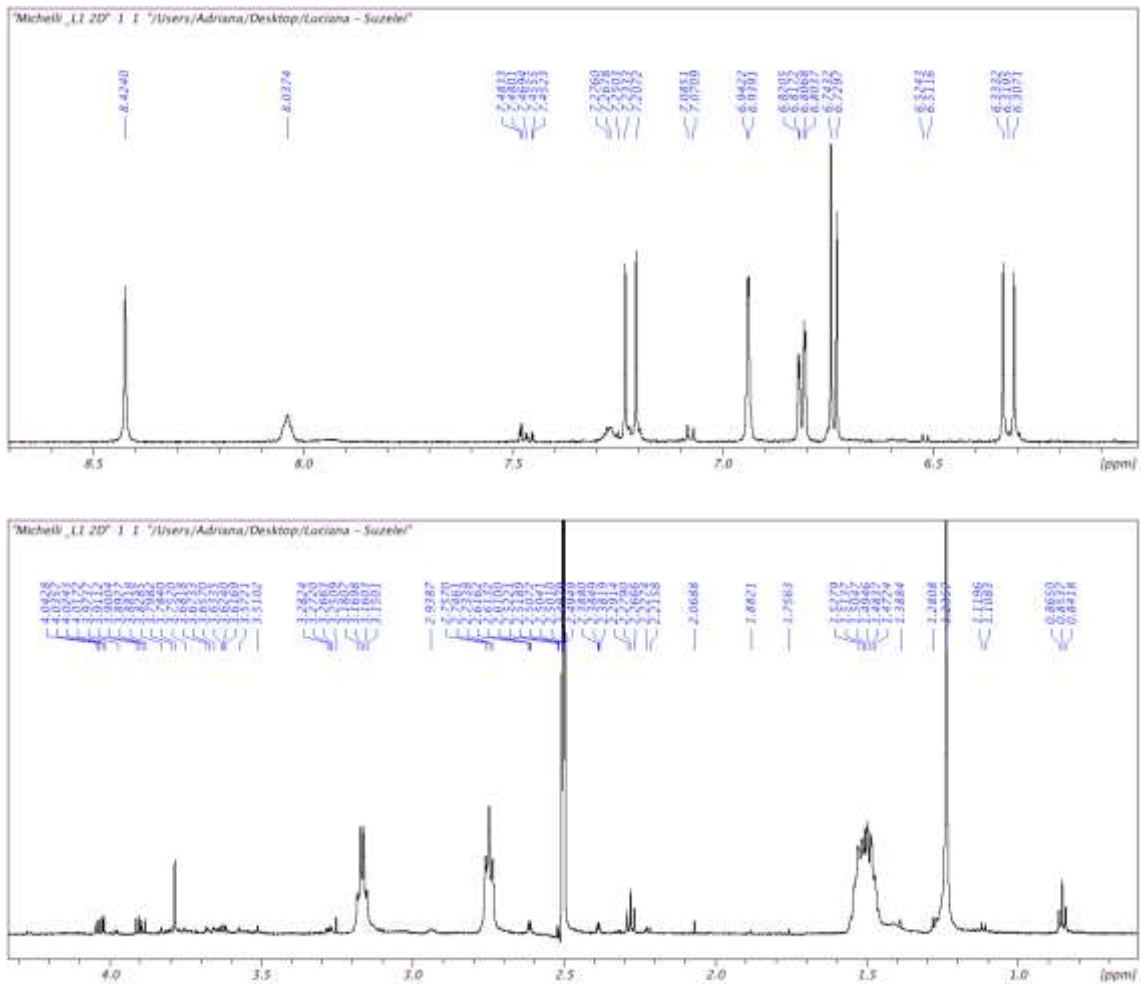


Figura 26 – Espectro de ^{13}C da amostra N-caffeoil-putrescina (150 MHz; DMSO- d_6)

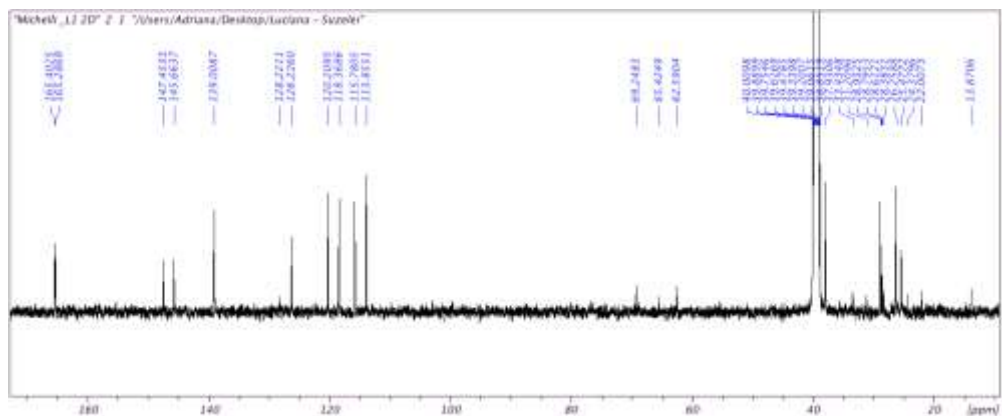


Figura 27 – Mapa de contorno HSQC da amostra N-cafeoil-putrescina (600 MHz; DMSO-d6)

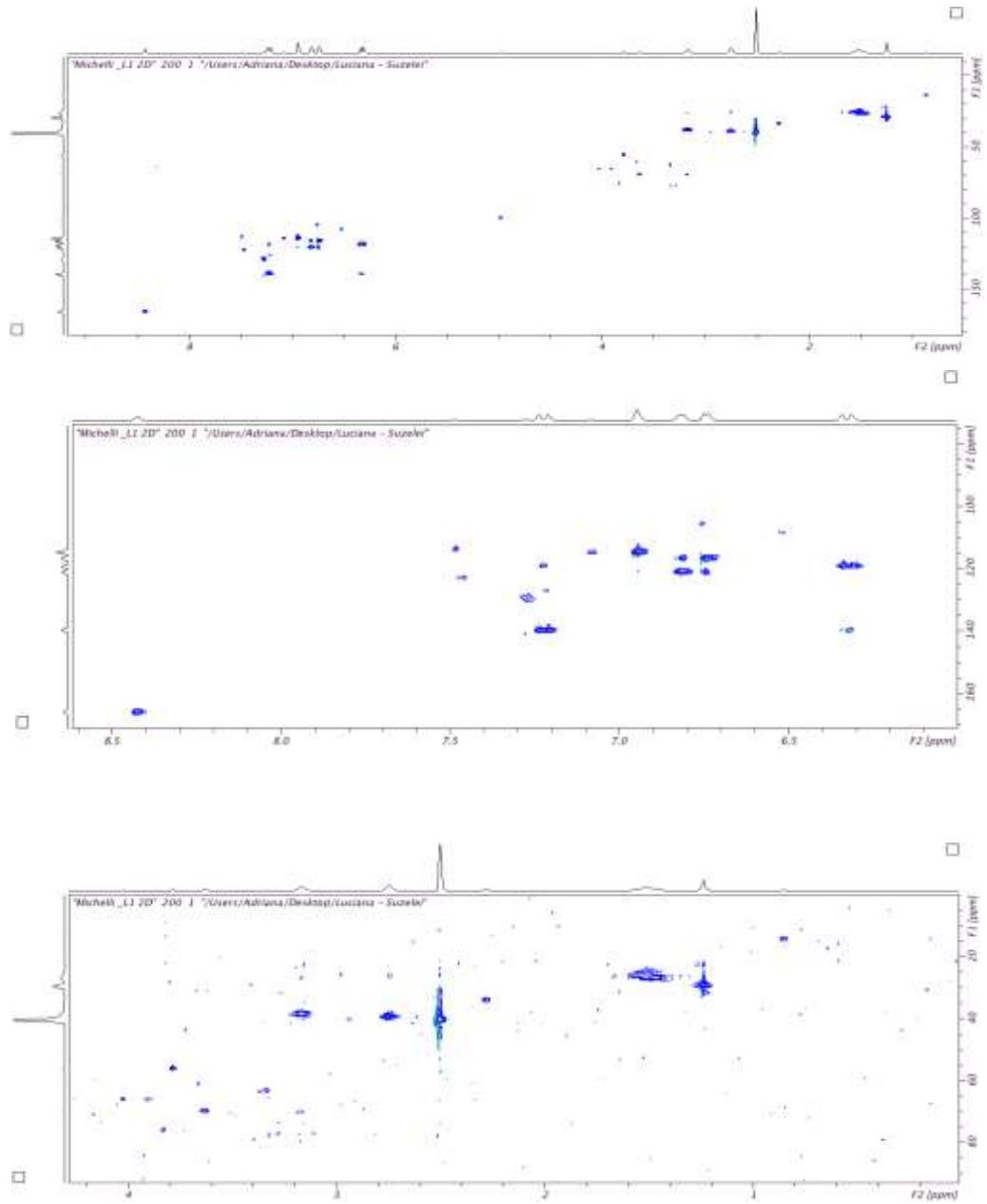


Figura 28 – Mapa de contorno HMBC da amostra N-cafeoil-putrescina (600 MHz; DMSO-d6)

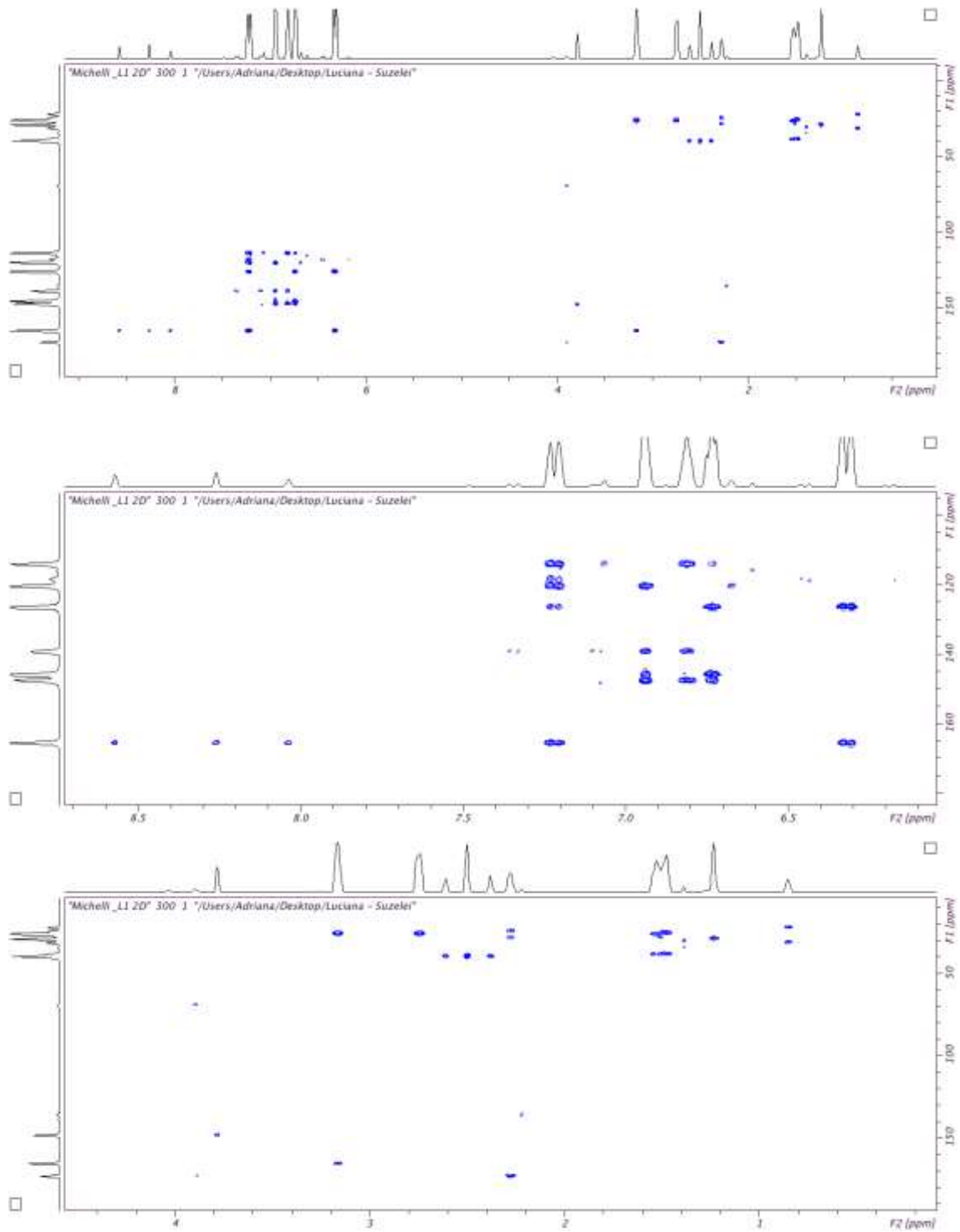
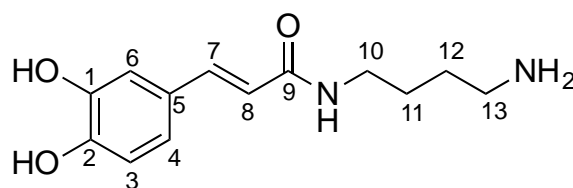


Figura 29 – Fórmula estrutural da N-cafeoil-putrescina

Chemical Formula: C₁₃H₁₈N₂O₃

Exact Mass: 250,13

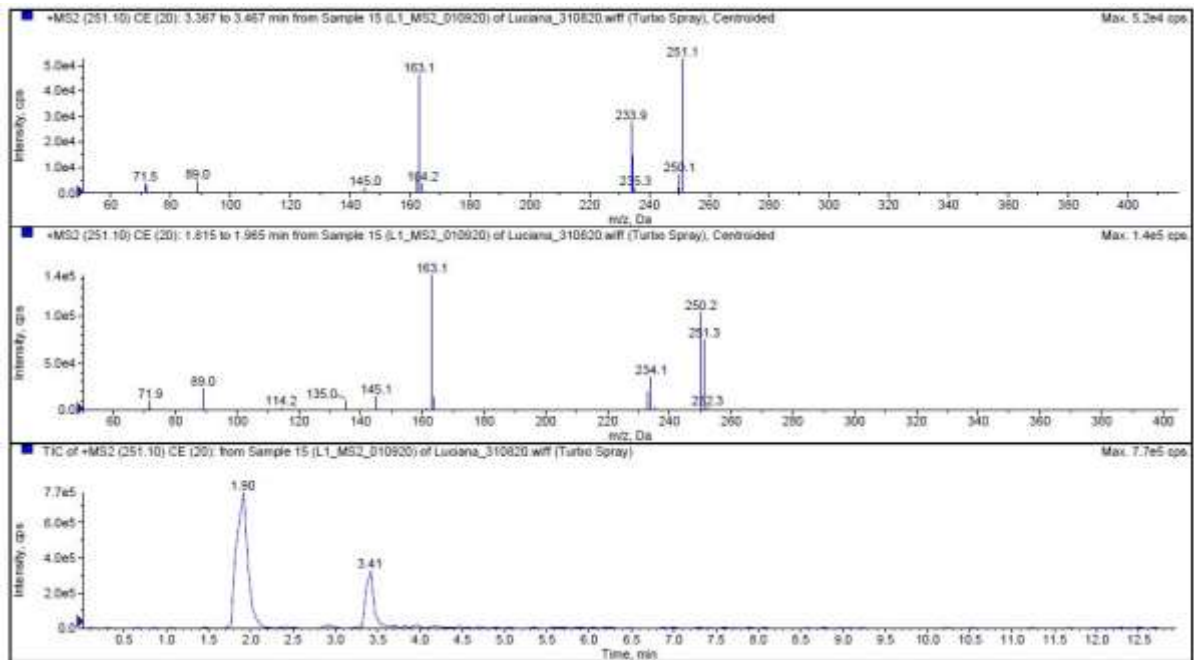
A Tabela 2 apresenta os dados espectrais da substância isolada.

Tabela 2 – Dados de RMN ¹H e ¹³C da substância isolada

	N-cafeoil-putrescina (DMSO-d ₆)		N-cafeoil-putrescina *(CD ₃ OD)
	¹ H (δ)	¹³ C (ppm)	¹ H (δ)
C-1	-	145,7	-
C-2	-	147,4	-
C-3	6,74 (1H, d, J=8.2 Hz)	115,7	6,76 (1H, d, J=8.2 Hz)
C-4	6,82 (1H, dd, J=2.1 Hz, 8.2 Hz)	120,2	6,89 (1H, dd, J=2.1 Hz, 8.2 Hz)
C-5	-	126,3	-
C-6	6,9 (1H, d, J=2.1 Hz)	113,8	6,99 (1H, d, J=2.1 Hz)
C-7	7,23 (1H, d, J=15.7 Hz)	139,0	7,38 (1H, d, J=15.7 Hz)
C-8	6,33 (1H, d, J=15.7 Hz)	118,4	6,34 (1H, d, J=15.7 Hz)
C-9	-	165,0	-
C-10	1,5 (4H, m)	26,0	1,66 (4H, m)
C-11	3,1 (2H, t, J=7.4 Hz)	37,6	3,32 (2H, t, J=7.4 Hz)
C-12	2,75 (2H, t, J=7.4 Hz)	38,6	2,94 (2H, t, J=7.4 Hz)
C-13	1,5 (4H, m)	26,0	1,66 (4H, m)

A análise dos espectros de massas da amostra apresentou duas substâncias com t_R 3.41 e 1.90 min ambos apresentando m/z 251.1 e 251.3, respectivamente e fragmentos m/z 234, 163, 145, 89 e 72, conforme Figura 30.

Figura 30 – Cromatograma de íons totais (TIC) e espectros MS/MS das substâncias com t_R 1.90 e 3.41 min. da amostra L₁



6.5 ELICITAÇÃO BIÓTICA E ABIÓTICA DE METABÓLITOS DE INTERESSE

No presente trabalho, o experimento de elicitação para indução da produção de lignanamidas foi dividido em elicitação biótica, cujo elicitor era extrato de micélio de fungo, e elicitação abiótica utilizando Metil jasmonato. Neste experimento, foram realizados 16 tratamentos, dentre os quais 8 tratamentos para o experimento com fungo em duas concentrações e 8 tratamentos para elicitação com MeJa em duas concentrações (Tabela 3).

Tabela 3 – Numeração dos tratamentos do experimento de elicitação para estimulação da produção de lignanamidas em *S. lycocarpum* em suspensão

Nº	Extrato
1	Extrato de células do controle – sem adição de fungo 100 µg/mL
2	Extrato de células do controle – sem adição de MeJa 500 µM
3	Extrato do meio de cultura do controle – sem adição de fungo 100 µg/mL
4	Extrato do meio de cultura do controle – sem adição de MeJa 500 µM
5	Extrato do meio de cultura da amostra com adição de MeJa 500 µM
6	Extrato de células da amostra com adição de MeJa 500 µM
7	Extrato de células da amostra com adição de extrato de fungo 100 µg/mL
8	Extrato do meio de cultura da amostra com adição de extrato de fungo 100 µg/mL
9	Extrato de células do controle – sem adição de fungo 10 µg/mL
10	Extrato de células do controle – sem adição de MeJa 50 µM
11	Extrato do meio de cultura do controle – sem adição de fungo 10 µg/mL
12	Extrato do meio de cultura do controle – sem adição de MeJa 50 µM
13	Extrato de células da amostra com adição de MeJa 50 µM
14	Extrato do meio de cultura da amostra com adição de MeJa 50 µM
15	Extrato de células da amostra com adição de fungo 10 µg/mL
16	Extrato do meio de cultura da amostra com adição de fungo 10 µg/mL

As amostras 1-2, 4-5 e 7-16 exibem quatro (4) substâncias com tempos de retenção de 9.1, 9.7, 10.3 e 10.5 min. Seus respectivos íons precursores são: 647.2373 [M+Na]⁺ para o primeiro pico e para os demais, 625.2544 [M+H]⁺ e 647.2373 [M+Na]⁺. Esses dados podem ser observados nas Tabela 4 (tratamentos de células) e Tabela 5 (tratamentos do meio) e nos cromatogramas e espectros de massa das Figuras 31 à 34.

Tabela 4 – Íons precursores, íons fragmentos e área dos picos das amostras do experimento de elicitação, para os picos cujos íons precursores são 625.25 [M+H]⁺ e 647.23 [M+Na]⁺

Tempos de retenção (t _R)	m/z [M+Na] ⁺ e/ou [M+H] ⁺	Fragmentos m/z	Área dos picos
Tratamento 1			
9.111	647.2373	462.19; 351.08; 325.10	10148.4
9.726	625.2544; 647.2373	462.19; 351.08; 351.08; 325.10	169958.7
10.313	625.2542; 647.2373	462.19; 351.08; 325.10	18485.05
10.573	625.2544; 647.2373	462.19; 351.08; 325.10	38027.17
Tratamento 2			
9.099	647.2376	462.19; 351.10; 325.10	17097.51
9.736	625.2540; 647.2357	488.17; 462.19; 351.08; 325.10	186629.98
10.312	625.2536; 647.2359	488.17; 462.19; 351.08; 325.10	78464.06
10.572	625.2544; 647.2357	488.16; 351.08; 325.10	45872.88
Tratamento 7			
9.111	647.2362	462.11; 351.08; 325.10	
9.715	625.2542; 647.2355	462.19; 351.08; 325.10	27948.79
10.313	625.2540; 647.2362	488.16; 351.08; 308.06	16597.22
10.579	625.2544; 647.2360	488.16; 462.18;	14504.51
Tratamento 9			
9.092	647.2391	462.19; 351.08; 325.10	13582.95
9.735	625.2544; 647.2362	462.19; 351.08; 325.10	153717.3
10.316	625.2538; 647.2355	462.19; 351.08; 325.10	58936.89
10.599	625.2542; 647.2361	462.19; 351.08; 325.10	35680.33
Tratamento 10			
9.111	647.23	462.19; 351.08; 325.10	26194.34
9.732	625.2526; 647.2373	462.19; 351.08; 325.10	393612.3
10.33	625.2540; 647.2353	462.19; 351.08; 325.10	123395.5
10.596	625.2543; 647.2364	462.19; 351.08; 325.10	55202.28
Tratamento 13			
9.086	647.235	462.18; 351.08; 325.10	8049.48
9.728	625.2542; 647.2362	462.19; 351.08; 325.10	78983.34
10.304	625.2547; 647.2374	462.19; 351.08; 325.10	34877.11
10.559	647.233	351.12; 325.10	13425.54
Tratamento 15			
9.115	647.235	462.18; 351.08; 325.10; 121.06	13368.33
9.791	625.2515; 647.2334	462.18; 351.08; 325.10	198238
10.334	625.2514; 647.2329	351.8; 325.10; 121.06	80061.81
10.611	625.2515; 647.2329	351.08; 325.10; 121.06	41619.4

Tabela 5 – Análise das amostras de meio de controle e elicitação e área dos picos de íons precursores 625.25 [M+H]⁺ e 647.23 [M+Na]⁺

Tempos de retenção (t _R)	m/z [M+Na] ⁺ e/ou [M+H] ⁺	Fragmentos m/z	Área dos picos
Tratamento 4			
9.694	625.2546; 647.2357	462.1909; 351.0859; 325.1069	161490.4
Tratamento 5			
9.095	647.2373	462.1906; 351.0861; 325.1070	7197.45
9.754	625.2543; 647.2354	462.1907; 351.0856; 325.1068	75181.91
10.313	625.2545; 647.2360	462.1902; 351.0856; 325.1075	34980.23
10.596	625.2542; 647.2343	462.1917; 325.1067	20365.4
Tratamento 8			
9.731	625.2539; 647.2362	488.1683; 462.1909; 351.0863; 325.1072	45272.06
Tratamento 11			
9.091	647.2364	462.1900; 351.08583; 325.1064	7538.67
9.733	625,2519; 647,2341	462.1897; 351.0854; 325.1062	89439.47
10.315	625,2556;	462.1915; 351.0860;	3650.43
10.597	625,2533	351.1284; 325.1077	3373.8
Tratamento 12			
9.284	625,2534; 647,2354	462.1905; 325.1063	146833
9.776	625,2532; 647,2351	462.1910; 351.0860; 325.1091	1722061
10.308	625,2544; 647,2373	462.1915; 351.0865; 325.1063	153725.4
Tratamento 14			
9.047	647.2367	488.1681; 462.1896; 351.0851; 325.1063	13368.33
9.723	625.2527; 647.2351	488.1662; 462.1903; 351.0855; 325.1067	400292.13
Tratamento 16			
9.062	647.2335	462.1890; 428.1476; 402.1697; 351.0845; 121.0646	23857
9.71	625.2521; 647.2332	462.1890; 351.0847; 325.1057	108069.9
10.319	625.2527;	488.1686; 351.0854;	11623.42

Figura 31 – Cromatograma (A) do tratamento 10 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B), 9,7 min (C), 10,3 min (D) e 10,5 min (E)

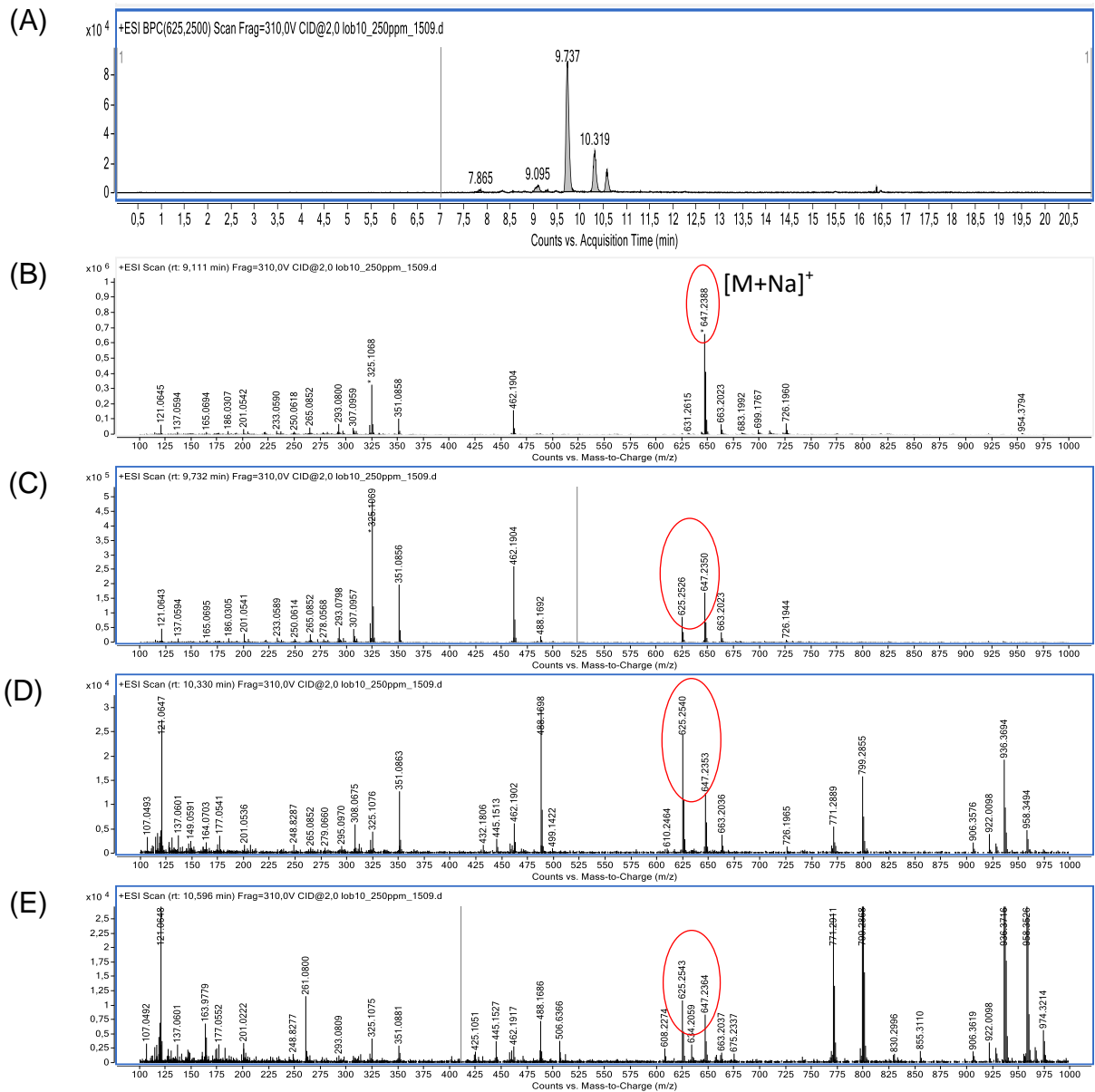
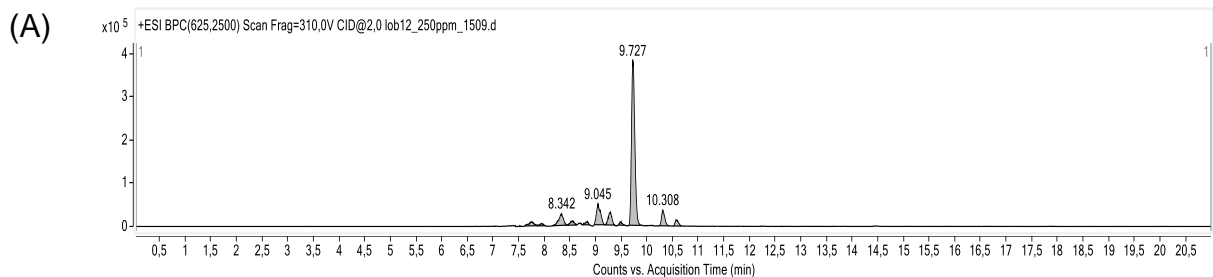


Figura 32 – Cromatograma (A) do tratamento 12 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B), 9,3 min (C), 9,7 min (D) e 10,3 min (E)



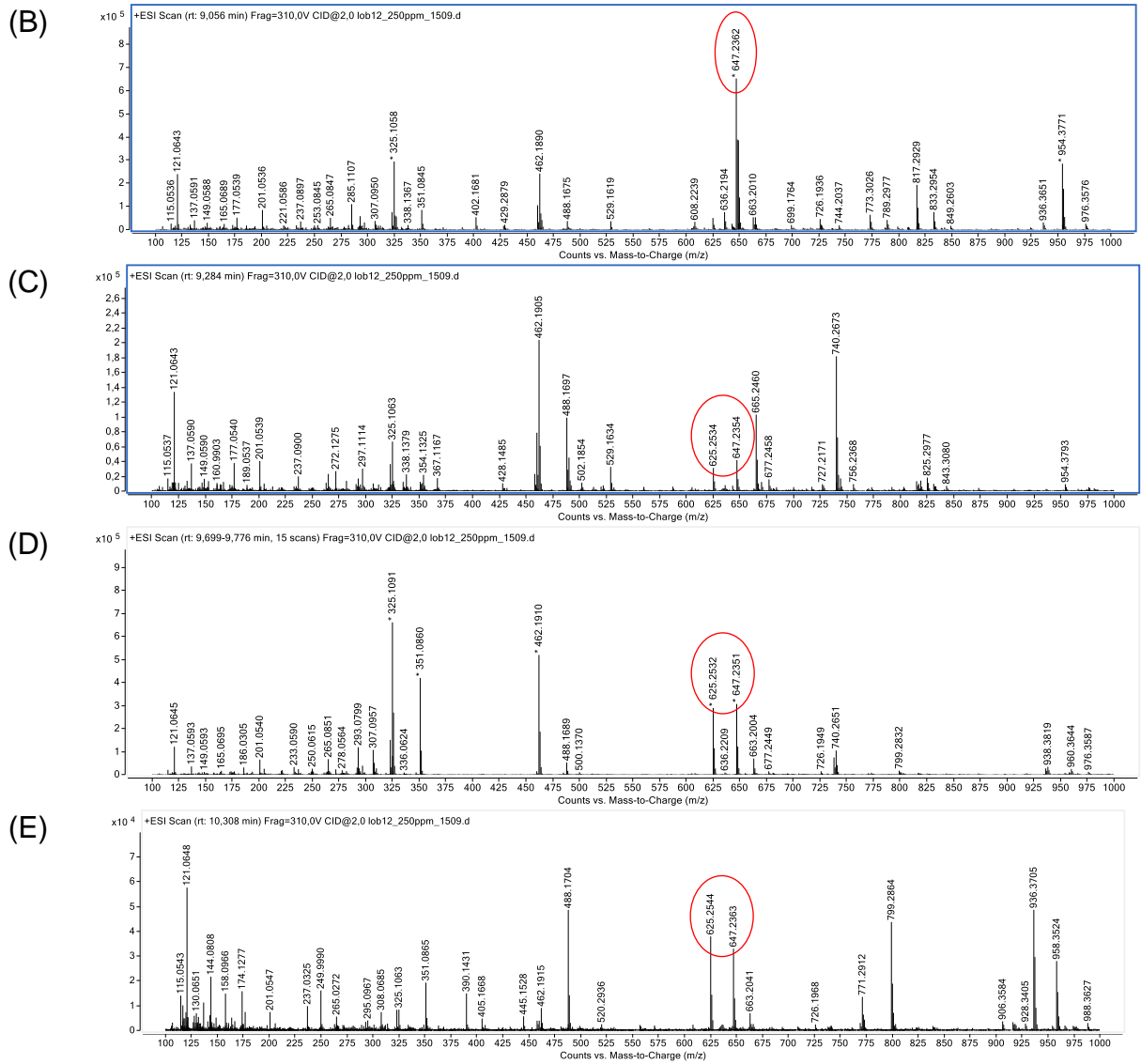
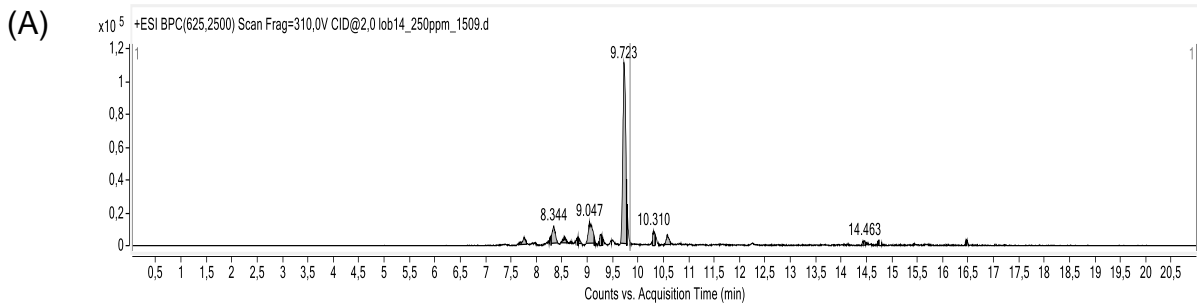


Figura 33 – Cromatograma (A) do tratamento 14 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B) e 9,7 min (C)



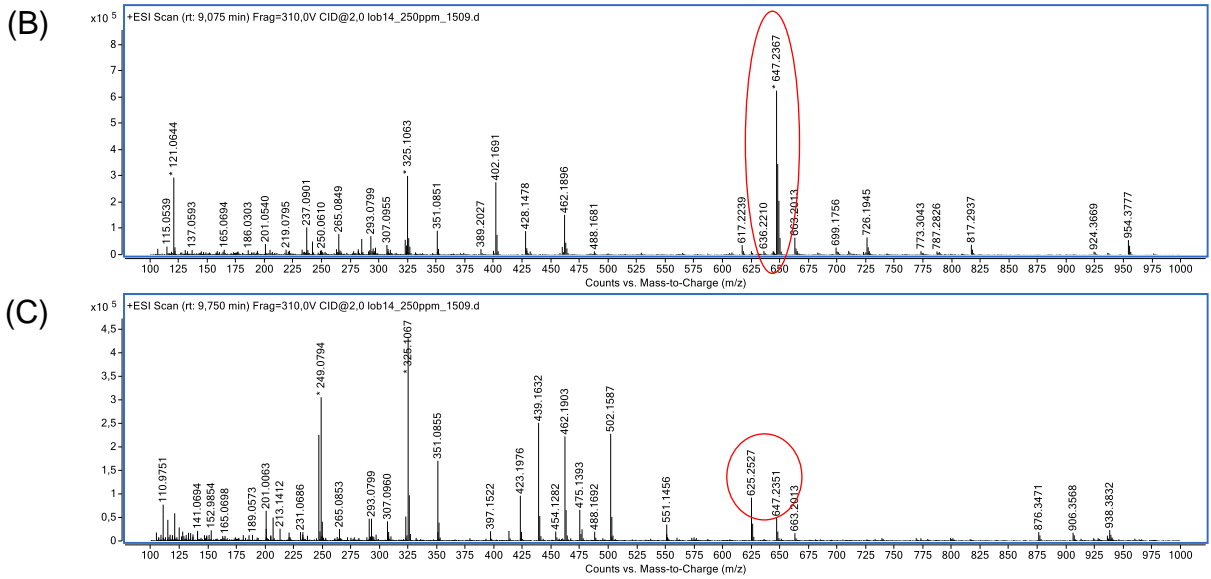
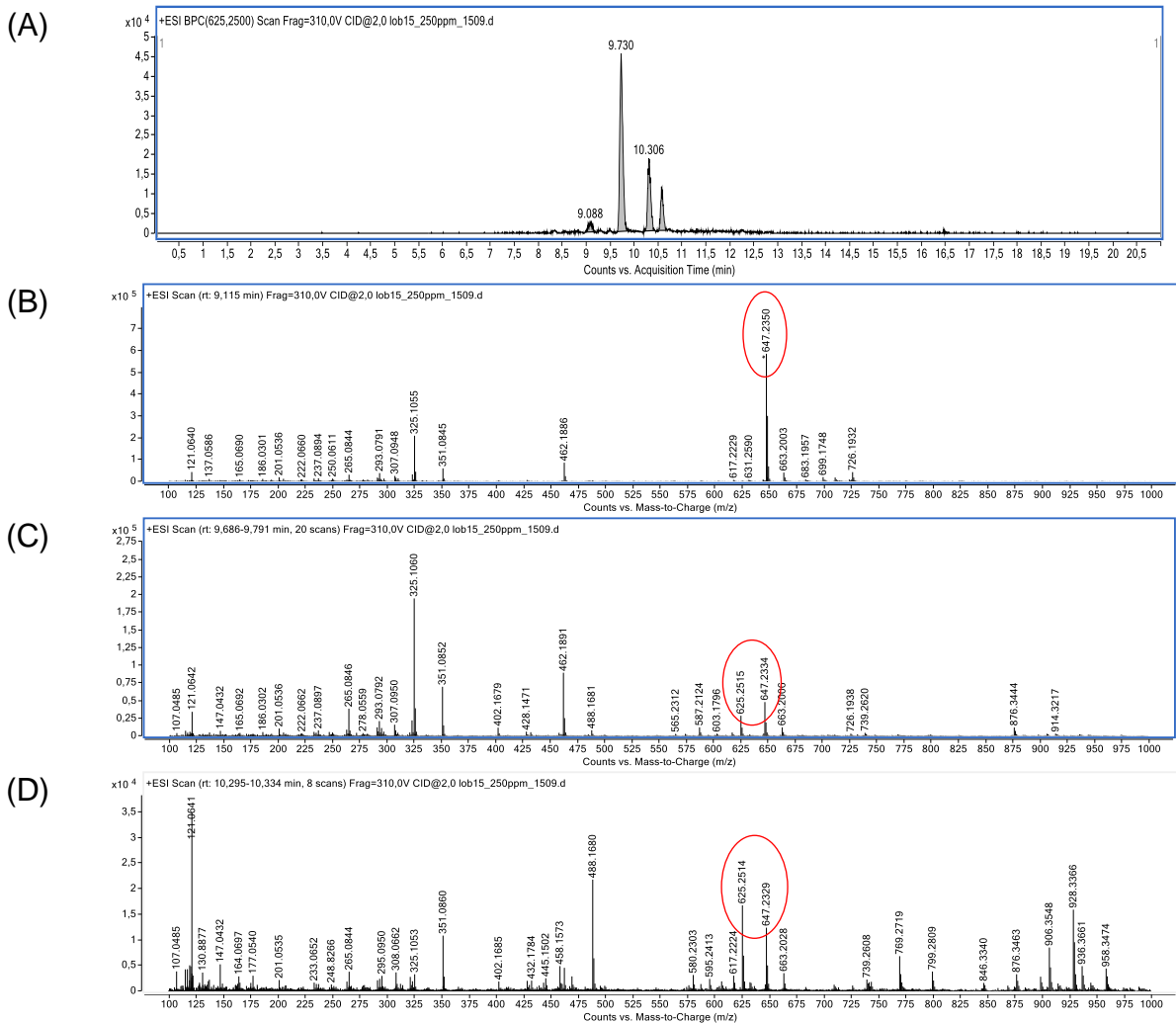
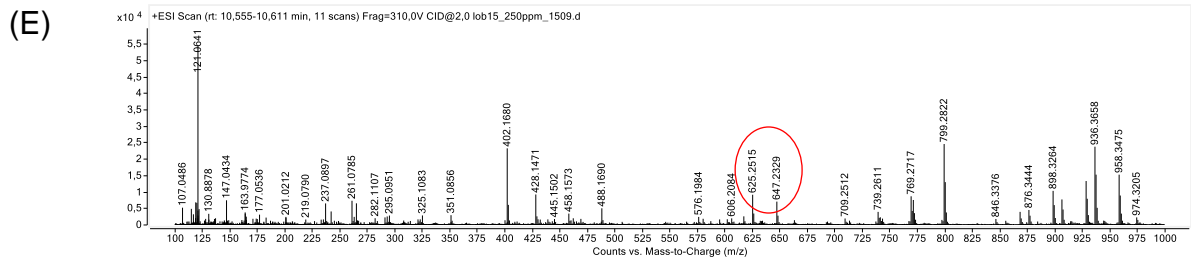


Figura 34 – Cromatograma (A) do tratamento 15 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B), 9,7 min (C), 10,3 min (D) e 10,6 min (E)

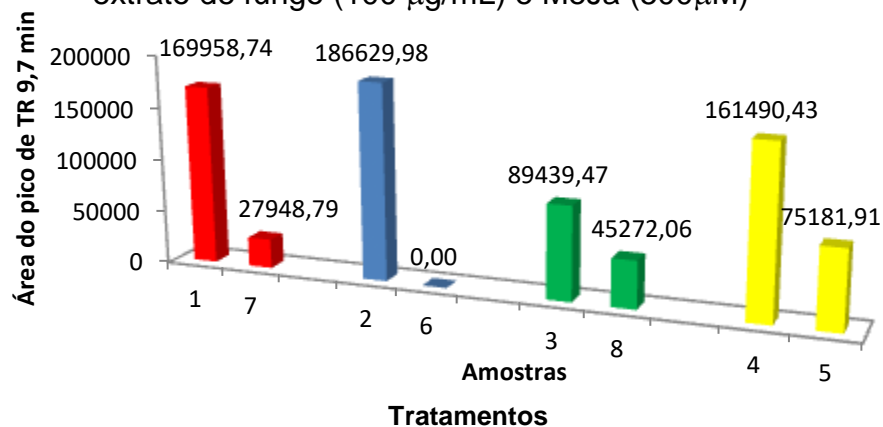




Após o experimento de elicitação, análises cromatográficas das substâncias de m/z $[M+H]^+$ 625.25 demonstraram que a maior intensidade foi notada no tempo de retenção de 9,7 min, na maioria dos tratamentos.

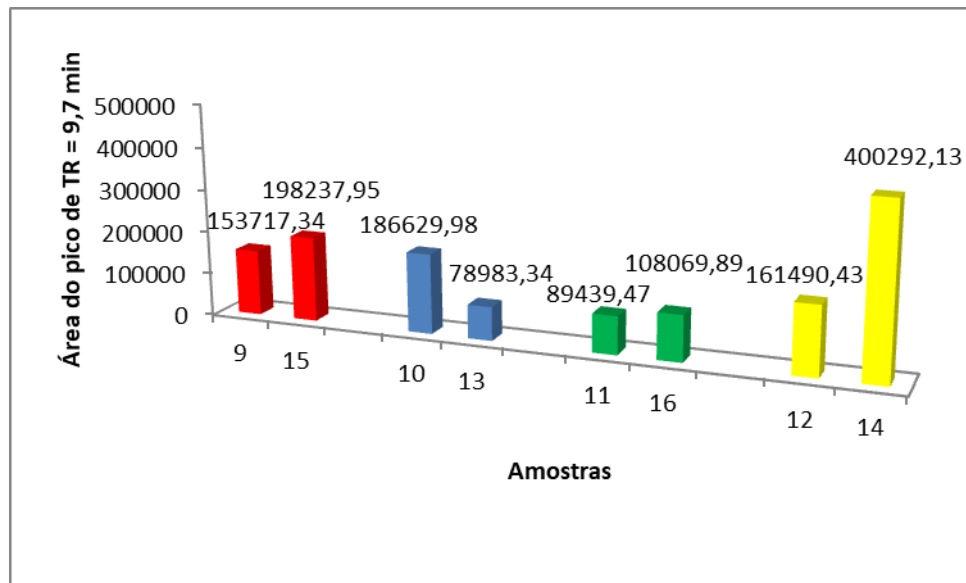
Pelas Tabelas 4 e 5 e cromatogramas das Figuras 33 e 34, observa-se que nos tratamentos 14 e 15 (meio de cultura do tratamento elicitado com 50 μM MeJa e células elicidadas com fungo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) houve uma maior absorvância relativa em t_R 9,7 min em relação aos demais tratamentos, sendo que o tratamento 14 teve área de maior absorvância mais que o dobro em relação ao tratamento 15. Comparando-se os experimentos, a partir das concentrações de elicitores no 20º dia (Figura 35) e 22º dia (Figura 36), pode-se verificar a melhor condição de elicitação: elicitação com MeJa 50 μM .

Figura 35 – Gráfico comparativo dos tratamentos do experimento de elicitação com extrato de fungo (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e MeJa (500 μM)



- | Amostra | Tratamentos |
|---------|--|
| 1 | Extrato de células do controle – sem adição de fungo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| 2 | Extrato de células do controle – sem adição de MeJa 500 μM |
| 3 | Extrato do meio de cultura do controle – sem adição de fungo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| 4 | Extrato do meio de cultura do controle – sem adição de MeJa 500 μM |
| 5 | Extrato do meio de cultura da amostra com adição de MeJa 500 μM |
| 6 | Extrato de células da amostra com adição de MeJa 500 μM |
| 7 | Extrato de células da amostra com adição de extrato de fungo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| 8 | Extrato do meio de cultura da amostra com adição de extrato de fungo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

Figura 36 – Gráfico comparativo dos tratamentos do experimento de elicitação com extrato de fungo (10 $\mu\text{g/mL}$) e MeJa (50 μM)



Tratamentos

- 9 Extrato de células do controle – sem adição de fungo 10 $\mu\text{g/mL}$
- 10 Extrato de células do controle – sem adição de MeJa 50 μM
- 11 Extrato do meio de cultura do controle – sem adição de fungo 10 $\mu\text{g/mL}$
- 12 Extrato do meio de cultura do controle – sem adição de MeJa 50 μM
- 13 Extrato de células da amostra com adição de MeJa 50 μM
- 14 Extrato de meio de cultura da amostra com adição de MeJa 50 μM
- 15 Extrato de células da amostra com adição de extrato de fungo 10 $\mu\text{g/mL}$
- 16 Extrato de meio de cultura da amostra com adição de extrato de fungo 10 $\mu\text{g/mL}$

A área total do pico da lignanamida elicitada de tempo de retenção 9,7 min para os experimentos no 20º dia e no 22º dia estão representados, respectivamente, nas Figuras 37 e 38.

No experimento de elicitação realizado no 20º dia, nem o elicitor biótico, nem o elicitor abiótico foram eficientes para aumentar a área do pico de t_R 9,7 min.

A elicitação realizada no 22º dia de cultura mostrou que o metil jasmonato na concentração 50 μM possibilitou o aumento da área do pico de t_R 9,7 min em 23%, meio de cultura e células juntamente, em relação ao controle e, analisando-se apenas o meio de cultura, ele promoveu um aumento de 147% em relação ao meio de cultura do controle.

Figura 37 - Área total (meio de cultura e células) do pico de t_R 9,7 min do experimento de elicitação realizado no 20^o dia de cultura

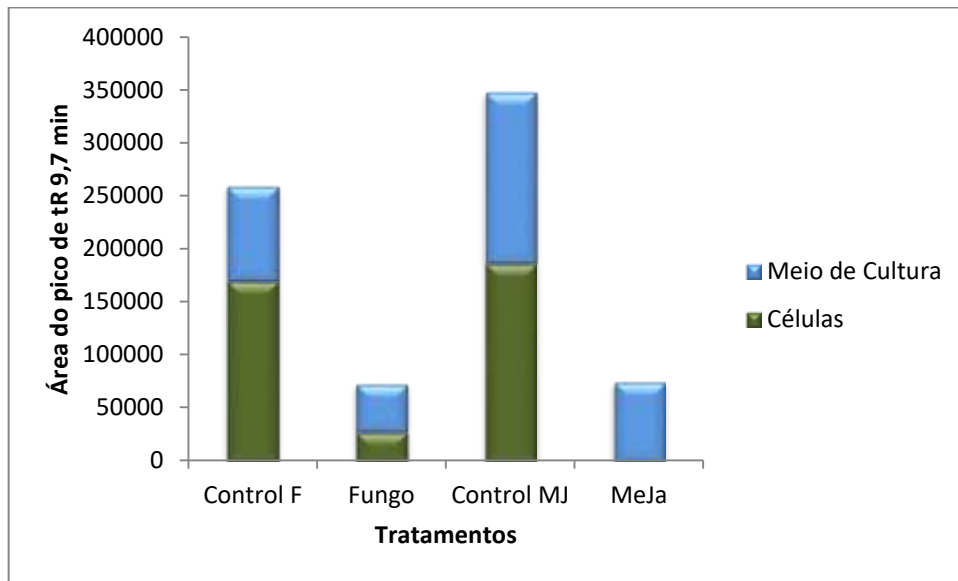
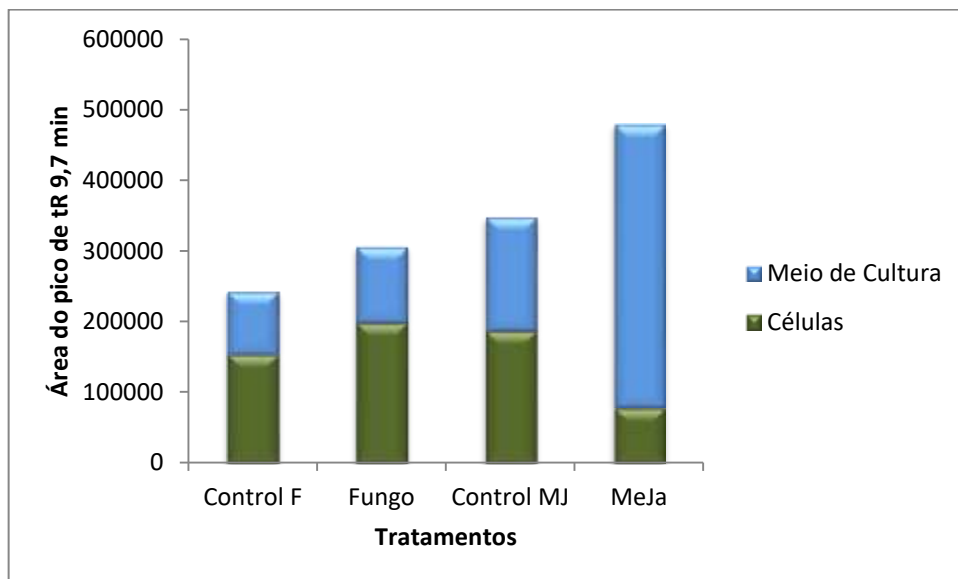


Figura 38 - Área total (meio de cultura e células) do pico de t_R 9,7 min do experimento de elicitação realizado no 22^o dia de cultura



7 DISCUSSÕES

7.1 CULTIVO DE CÉLULAS E ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

A indução de calos a partir de explante de folhas de *S. lycocarpum* utilizando meio MS, 3% de sacarose e suplementado com 2 mg/L de ANA produziu calos de aparência friável e, após subcultivos, foram introduzidos em suspensão.

A cultura de células em suspensão atendeu às expectativas de suspensão fina de células, com poucos grumos. Efetuada a curva de crescimento, observou-se que o crescimento máximo deu-se no 6º dia de cultivo, em que a biomassa quase triplicou em relação ao início da cultura.

Para culturas celulares de plantas, é desejado se obter calos friáveis e suspensões celulares finas, pois, segundo Ramulifho e colaboradores (2019), calos friáveis proporcionam crescimento rápido *in vitro* e, em suspensão, as células de cultura finamente suspensa possibilitam maiores taxas de multiplicação celular, em ciclo de vida curto.

Estudos sobre cultura de células de explantes de folhas de *S. lycocarpum* ainda não foram publicados e seus metabólitos devem ser estudados para obtenção de possíveis novos fármacos, visto que a cultura de células vegetais em suspensão, quando otimizada, é uma eficiente biofábrica de produtos naturais.

Investigou-se inicialmente a presença de glicoalcaloides em células de *S. lycocarpum*, utilizando extração ácido-base própria para alcaloides já estabelecida por Tiozzi e colaboradores (2014), mas não foram encontrados. Uma alternativa para ativar a produção desses compostos é a adição de precursores presentes na biossíntese da parte aglicona desses alcaloides esteroidais, como o colesterol e a arginina, adaptando-se nitrogênio derivado de aminoácidos (AL SINANI; ELTAYEB, 2017).

Apesar desse bioprocesso de adição de precursores para produção de alcaloides esteroidais ter sido satisfatório em raízes de outras espécies de *Solanum*, para células em suspensão de lobeira não se mostrou eficiente.

Buscando-se a obtenção de outros metabólitos com atividades farmacológicas, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida em extrato etanólico de células em suspensão.

Pesquisas já foram efetuadas com relação a extrato etanólico e frações de folhas de *S. lycocarpum*. Encontraram em sua composição compostos fenólicos com atividades anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante (COSTA et al., 2015).

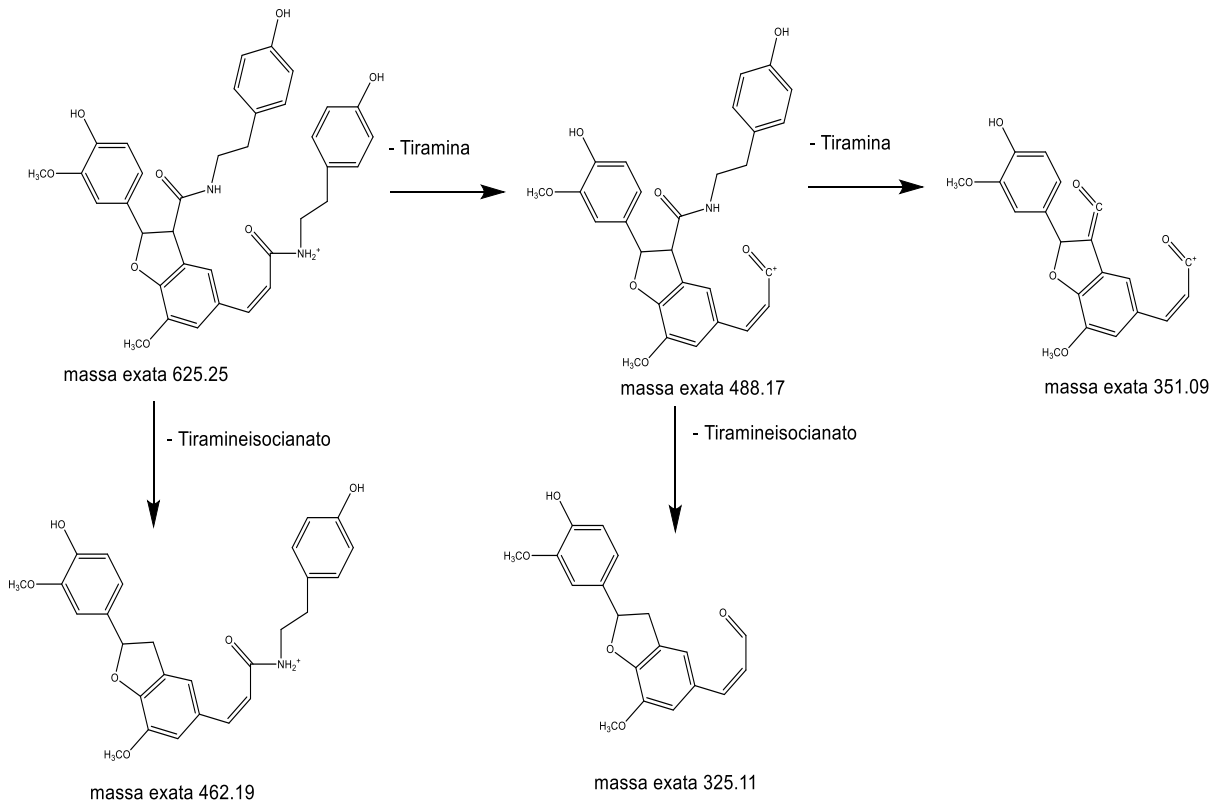
Os resultados das análises cromatográficas por CLUAE q-TOF/MS mostraram no extrato etanólico quatro substâncias com m/z 625.25 ($[M+H]^+$) e com diferenças apenas nas outras duas últimas casas decimais. Pesquisas em banco de dados de massas e na literatura sugeriram a presença de grossamida (**8**), lignanamida que já foi constatada em outras espécies de *Solanum*, como *Solanum melongena* (IM et al., 2016).

Lignanamidas são moléculas de grande importância biotecnológica devido à sua ação neuroprotetiva (LUO, 2017). Pela metodologia de espectrometria de massas, esses compostos já foram encontrados nas espécies *Solanum melongena* L. (SUN et al., 2015) e *Solanum tuberosum* (KING; CALHOUN, 2010). As quatro substâncias com m/z 625.25 ($[M+H]^+$) que apareceram no extrato etanólico bruto de *S. lycocarpum*, mas que possuem tempos de retenção distintos, apontam que essa espécie também metaboliza lignanamidas, mas que ainda não haviam sido descritos na literatura.

A massa exata de $C_{36}H_{36}N_2O_8$ 625.2544 $[M+H]^+$ corrobora com Karim et al (2011), que obteve a massa acurada m/z 625.2549 e, por RMN, identificou o composto como grossamida, uma neolignanamida diidrobenzofurana encontrada em *Atriplex dimorphostagia*, importante por suas atividades neuroprotetivas (LUO et al., 2017). Os dados experimentais, em conjunto com dados obtidos na literatura de MS isolados de espécies de *Solanum* indicam fortemente a presença de grossamida (**8**) (KING; CALHOUN, 2010; SUN et al., 2015), cuja massa $[M+H]^+$ observada ($C_{36}H_{36}N_2O_8$) é m/z 625.2543.

Em análise dos espectros de íons de fragmentação das substâncias de m/z 625.2544, obtiveram-se fragmentos 325.1036, 338.1392, 351.0867, 462.1913 e 488.1704, que, comparados aos obtidos na literatura e apresentados na Figura 39, são característicos da grossamida (**8**) (BOLLEDDULA et al., 2012).

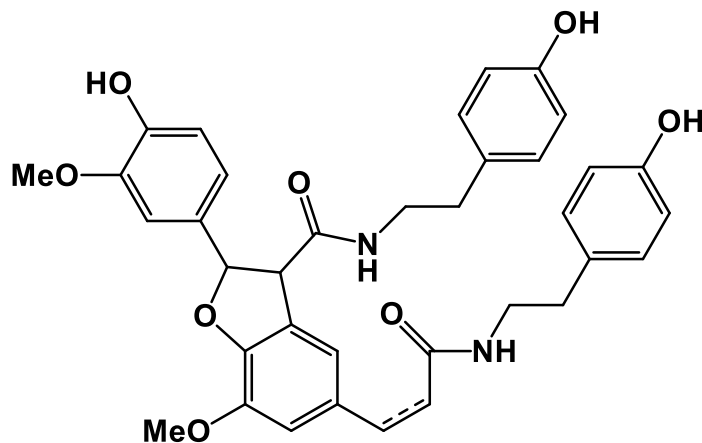
Figura 39 – Cromatograma (A) do tratamento 15 e espectro de massas nos tempos de retenção 9,1 min (B), 9,7 min (C), 10,3 min (D) e 10,6 min (E)



Fonte: Bolleddula et al., 2012

Esses pesquisadores identificaram, a partir de análises por LC-HRMS, em frutas de *Withania somnifera*, dois isômeros cis/trans grossamida (Figura 40), os quais apresentam fórmula molecular $C_{36}H_{36}N_2O_8$, m/z 625.2538 $[M+H]^+$ e íons fragmentos m/z 488.1704, 462.1913, 351.0865 e 325.1072.

Figura 40 – Fórmula estrutural da cis/trans grossamida



Sun e colaboradores (2015) ao investigarem fitoquimicamente a espécie *Solanum melongena* L, perceberam um perfil de espectro de massas semelhante à grossamida (**8**), mas que foi identificada como canabinisa F (**14**). Essa lignanamida também foi encontrada em *Solanum nigrum* L. e seu efeito neuroprotetivo foi comprovado em células SH-SY5Y (LI et al., 2019).

Estudos recentes em sementes de cânhamo, utilizando as técnicas de HR-MS/MS de modo negativo, identificaram a presença de amidas fenilpropanoides e seus derivados, as lignanamidas, dentre elas, a grossamida (8) e canabisina (14), que também apresentaram íons fragmentos semelhantes. Utilizando observações de MS e de espectros UV-DAD, esses isômeros foram supostamente identificados. O extrato foi avaliado quanto à sua atividade anticancerígena, inibindo a proliferação de células U-87 (NIGRO et al., 2020).

A canabisina F (**14**) também é um isômero da grossamida (**8**), mas apresenta diferentes íons fragmentos quando comparados com a grossamida, como observado na Tabela 6.

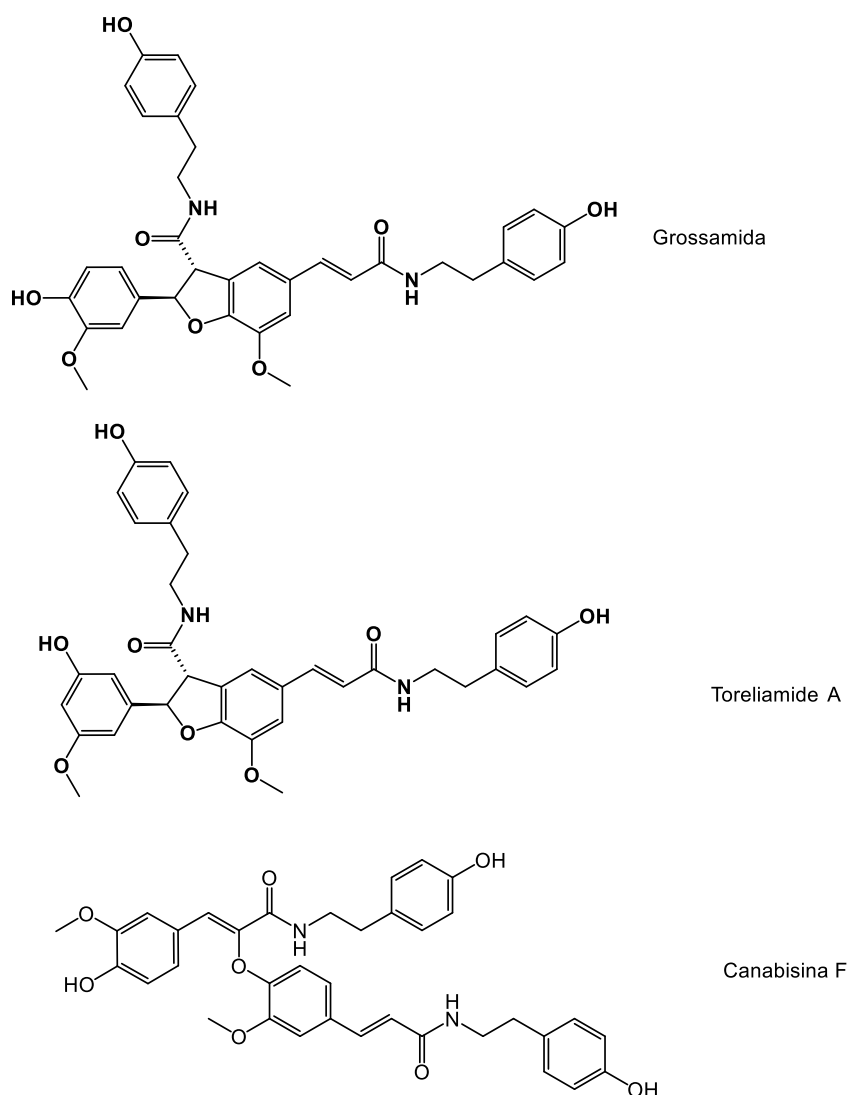
Tabela 6 – Comparação da fragmentação de massas de compostos com mesma massa exata 625,2544

Composto	<i>m/z</i> , [M+H] ⁺		Fórmula molecular [M+H] ⁺	Fragmentos observados MS e MS/MS (<i>m/z</i>)	Referência
	Observada	Calculada			
Cis-grossamida	625.2546	625.2544	C ₃₆ H ₃₇ N ₂ O ₈	488.1699, 462.1909, 351.0865, 325.1072	Bolleddula et al. (2012)
Trans-Grossamida	625.2538	625.2544	C ₃₆ H ₃₇ N ₂ O ₈	488.1704, 462.1913, 351.0867, 338.1392, 325.1076	Bolleddula et al. (2012)
Canabisina F	625.2521	625.2544	C ₃₆ H ₃₇ N ₂ O ₈	488,377, 298, 164, 136	Xu et al. (2018)

Karim et al. (2011) legitimaram também a semelhança dos espectros MS/MS entre as lignanamidas grossamida (**8**) e toleriamida A (**15**), ambas com massa exata $[M+H]^+$ 625.2544. Inclusive, descreveram a dificuldade de identificá-los por espectrometria de massas, pois são isômeros de posição. A toreliamida A é uma lignanamida ainda pouco estudada. Na literatura, ela só foi descrita em duas espécies: *Chloranthus angustifolius* Oliv. (LIU, 2015), e *Mitrephora thorelii* (GE; THANG; YE, 2008), nenhuma delas do gênero *Solanum*.

As quatro substâncias possuem a mesma massa exata e íons fragmentos semelhantes, assim, foi realizada uma análise mais detalhada dos dados de espectrometria de massas e da literatura para a fórmula molecular $C_{36}H_{36}N_2O_8$ com massa exata 625.2544, que apontou três possibilidades: grossamida (**8**), toreliamida A (**15**) e canabisina F (**14**) (Figura 41).

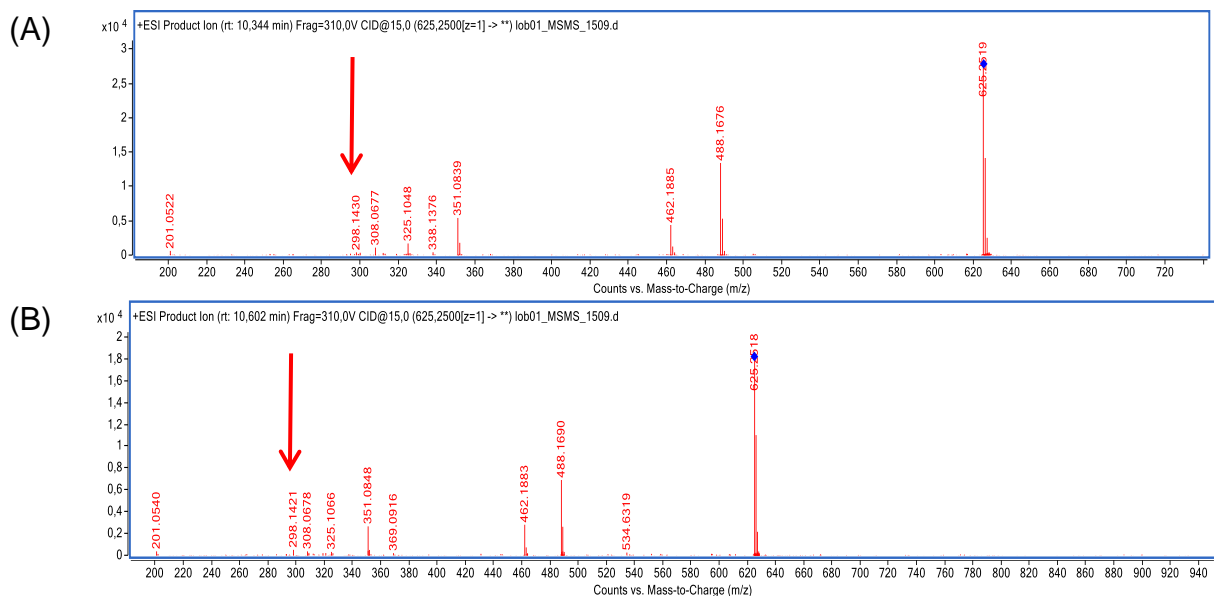
Figura 41 – Fórmulas estruturais de grossamida, toleriamida A e canabisina F



A grossamida (**8**) e toleriamida A (**14**) são isômeros de posição e, por espectrometria de massas, não podem ser identificadas de maneira inequívoca.

Verificando as fragmentações de massas das substâncias cujos tempos de retenção são 10,3 e 10,6 min do extrato etanólico bruto, observou-se o fragmento 298 (Figura 42), indicando a possibilidade da presença de canabina F (**14**) nessa amostra (Xu et al., 2018).

Figura 42 – Espectro MS/MS do extrato etanólico bruto com íon fragmento 298, nos tempos de retenção 10,3 (A) e 10,6 min (B)



Observando os dados de espectros UV obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, cuja fase móvel utilizada foi ACN: H₂O, pode-se afirmar que as lignanamidas estão presentes em extrato etanólico bruto de *S. lycocarpum*. Os compostos foram selecionados em comparação com características espectrais de UV de metabólitos de mesma classe dos compostos de interesse, em que os máximos de absorvância e t_R estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Dados UV de possíveis lignanamidas encontradas no extrato etanólico bruto de *S. lycocarpum*

Tempo de retenção (t_R)	UV λ_{max} (nm)
2,21	187, 292, 328
5,84	197, 206, 293, 318
10,72	197, 220, 292, 317
20,53	196, 225, 297

Zhou e colaboradores (2018) identificaram lignanamidas em extratos de sementes de *Cannabis sativa* L., através das análises realizadas por cromatografia de camada gasosa, e obtiveram máximos de absorbância UV apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Dados UV de algumas lignanamidas encontradas em sementes de *Cannabis sativa* L.

Composto	UV λ_{max} (nm)	Peso molecular	Fórmula Molecular
N-trans-caffeoilytyramine	220, 290, 320	299	$C_{17}H_{17}NO_4$
canabisina C	225, 245, 285, 335	610	$C_{35}H_{34}N_2O_8$
canabisina D	222, 245, 285, 335	624	$C_{36}H_{36}N_2O_8$
canabisina E	221, 281, 315	642	$C_{36}H_{38}N_2O_9$
canabisina F	221, 285, 320	624	$C_{36}H_{36}N_2O_8$
Grossamida	221, 285, 300, 320	624	$C_{36}H_{36}N_2O_8$
3,3'-dimetil-grossamida	225, 285, 300, 320	596	$C_{34}H_{32}N_2O_8$

Comparando-se os dados exibidos nas Tabelas 7 (amostra) e Tabela 8 (literatura), pode-se verificar a semelhança dos máximos de absorbância, fato esse que se confirma com presença de lignanamidas em células de *S. lycocarpum*.

Com relação à substância isolada, os espectros de RMN de 1H mostraram dois sinais característicos na região de hidrogênios aromáticos; hidrogênios de

ligação dupla; um hidrogênio ligado a grupamento nitrogenado; além de três grupos metilênicos.

A Tabela 9 apresenta os dados espectrais em comparação com os dados espectrais da *N*-cafeoil-putrescina da literatura (MORIMOTOA et al., 2018).

Tabela 9 – Dados de RMN ¹H e ¹³C da *N*-cafeoil-putrescina em comparação com a *N*-cafeoil-putrescina da literatura

	N-cafeoil-putrescina (DMSO-d ₆)		N-cafeoil-putrescina *(CD ₃ OD)
	¹ H (δ)	¹³ C (ppm)	¹ H (δ)
C-1	-	145,7	-
C-2	-	147,4	-
C-3	6,74 (1H, d, J=8.2 Hz)	115,7	6.76 (1H, d, J=8.2 Hz)
C-4	6,82 (1H, dd, J=2.1 Hz, 8.2 Hz)	120,2	6,89 (1H, dd, J=2.1 Hz, 8.2 Hz)
C-5	-	126,3	-
C-6	6,9 (1H, d, J=2.1 Hz)	113,8	6,99 (1H, d, J=2.1 Hz)
C-7	7,23 (1H, d, J=15.7 Hz)	139,0	7,38 (1H, d, J=15.7 Hz)
C-8	6,33 (1H, d, J=15.7 Hz)	118,4	6,34 (1H, d, J=15.7 Hz)
C-9	-	165,0	-
C-10	1,5 (4H, m)	26,0	1,66 (4H, m)
C-11	3,1 (2H, t, J=7.4 Hz)	37,6	3,32 (2H, t, J=7.4 Hz)
C-12	2,75 (2H, t, J=7.4 Hz)	38,6	2,94 (2H, t, J=7.4 Hz)
C-13	1,5 (4H, m)	26,0	1,66 (4H, m)

Fonte: MORIMOTOA et al. (2018)

A análise dos espectros de massas da amostra L1 apresentou duas substâncias com t_R 3.41 e 1.90 min, ambas apresentando m/z 251.1 e 251.3, respectivamente e fragmentos m/z 234, 163, 145, 89 e 72. A comparação dos dados de espectrometria de massas (MS e MS/MS) com os da literatura (VOYNIKOV et al., 2016; ALMOULAH et al., 2017) (Tabela 10), além dos dados de RMN, pode-se concluir de ambas substâncias são isômeros de *N*-cafeoil-putrescina, C₁₃H₁₈N₂O₃, a qual faz parte da família de HCAAs.

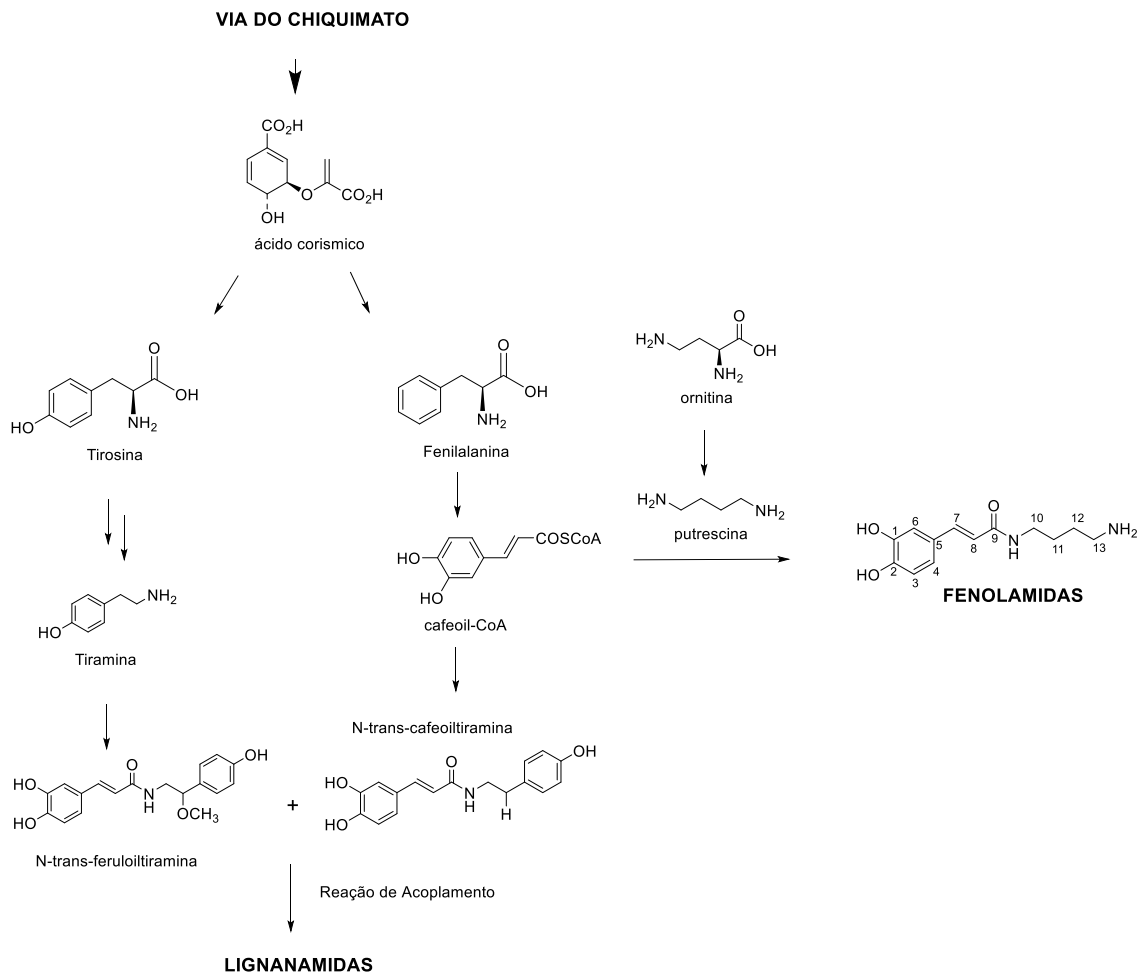
Tabela 10 – Dados de MS e MS/MS das substâncias com t_R 1.90 e 3.41 min. da amostra L1 em comparação com a N-cafeoil-putresina da literatura^{a,b}

Nome	t_R (min)	Amostra L1	Literatura 1 ^A	Literatura 2 ^B	
N-cafeoil putresina	1.90	[M+H] 251.1 251.3, 234.1, 163.1, 145.1, 135.0, 89.0, 71.9	[M+H] 251.13901	251.14, 163.04, 115.09, 89.11, 72.08	251.14, 234.11, 163.04, 115.09, 89.11, 72.08
	3.41	[M+H] 251.3 251.3, 233.9, 163.1, 145.0, 89.0, 71.5			

Fonte: ^AVoynikov et al., 2016; ^BAlmoulah et al., 2017

Lignanamidas e fenolamidas já foram identificadas em diversas espécies de *Solanum*, como já relatado anteriormente. Estudos da literatura, já pontuados neste trabalho, mostraram que a via biossintética de ambas as classes é a via do chiquimato, que sofre uma ramificação do ácido corísmico em dois aminoácidos: Tirosina, que é um precursor da N-trans-feruloiltiramina, e Fenilalanina, precursora do Cafeoil-CoA. A partir daí, a via de biossíntese pode passar por outra ramificação, em que o Cafeoil-CoA dá origem às fenolamidas e à N-trans-cafeoil-tiramina, essa, acoplada à N-trans-feruloiltiramina, forma as lignanamidas, conforme esquema de biossíntese da Figura 43.

Figura 43 – Esquema da via do chiquimato para formação de lignanamidas e fenolamidas



6.2 ELICITAÇÃO PARA IMPULSIONAR A PRODUÇÃO DE LIGNANAMIDAS

Para impulsionar a produção de lignanamidas, nossos metabólitos de interesse, experimento de elicitação biótico e abiótico foi realizado em células de *S. lycocarpum* em suspensão.

Metabólitos secundários, por vezes, são produzidos em pequenas quantidades em culturas de células desdiferenciadas. Sua produção em maior escala pode ser obtida com elicitores, tais como metiljasmonato, quitosana, entre outros (NAMDEO, 2007).

Vários extratos fúngicos se mostram elicitores mais eficientes que quitosana e quitina puras. Dentre os metabólitos que tiveram sua produção aumentada estão lignanas em suspensões celulares em espécies *Linum* (RAMIRESZ-ESTRADA et al., 2016).

Em culturas celulares, a utilização de elicitores abióticos, como o metiljasmonato (MeJa) pode aumentar o rendimento de biocompostos de interesse farmacológico. Um dos casos em que esse elicitor aumenta a produção de compostos de suma relevância para a indústria farmacêutica é em culturas de células de *Taxus*, em que se aumenta a produção de taxanos e taxol (VIDAL-LIMON, 2018).

A dose e tempo ideais de exposição ao elicitor MeJa para uma ação efetiva são determinadas por estudos empíricos, sendo que o estágio da cultura no momento do tratamento do elicitor, idade, duração da exposição e concentração de elicitores são fatores decisivos para o sucesso de acúmulo de biomassa e metabólitos secundários (MURTHY; LEE; PAEK, 2014).

MA e colaboradores (2017) elicitarão células em suspensão de *Jerusalem artichoke* com vários elicitores, entre eles MeJa em concentrações de 25 a 300 μM L^{-1} e extrato de fungo *Trichoderma viride* de 30 a 150 mgL^{-1} , com três repetições.

Comparando-se células de lobeira elicidadas (amostra 7 – elicitada com fungo e amostra 6 elicitada com MeJa) com células sem elicitação (amostras 1 e 2) e meios (amostras 8 do fungo e 5 do MeJa) com meios de células sem elicitação (amostras 8 e 5), pode-se observar que as maiores áreas do pico cujo tempo de retenção é 9,7 minutos foram as áreas dos tratamentos 1, 2 e 4, que são respectivamente o extrato de células para controle do fungo (sem elicitação), extrato de células para controle do MeJa e meio de cultura sem adição de MeJa. Conclui-se também que com maior concentração de MeJa, não há composto de interesse nas células em suspensão.

Essa supressão da produção da lignanamida de t_R 9,7 min pela adição dos elicitores MeJa (500 μM) e extrato de fungo (100 $\mu\text{g/mL}$) deve-se ao fato de que os elicitores, nessas concentrações, desviaram a via metabólica para a produção de outros compostos.

Observou-se que a elicitação de células com menor concentração de extrato de fungo (10 $\mu\text{g/mL}$) foi mais eficiente em relação à elicitação de maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$) (amostra 15 x amostra 7), pois houve um aumento de aproximadamente 7 (sete) vezes em relação às áreas do pico. Esse experimento com fungo também possibilitou que as células secretassem metabólito de interesse para o meio.

Apenas as células elicidadas com metil jasmonato 50 μM (tratamento 13), tiveram área menor do que a área do experimento de controle. No entanto, a área do

pico para a amostra de meio de cultura após elicitação com MeJa 50 μM foi a maior do experimento, provando que, essa concentração foi a mais eficiente para obtenção do produto estudado, além de excretar para o meio o metabólito alvo.

O tratamento 6 (elicitação de células com MeJa 500 μM) não apresentou o íon precursor 625,25, aparecendo apenas no tratamento 13, no qual se utilizou 50 μM de metiljasmonato em células.

Nos meios de cultura, houve uma duplicação da área do pico com a utilização de extrato de fungo 10 $\mu\text{g/mL}$, o que foi comparado com o meio após adição de extrato de fungo 100 $\mu\text{g/mL}$.

O resultado comparando-se os meios de cultura após adição de metiljasmonato também não foi diferente. Houve um aumento de aproximadamente cinco (5) vezes da área do pico ao utilizar o elicitor em concentração 50 μM , quando comparado à concentração do elicitor de 500 μM .

Entre os elicitores, propôs-se a comparação apenas em concentrações menores de elicitores para células, pois o tratamento 6 (metiljasmonato em concentração 500 μM) não apresentou o composto de m/z 625,25, aparecendo apenas no tratamento 7 (adição de 100 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de fungo). Os tratamentos 13 e 15 (MeJa 50 μM e extrato de fungo 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), também de células, apresentaram maior área do pico para concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de fungo.

Explorando os meios com elicitores, o meio da elicitação com extrato de fungo 100 $\mu\text{g/mL}$ apresenta área seis (6) vezes maior que de metiljasmonato 500 μM (tratamentos 5 e 8). A área para o tratamento de concentração 50 μM metiljasmonato é 3,7 vezes maior, se comparada ao tratamento com extrato de fungo 10 $\mu\text{g/mL}$ (14 e 16).

A melhor condição de elicitação foi utilizando-se MeJa 50 μM . A adição desse elicitor, nessa concentração, possibilitou uma maior permeabilidade da parede celular, sendo a lignanamida de t_R 9,7 min excretada para o meio de cultura, representando um aumento da área do pico de aproximadamente 147% quando comparada à área do pico do meio de cultura do experimento controle para MeJa. Comparando-se meio de cultura e células elicitadas, obteve-se um aumento de 23,3% da área total do pico em relação ao experimento controle. Como o composto de interesse foi, em sua grande parte, excretado para o meio, esse experimento de

elicitação, possibilitará o reaproveitamento das células para futuros experimentos de elicitação e ampliação de escala.

8 CONCLUSÕES

A inserção de explante de folhas de *S. lycocarpum* promoveu a propagação de calos friáveis. Os calos de *S. lycocarpum* adaptaram-se muito bem às condições de cultivo em suspensão, constituindo-se uma fonte adequada para a produção contínua e monitorada de metabólitos bioativos.

Análises fitoquímicas foram realizadas em extrato alcóolico bruto de células de lobeira para estabelecimento do perfil químico de constituintes com potencial bioatividade. As análises por cromatografia líquida não comprovaram a presença de glicoalcaloides esteroidais, mas comprovaram a presença de quatro lignanamidas, de m/z 625,2544 e por serem isômeros, apenas por técnica de MS e MS/MS não podem ser identificadas. Essas lignanamidas podem ser grossamida (cis/trans) ou toleriamida A (isômera de posição da grossamida), ambas lignanamidas com esqueleto dihidrobenzofurano ou canabisina F (cis/trans), lignanamida do tipo fenilpropeno, isômera de cadeia da grossamida. Grossamida e canabisina F já foram encontradas em outras espécies de *Solanum*, já a toreliamida, foi descrita apenas em três espécies, nenhuma delas do gênero *Solanum*.

Além das lignanamidas, foi identificada, por RMN e comprovada em espectrometria de massas, uma amida de ácido hidroxicinâmico, denominada N-cafeoil-putrescina. Essas fenolamidas já foram encontradas em outras espécies de *Solanum*, mas é a primeira vez que foi identificada em *Solanum lycocarpum*.

Nos experimentos de elicitação, as análises de cromatográficas evidenciaram um aumento da área do pico da lignanamida de tempo de retenção 9,7 para a amostra elicitada com metil jasmonato 50 μ M, inserida no 22º dia de cultura e tempo de exposição ao agente elicitor de 7 dias. Comparando-se o meio de cultura da amostra elicitada com o meio de cultura da amostra controle, obteve-se 147% de aumento da área do pico da lignanamida alvo. A área total desse pico das amostras de meio de cultura e de células elicitadas em comparação com as amostras controle, apresentaram um aumento de 23%. Além do aumento da área do pico da lignanamida de t_R 9,7 min, o elicitor MeJa foi um eficiente permeabilizador da parede celular, sendo a substância alvo excretada para o meio, possibilitando futuros experimentos para obtenção de lignanamidas no meio de cultura e que reutilizem as células de *S. lycocarpum*.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Syed Abrar; BAIG, Mirza Mushtaq Vaseem. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**. V. 21, P. 499–504, 2014.
- AL SINANI, S.S.S.; ELTAYEB, E.A. The steroidal glycoalkaloids solamargine and solasonine in *Solanum* plants. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 253–269, 2017.
- ALMOULAH, N. Fadl; VOYNIKOV, Y.; GEVRENOVA, R.; SCHOHN, H.; TZANOVA, T.; YAGI, S.; THOMAS, J.; MIGNARD, Thomas; AHMED, A.A.A.; EL SIDDIG, M.A.; SPINA, R.; LAURAIN-MATTAR, D. Antibacterial, antiproliferative and antioxidant activity of leaf extracts of selected Solanaceae species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 368–374, 2017.
- ANDRE; Christelle M.; HAUSMAN, Jean-Francois; GUERRIERO, Gea. *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. **Frontiers in Plant Science**. v. 7, Article 19, 2016.
- ANTONIO, A. S.; WIEDNEMANNA, L. S. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. **Royal Society Chemistry Advances**, v. 8, p. 25767–25784, 2018.
- ANTONIOUS, George Fouad; TURLEY, Eric; MISHRA, Bijesh; HEIST, Quinn; UPADHYAYA, Yogendra; TRIVETTE, Thomas; NKUWI, Trivette. Characterization of eggplant grown in animal manure amended soil. *International Journal of Environmental Health Research*, v. 30, n. 5, p. 492–503, 2020.
- BARROS, R. P. C.; CUNHA, E.V. L.; CATÃO, R. M. R.; SCOTTI, L.; SOUZA, M. S. R.; BRÁS, A. A. Q.; SCOTTI, M. T. Virtual screening of secondary metabolites of the genus *Solanum* with potential antimicrobial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 686–691, 2018.
- BOLLEDDULA, Jayaprakasam; FITCH, William; VAREED, Shaiju K.; NAIR, Muraleedharan G. Identification of metabolites in *Withania somnifera* fruits by liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 26, p. 1277–1290, 2012.
- BURGER, Trevor; MOKOKA, Tsholofelo; FOUCHÉ, Gerda; STEENKAMP, Paul; STEENKAMP, Vanessa; CORDIER, Werner. Solamargine, a bioactive steroidal alkaloid isolated from *Solanum aculeastrum* induces non-selective cytotoxicity and Pglycoprotein inhibition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, 137 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2208-7>. Acesso em 18 jul 2020.
- CALF, Onno W.; LORTZING, Tobias; WEINHOLD, Alexander; POESCHL, Yvonne; PETERS, Janny L.; HUBER, Heidrun; STEPPUHN, Anke; VAN DAM, Nicole M. Slug Feeding Triggers Dynamic Metabolomic and Transcriptomic Responses Leading to Induced Resistance in *Solanum dulcamara*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, art. 803, p. 1-15, 2020.

CARDOSO, Jean Carlos; OLIVEIRA, Maria Eduarda B S; CARDOSO, Fernanda de C I. 2019. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, p.124-132, 2019.

CARDULLO, Nunzio; PULVIRENTI, Luana; SPATAFORA, Carmela; MUSSO, Nicolò; BARRESI, Vincenza; CONDORELLI, Daniele Filippo; TRINGALI, Corrado. Dihydrobenzofuran Neolignanamides: Laccase-Mediated Biomimetic Synthesis and Antiproliferative Activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 8, p. 2122-2134, 2016.

CHAM, Aruba; CHAM, Bill. Treatment of Skin Cancer with a Selective Apoptotic-Inducing CuradermBEC5 Topical Cream Containing Solasodine Rhamnosides. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, p. 326-333, 2015.

CHAVES FILHO, Jales Teixeira; STACCIARINI-SERAPHIN, Eliane. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.2, p.199-204, jun. 2001.

CHEN, Hui; LIC, Yu-Jie; SUN, Yan-Jun; GONG, Jian-Hong; DU, Kun; Zhang, Yan-Li; SU, Cheng-Fu; HANC, Qian-Qian; ZHENG, Xiao-Ke; FENG, Wei-Sheng. Lignanamides with potent antihyperlipidemic activities from the root bark of *Lycium chinense*. **Fitoterapia**, v. 122, p.119–125, 2017.

CLERICI, M.T.P.S.; et al. Physical, chemical and technological characteristics of *Solanum lycocarpum* A. St. - HILL (Solanaceae) fruit flour and starch. **Food Research International**, v. 44, p. 2143–2150, 2011.

COPPEDE, Juliana S.; PINA, Edieidia S.; PAZ, Tiago A.; FACHIN, Ana L.; MARINS, Mozart A.; BERTONI, Bianca W.; FRANÇA, Suzelei C.; PEREIRA, Ana Maria S. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 33–43, 2014.

COSTA, Guilherme Augusto Ferreira da; MORAIS, Melissa Grazielle; SALDANHA, Aline Aparecida; SILVA, Izabela Caputo Assis; ALEIXO, Alan Alex; FERREIRA, Jaqueline Maria Siqueira; SOARES, Adriana Cristina; DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício; LIMA, Luciana Alves Rodrigues dos Santos. Antioxidant, Antibacterial, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Potential of the Leaves of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (Solanaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, artigo ID 315987, p. 1-8, 2015.

CRESCENTE, Giuseppina; PICCOLELLA, Simona; ESPOSITO, Assunta; SCOGNAMIGLIO, Monica; FIORENTINO, Antonio; PACIFICO, Severina. Chemical composition and nutraceutical properties of hempseed: an ancient food with actual functional value. **Phytochemistry Review**, v. 17, n.4, p. 733–749, 2018.

DIAS, Maria Inês; SOUSA, Maria João; ALVES, Rita C.; FERREIRA, Isabel C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9–22, 2016.

DONG, Xuekui; GAO, Yanqiang; CHEN, Wei; WANG, Wensheng; GONG, Liang; LIU, Xianqing; LUO, Jie. Spatiotemporal Distribution of Phenolamides and the Genetics of Natural Variation of Hydroxycinnamoyl Spermidine in Rice. **Molecular Plant**, v. 8, p. 111–121, 2015.

ENG, F; GUTIÉRREZ-ROJAS, M; FAVELATORRES, E. Culture conditions for jasmonic acid and biomass production by *Botryodiplodia theobromae* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 715-720, 1998.

FEHÉR, Attila. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-11, 2019.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14805>>. Acesso em: 7 Jul. 2019.

GAIKWAD, Asmita V.; SINGH, S. K.; GILHOTRA, Ritu. Plant tissue culture - a review. **Journal of Pharmaceutical Research & Education**, v. 2, n. 1, p. 217-220, 2017.

GHATAK, Arindam; CHATURVEDI, Palak; PAUL, Puneet; AGRAWAL, Ganesh Kumar; RAKWAL, Randeep; KIM, Sun Tae; WECKWERTH, Wolfram; GUPTA, Ravi. Proteomics survey of Solanaceae family: Current status and challenges ahead. **Journal of Proteomics**, v. 169, p. 41–57, 2017.

GAO, Kai; MA, Dongwei; CHENG, Yan; TIAN, Xiangrong; LU, Yunyang; DU, Xiaoying; TANG, Haifeng; CHEN, Jianzong. Three new dimers and two monomers of phenolic amides from the fruits of *Lycium barbarum* and their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 1067–1075, 2015.

GE, Fan; TANG, Chun-Ping; YE, Yang. Lignanamides and Sesquiterpenoids from Stems of *Mitrephora thorelii*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 1023-1030, 2008.

GELLEN, Luís Fernando Albarello; TAVARES, Aline Torquato; ALVES, Francielly Quitéria Guimarães; MELO, Marllós Peres de; MOMENTÉ, Valéria Gomes; NASCIMENTO, Ildon Rodrigues do. Viabilidade de extratos etanólicos de folhas de lobeira (*Solanun lycocarpum* St. Hill) no controle de fungos de interesse médico. **Revista Cereus**, v. 10, n. 1, p. 78-90, 2018.

GELLEN, Luís Fernando Albarello; TAVARES, Aline Torquato; MOMENTÉ, Valéria Gomes; FERREIRA, Tiago Alves; COELHO, Renato Sales; NASCIMENTO, Ildon Rodrigues. Viabilidade de extratos etanólicos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) no controle de bactérias de interesse médico. **Biota Amazônia**, v. 9, n. 3, p. 24-29, 2019.

GRANDI, Telma Sueli Mesquita. **Tratado das plantas medicinais** (recurso eletrônico): mineiras, nativas e cultivadas. 1ª ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014.

HAIDA, Zainol; SYAHIDA, Ahmad; ARIF, Syed Mohd; MAZIAH, Mahmood; HAKIMAN, Mansor. Factors Affecting Cell Biomass and Flavonoid Production of *Ficus deltoidea* var. *kunstleri* in Cell Suspension Culture System. **Nature Scientific Reports**, v. 9, n. 9533, p. 1-8, 2019.

HORINCAR, Georgiana; ENACHI, Elena; BOLEA, Carmen; RÂPEANU, Gabriela; APRODU, Iuliana. Value-Added Lager Beer Enriched with Eggplant (*Solanum melongena* L.) Peel Extract. **Molecules**, v. 25, n. 731, p. 1-12, 2020.

IM, Kyungtaek; LEE, Ji Yeon; BYEON, Hyeyoung; HWANG, Kwang Woo; KANG, Wonku; WHANG, Wan Kyunn; MIN, Hyeyoung. *In Vitro* antioxidative and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of eggplant (*Solanum melongena*) stalks in macrophage RAW 264.7 cells. **Food and Agricultural Immunology**, v. 27, N. 6, p. 758–771, 2016.

KARIM, Aman; FATIMA, Itrat; HUSSAIN, Saghir; MALIK, Abdul. Dimorphamides A–C, new polyphenolic amides from *Atriplex dimorphostagia*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, p. 528-533, 2011.

KAUNDA, Joseph Sakah; ZHANG, Ying-Jun. The Genus *Solanum*: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Biological Properties Review. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, n. 2, p. 77–137, 2019.

KING, Russell R.; CALHOUN, Larry A. A feruloyltyramine trimer isolated from potato common scab lesions. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2187–2189, 2010.

LI, Chen-Xi; SONG, Xiao-Yu; ZHAO, Wen-Yu; YAO, Guo-Dong; LIN, Bin; HUANG, Xiao-Xiao; LI, Ling-Zhi; SONG, Shao-Jiang. Characterization of enantiomeric lignanamides from *Solanum nigrum* L. and their neuroprotective effects against MPP⁺-induced SH-SY5Y cells injury. **Phytochemistry**, v. 161, p.163–171, 2019.

LI, Sha-Sha; LI, Ke-Ke; XU, Fei; TAO, Li; YANG, Li; CHEN, Shu-Xiao; GONG, Xiao-Jie. A Strategy for Simultaneous Isolation of Less Polar Ginsenosides, Including a Pair of New 20-Methoxyl Isomers, from Flower Buds of *Panax ginseng*. **Molecules**, v. 22, p. 1-14, 2017.

LI, Zaifang; ZHAO, Chunxia; ZHAO, Xinjie; XIA, Yueyi; SUN, Xiaoshan; XIE, Wenyan; YE, Yaorui; LU, Xin; XU, Guowang. Deep Annotation of Hydroxycinnamic Acid Amides in Plants Based on Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–HighResolution Mass Spectrometry and Its In Silico Database. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 14321–14330, 2018.

LIU, Chunjie; LI, Guanhua; HUANG, Rui; LI, Youzhi; DING, Wenbing. Chemotaxonomic significance of sesquiterpenes and amide derivatives from *Chloranthus angustifolius* Oliv. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 58, p. 30–33, 2015.

LIU, Ze-Bo; CHEN, Ji-Guang; YIN, Zhong-Ping; SHANGGUAN, Xin-Chen; PENG, Da-Yong; LU, Tao; LIN, Ping. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in *Gardenia jasminoides*

cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, p. 79–93, 2018.

LOURENÇO, Miriam Verginia; SOARES, Wellington Soares, BERTONI, Bianca Waleria; OLIVEIRA, Ana Paula Oliveira; PEREIRA, Sarazete Izidia Vaz; PEREIRA, Ana Maria Soares; FRANÇA, Suzelei Castro, Eliciting effect of jasmonates from *Botryosphaeria rhodina* enhances coumarin production in *Mikania laevigata* plants. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 125, p. 595–598, 2016.

LUO, Qian; YAN, Xiaoli; BOBROVSKAYA, Larisa; JI, Mei; YUAN, Huiqing; LOU, Hongxiang; FAN, Peihong. Anti-neuroinflammatory effects of grossamide from hemp seed via suppression of TLR-4-mediated NF- κ B signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 428, p.129–137, 2017.

MA, Chunquan; ZHOU, Dong; WANG, Haitao; HAN, Dongming; WANG, Yang; YAN, Xiufeng. Elicitation of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) cell suspension culture for enhancement of inulin production and altered degree of polymerisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v, 97, p. 88–94, 2017.

MAGOULAS, George E.; PAPAIOANNOU, Dionissios. Bioinspired syntheses of dimeric hydroxycinnamic acids (lignans) and hybrids, using phenol oxidative coupling as key reaction, and medicinal significance there of. **Molecules**, v. 19, p. 19769-19835, 2014.

MAMUN, Nazmul H. A.; EGERTSDOTTER, Ulrika; AIDUN, Cyrus K. Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. **Frontiers in Biology**, v. 20, n. 2, p. 177–193, 2015.

MANS, D.R.A.; BEERENS, T.; MAGALI, I.; SOEKHOE, R.; SCHOONE, G.J.; OEDAIRADJSINGH, K.; HASRAT, J.A.; VAN DEN BOGAART, E.; SCHALLIG, H.D.F.H. In vitro evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 180, p. 70–77, 2016.

MARTINS, Gilmarcio; MOREIRA, Raquel; PLANETA, Cleopatra; BASTOS, Jairo; CAVALEIRO, Carlos. Effects of the extract and glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* St. Hill on *Giardia lamblia* trophozoites. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 42, p. 1-5, 2015.

MARTINS, José L. R.; RODRIGUES, Oscar R. L.; SOUSA, Fábio B. de; FAJEMIROYE, James O.; GALDINO, Pablinny M.; FLORENTINO, Iziara F.; COSTA, Elson A. Medicinal species with gastroprotective activity found in the Brazilian Cerrado. **Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 238–251, 2015.

MATIAS, L. J. et al. Structure and histochemistry of medicinal species of *Solanum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 147-160, 2016.

MAVITUNA, Ferda; YONO, Sung-Yong H.; PARK, Jong M. Modelling size distribution changes of plant cell aggregates during batch growth of *capsicum frutescens* suspension culture. **Chemical Engineering Science**, v.148, n. 12, Pages 1-13, 2016.

MENDOZA, Dary; CUASPUD, Olmedo; ARIAS, Juan Pablo; RUIZ, Orlando; ARIAS, Mario. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. **Biotechnology Reports**, v. 19, p. 1-9, 2018.

MORAES, Flávia Silva de; SOUZA, Mariana Lima Cerqueira de; LUCCHETTI, Giancarlo; LUCCHETTI, Alessandra Lamas Granero. Trends and disparities in the use of cholinesterase inhibitors to treat Alzheimer's disease dispensed by the Brazilian public health system – 2008 to 2014: a nation-wide analysis. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 76, n. 7, p.444-451, 2018.

MORIMOTOA, Noriko; UENOB, Kotomi; TERAISHIC, Masayoshi, OKUMOTOC, Yutaka; MORIC, Naoki; ISHIHARA, Atsushi. Induced phenylamide accumulation in response to pathogen infection and hormone treatment in rice (*Oryza sativa*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 82, n. 3 , p. 407-416 , 2018.

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

MURTHY, Hosakatte Niranjana; LEE, Eun-Jung; PAEK, Kee-Yoeup. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, Ch'ongju, v. 118, p. 1-16, 2014.

NAGUMO, Mina; NINOMIYA, Masayuki; OSHIMA, Natsuko; ITOH, Tomohiro; TANAC, Kaori; NISHINAE, Atsuyoshi; KOKETSU, Mamoru. Comparative analysis of stilbene and benzofuran neolignan derivatives as acetylcholinesterase inhibitors with neuroprotective and anti-inflammatory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 29, p. 2475–2479, 2019.

NAMDEO, Ajay G. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, 2007.

NARAYANI, M.; SRIVASTAVA, Smita. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, p.1227–1252, 2017.

NIGRO, Ersilia; CRESCENTE, Giuseppina; FORMATO, Marialuisa; PECORARO, Maria Tommasina; MALLARDO, Marta; PICOLELLA, Simona; DANIELE, Aurora; PACIFICO, Severina. Hempseed Lignanamides Rich-Fraction: Chemical Investigation and Cytotoxicity towards U-87 Glioblastoma Cells. **Molecules**, v. 25, n. 1049, p. 1-15, 2020.

NUR, Azwanida Nik. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2015.

OCHOA-VILLARREAL, Marisol; HOWAT, Susan; HONG, Sun Mi; JANG, Mi Ok; JIN Young-Woo; LEE, Eun-Kyong; LOAKE, Gary J. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v. 49, n. 3, p. 149-158, 2016.

OCHOA-VILLARREAL, Marisol; HOWAT, Susan; JANG, Mi Ok; KIM, Il Suk; JIN, Young-Woo; LEE, Eun-Kyong; LOAKE, Gary J. Cambial meristematic cells: a platform for the production of plant natural products. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 581-587, 2015.

OLIVEIRA, S. C. C. et al. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, 3. ed., p. 607-618, 2012.

OOI, Chai Theam. SYAHIDA, Ahmad; STANSIAS, Johnson; MAZIAH, Mahmood. The influence of methyl jasmonate, cholesterol and L-arginine on solasodine production in hairy root culture of *Solanum mammosum*. **Engineering in Life Sciences**. v. 16, p. 432-442, 2016.

OSENI, Ojo Michael; PANDE, Veena; NAILWAL, Tapan Kumar. A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. **International Journal of Current Microbiology and Applied**, v. 7, n. 7, p. 3778-3786, 2018.

PASQUALINI, Ana Paula de Azevedo; SANTOS, Mariely Cristine dos; SANT'ANNA-SANTOS, Bruno Francisco; FRAGA, Hugo Pacheco de Freitas; QUOIRIN, Marguerite. *In vitro* culture and diversity of endophytic fungi in *Bambusa oldhamii*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. 1-9, 2019.

PATEL, Heena; KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in Plant Tissue Culture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 2, p. 60-65, 2013.

PENG, Hui; YANG, Tianbao; WHITAKER, Bruce D; TROUTH, Frances; SHANGGUAN, Lingfei; DONG, Wen; JURICK, Wayne M. Characterization of spermidine hydroxycinnamoyl transferases from eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relative *Solanum richardii* Dunal. **Horticulture Research**, v. 3, art. 16062, p. 1-9, 2016.

PBI *Solanum* PROJECT. 2011. **Solanaceae Source**. Disponível em: <<http://solanaceaesource.org/solanaceae/solanum-lycocarpum>>. Acesso em 06 jan. 2018.

POZZATTI, Marianna; NAKADI, Flávio V.; VALE, Maria Goreti R.; WELZ, Bernhard. Simultaneous determination of nickel and iron in vegetables of Solanaceae family using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Microchemical Journal**, v. 133, p.162–167, 2017.

RAMIREZ-ESTRADA, Karla; VIDAL-LIMON, Heriberto; HIDALGO, Diego; MOYANO, Elisabeth; GOLENIOSWIKI, Marta; CUSIDÓ, Rosa M.; PALAZON, Javier. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. **Molecules**, v. 21, n.182, p. 1-24, 2016.

RAMOS, Dayane de Oliveira; SILVA, Diego Cruz da; PASCARELLI, Bernardo Miguel de Oliveira. O papel da substituição do cerrado por áreas de agropecuária e a extinção do lobo guará. **Semioses: Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade**. v.12, n. 2, p. 97-111, 2018.

RAMULIFHO, Elwlwani; GOACHE, Tatenda; VAN AS, Johann; TSILO, Toi John; CHIVASA, Stephen; NGARA, Rudo. Establishment and Characterization of Callus and Cell Suspension Cultures of Selected Sorghum bicolor (L.) Moench Varieties: A Resource for Gene Discovery in Plant Stress Biology. **Agronomy**, v. 9, n. 218, p. 1-18, 2019.

REBELO, Bárbara A.; SANTOS, Rita B.; ASCENSO, Osvaldo S.; NOGUEIRA, Ana Claudia; LOUSA, Diana; ABRANCHES, Rita; VENTURA, Maria Rita. Synthesis and biological effects of small molecule enhancers for improved recombinant protein production in plant cell cultures. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p.1-16, 2020.

SAHRAROO, Amir; MIRJALILI, Mohammad Hossein; CORCHETE, Purificación; BABALAR, Mesbah; MOGHADAM, Mohammad Reza Fattahi. Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new in vitro source of rosmarinic acid. **Cytotechnology**, v. 68, p. 1415–1424, 2016.

SAMUELS, John. Biodiversity of food species of the Solanaceae family: a preliminary taxonomic inventory of subfamily Solanoideae. **Resources**, v. 4, p. 277-322, 2015.

SHARMA, Kamlesh. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). **Molecular Medicine REPORTS**, v. 20, p. 1479-1487, 2019.

SHEI, I. V.; ANDREEVA, O. N.; POLYAKOVA, G. G.; ZRAZHEVSKAYA, G. K. Russian **Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 5, p. 634–639, 2003.

SIVANANDHAN, Ganeshan; SELVARAJ, Natesan, GANAPATHI, Andy; MANICKAVASAGAM, Markandan. Enhanced Biosynthesis of Withanolides by Elicitation and Precursor Feeding in Cell Suspension Culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in Shake-Flask Culture and Bioreactor. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. 1-12, 2014.

SMOZINSKI, Caroline Vivian; SANTOS, Maurício Reginaldo Alves dos. Indução de calos em explantes foliares, nodais e entrenodais de *Capsicum chinense* Jacq. Cultivar “Guaraci Cumari do Pará”. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**. v. 6, n.1, p. 145-155, 2019.

SUN, F. et al. Effects of glycoalkaloids from *Solanum* plants on cucumber root growth. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1534-1538, 2010.

SUN, Jing; GU, Yu-Fan; SU, Xiao-Qin; LI, Man-Man; HUO, Hui-Xia; ZHANG, Jing; ZENG, Ke-Wu; ZHANG, Qian; ZHAO, Yun-Fang; LI, Jun; TU, Peng-Fei. Anti-inflammatory lignanamides from the roots of *Solanum melongena* L. **Fitoterapia**, v. 98, p. 110–116, 2014.

SUN, Jing; SONG, Yuelin; ZHANG, Jing; HUANG, Zheng; HUO, Hui-Xia; ZHENG, Jiao; Zhang, Qian; ZHAO, Yun-Fang; LI, Jun; TU, Peng-Fei. Characterization and Quantitative Analysis of Phenylpropanoid Amides in Eggplant (*Solanum melongena* L.) by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detection and Hybrid Ion Trap-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. p. 1-38, 2015.

THAYARUBAN, T. Investigation of growth factors effect on *in vitro* culturing of *Solanum melongena*. **Indian Journal Science Research**, v. 6, n. 2, p. 119-123, 2015.

TIOSSI, R. F. J. et al. In vitro and in vivo evaluation of the delivery of topical formulations containing glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* fruits. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 28-33, 2014.

VALETTE, Marine; REY, Marjolaine; GERIN, Florence; COMTE, Gilles; WISNIEWSKI-DYE, Florence. A common metabolomic signature is observed upon inoculation of rice roots with various rhizobacteria. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 62, n. 2, p. 228-246, 2020.

VIDAL-LIMON, Heriberto R.; ALMAGRO, Lorena; MOYANO, Elisabeth; PALAZON, Javier; PEDREÑO, Maria A.; CUSIDO, Rosa M. Perfluorodecalins and hexenol as inducers of secondary metabolism in *Taxus media* and *Vitis vinifera* cell cultures. **Frontiers in Plant Science**. v. 9, 335, p. 1-15, 2018.

VOYNIKOV, Yulian; ZHELEVA-DIMITROVA, Dimitrina; GEVRENOVA, Reneta; LOZANOV, Valentin; ZAHARIEVA, Maya M.; TSVETKOVA, Iva; NAJDENSKI, Hristo; YAGI, Sakina; ALMOULAH, Nahla Fadl; MOMEKOV, Georgi. Hydroxycinnamic acid amide profile of *Solanum schimperianum* Hochst by UPLC-HRMS. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 408 p. 42–50, 2016.

WANG, Hanqing; LI, Jiaoning; TAO, Weiwei; ZHANG, Xia; GAO, Xiaojuan; YONG, Jingjiao; ZHAO, Jianjun; ZHANG, Liming; LI, Yongzhou; DUAN, Jin-ao. *Lycium ruthenicum* studies: molecular biology, phytochemistry and pharmacology. **Food Chemistry**, v. 240, p. 759–766, 2018.

XU, Silun; LIU, Yan; XIANG, Ling; ZHOU, Fan; LI, Hongyu; SU, Yongjian; XU, Xinyi; WANG, Qi. Metabolites identification of bioactive compounds daturaturin A, Daturametelin I, N-Trans-Feruloyltyramine, and Cannabisin F from the seeds of *Datura metel* in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-9, 2018.

YAN, Xiaoli; TANG, Jiajing; PASSOS, Carolina dos Santos; NURISSO, Alessandra; SIMÕES-PIRES, Claudia Avello; JI, Mei; LOU, Hongxiang; FAN, Peihong. Characterization of Lignanamide from Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed and their antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 63, n. 49, p. 10611-10619, 2015.

YANG, Bing-You; YIN, Xin; LIU, Yan; YE, Hong-Liang; ZHANG, Mei-Ling; GUAN, Wei; KUANG, Hai-Xue. Bioassay-guided isolation of lignanamides with potential anti-inflammatory effect from the roots of *Solanum melongena* L. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 160–164, 2019.

YOSHIHARA, Teruhiko; YAMAGUCHI, Katsuyoshi; TAKAMATSU, Seiji; SAKAMURA, Takamatsu. A New Lignan Amide, Grossamide, from Bell Pepper (*Capsicum annuum* var. *grossurri*). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2593-2598, 1981.

ZHANG, Bin; HUANG, Rizhen; HUA, Jing, LIANG, Hong; PAN, Yingming; DAI, Lumei; LIANG, Dong; WANG, Hengshan. Antitumor lignanamides from the aerial parts of *Corydalis saxicola*. **Phytomedicine**, v. 23, p. 1599–1609, 2016.

ZHANG, Jing-Xian; GUAN, Shu-Hong; FENG, Rui-Hong; WANG, Yang; WU, Zhi-Yuan; ZHANG, Yi-Bei; CHEN, Xiao-Hui; BI, Kai-Shun; GUO, De-Na. Neolignanamides, Lignanamides, and Other Phenolic Compounds from the Root Bark of *Lycium chinense*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 1, p. 51-58, 2013.

ZHANG, LEI; CHEN, Junfeng; ZHOU, Xun; CHEN, Xiaofei; LI, Qing; TAN, Hexin; DONG, Xin; XIAO, Ying; CHEN, Langdong; CHEN, Wansheng. Dynamic metabolic and transcriptomic profiling of methyl jasmonate-treated hairy roots reveals synthetic characters and regulators of lignan biosynthesis in *Isatis indigotica* Fort. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, p. 2217–2227, 2016.

ZHOU, Yuefang; WANG, Shanshan; JI, Jianbo; LOU, Hongxiang; FAN, Peihong. Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Phenylpropionamides Composition and Effects on Memory Dysfunction and Biomarkers of Neuroinflammation Induced by Lipopolysaccharide in Mice. **ACS Omega**, v, 3, 15988–15995, 2018.