

Universidade de Ribeirão Preto
- UNAERP -
Doutorado em Biotecnologia

Elicitação química e biológica visando à modulação da biossíntese dos triterpenos quinonametídeos em *Monteverdia floribunda* (Reissek) Biral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Aparecida Lopes
Doutoranda: Mayara Valdevite

Ribeirão Preto
Julho, 2020

MAYARA VALDEVITE

Elicitação química e biológica visando à modulação da biossíntese dos triterpenos quinonametídeos em *Monteverdia floribunda* (Reissek) Biral

Tese apresentada à Universidade de Ribeirão Preto UNAERP, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Aparecida Lopes

Ribeirão Preto

2020

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

V145e Valdevite, Mayara, 1986-
Elicitação química e biológica visando à modulação da
biossíntese dos triterpenos quinonametídeos em *Monteverdia
floribunda* (Reissek) Biral / Mayara Valdevite. - - Ribeirão Preto,
2021.

103 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2021.

1. Triterpenos quinonametídeos. 2. Celastraceae. 3. *Monteverdia
floribunda*. 4. Elicitação. 5. Endofítico. I. Título.

CDD 660.6

MAYARA VALDEVITE

ELICITAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA VISANDO À MODULAÇÃO DA
BIOSSÍNTESE DOS TRITERPENOS QUINONAMETÍDEOS EM MONTEVERDIA
FLORIBUNDA (REISSEK) BIRAL.

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: 30 de julho de 2020

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



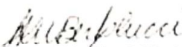
Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



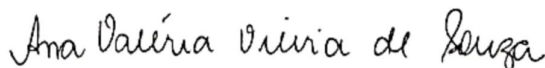
Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Sílvia Helena Taleb Contini
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Universidade Federal de Lavras - UFLA



Profa. Dra. Ana Valéria Vieira de Souza
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

SUMÁRIO

	RESUMO.....	1
	ABSTRACT.....	2
1	INTRODUÇÃO.....	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	O CÂNCER E SUA TERAPÊUTICA.....	4
2.1.1	Produtos Naturais Produzidos Por Plantas Como Fonte De Medicamentos Anticâncer.....	5
2.1.1.1	Triterpenos quinonametídeos com atividade anticâncer.....	8
2.2	TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA ESTUDO E OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	9
2.2.1	Elicitação.....	10
2.2.2	Associação Planta e Microrganismos Endofíticos.....	11
2.2.3	Elicitação Química com Inibidores do Complexo Citocromo P450.....	12
2.3	BIOSSÍNTESE DOS TRITERPENOS.....	14
2.4	A FAMÍLIA <i>CELASTRACEAE</i>	15
2.4.1	<i>Monteverdia floribunda</i>	16
3	JUSTIFICATIVA.....	18
4	HIPÓTESE.....	19
5	OBJETIVO.....	20
5.1	OBJETIVOS GERAIS.....	20
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
6.1	COLETA E BENEFICIAMENTO DE <i>M. FLORIBUNDA</i>	21
6.2	INTRODUÇÃO DE <i>M. FLORIBUNDA IN VITRO</i>	21
6.3	ISOLAMENTO, CULTIVO, ESTOQUE E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE RAÍZES ADVENTÍCIAS DE <i>M. FLORIBUNDA IN VITRO</i>	22
6.3.1	Identificação dos Microrganismos Endofíticos.....	23
6.3.2	Microscopia Eletrônica de Raízes de <i>M. floribunda In Vitro</i> Colonizadas Com Microrganismo Endofítico.....	23

6.4	EXPERIMENTOS REALIZADOS COM RAÍZES ADVENTÍCIAS <i>IN VITRO</i> DE <i>M. FLORIBUNDA</i>	23
6.4.1	Estabelecimento da Curva de Crescimento das Raízes <i>In Vitro</i> de <i>M. floribunda</i>	23
6.4.2	Cultivo de Raízes De <i>M. floribunda</i> em Biorreatores de Coluna de Bolhas.....	24
6.4.3	Elicitação de Raízes <i>In Vitro</i> de <i>M. floribunda</i> Com Seu Microrganismo Endofítico.....	24
6.4.4	Elicitação Química Das Raízes <i>in vitro</i> De <i>M.</i> <i>floribunda</i>	25
6.5	CONFIRMAÇÃO DO MEVALONATO NA BIOSÍNTESE DA MAITENINA.....	26
6.5.1	Estudo da Rota Biossintética por Meio da Incorporação de 1- ¹³ C Acetato de Sódio e 2- ¹³ C Acetato de Sódio nas Raízes de <i>M.</i> <i>floribunda</i>	26
6.6	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>M. FLORIBUNDA</i>	27
6.6.1	Obtenção do Extrato das Raízes Cultivadas <i>In Situ</i> de <i>M.</i> <i>floribunda</i>	27
6.6.2	Obtenção dos Extratos das Raízes Produzidas <i>In Vitro</i> de <i>M.</i> <i>floribunda</i>	27
6.7	ANÁLISE DOS TRITERPENOS QUINONAMETIDEOS DAS RAÍZES DE <i>M. floribunda</i>	27
6.7.1	Preparo de Amostras Obtidas na Curva de Crescimento Para Análise em por CLAE-DAD-FR.....	27
6.7.2	Análise do Extrato Bruto e Padrões de Triterpenos Quinonametideos por CLAE-DAD-FR.....	28
6.7.2.1	Análise das amostras obtidas na curva de crescimento por CLAE-DAD-FR.....	28
6.7.3	6.7.3 Análise do Extrato Bruto e Padrões de Triterpenos Quinonametideos em cromatógrafo líquido de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e de massas (CLUE-EM).....	28
6.8	PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>M.</i> <i>FLORIBUNDA</i>	29

6.8.1	Isolamento De Maitenina Por CLAE Preparativo.....	29
6.8.1.1	Ressonância magnética nuclear da maitenina.....	30
6.8.2	Isolamento De Uniconazol-P Por CLAE Preparativo.....	30
6.8.2.1	Ressonância magnética nuclear do uniconazol-P.....	30
6.9	CURVA ANALÍTICA DOS PADRÕES.....	30
6.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
7.1	INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> E ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE RAÍZES DE <i>M. FLORIBUNDA</i>	32
7.2	ISOLAMENTO, CULTIVO, ESTOQUE E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE RAÍZES ADVENTÍCIAS DE <i>M. FLORIBUNDA IN VITRO</i>	32
7.2.1	Microscopia Eletrônica de Raízes de <i>M. floribunda In Vitro</i> Colonizadas Com Microrganismo Endofítico.....	34
7.3	ANÁLISE DOS EXTRATOS DAS RAÍZES DE <i>M. FLORIBUNDA</i> CULTIVADAS <i>IN SITU</i> E <i>IN VITRO</i>	36
7.3.1	Análise do Extrato das Raízes de <i>M. floribunda</i> Cultivada <i>In Situ</i> e <i>In Vitro</i> Determinação de TQs por CLAE-DAD-FR.....	36
7.4	DETERMINAÇÃO DA CURVA DE PRODUÇÃO DE TQs EM RAÍZES DE <i>M. FLORIBUNDA</i> CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	38
7.4.1	Análise do Extrato das Raízes de <i>M. floribunda</i> e Determinação da Curva de Produção de TQs <i>In Vitro</i> por CLAE-DAD-FR.....	38
7.4.2	Avaliação do Perfil Químico e Quantificação da Curva de Produção dos TQs Exudados em Meio de Cultivo das Raízes de <i>M. floribunda In Vitro</i>	39
7.4.3	Análise do Extrato da Curva de Crescimento das Raízes e Meio de Cultura de <i>M. floribunda</i> cultivadas <i>In Vitro</i> e Padrões de Triterpenos Quinonametídeos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE).....	41
7.5	CULTIVO DE RAÍZES DE <i>M. FLORIBUNDA</i> EM BIORREATORES DE COLUNA DE BOLHAS.....	43
7.5.1	Análise Do Extrato Das Raízes De <i>M. Floribunda</i> Cultivadas em Biorreatores e em Erlenmeyers e Padrões de Triterpenos	

	Quinonametídeos por CLUE.....	45
7.6	ELICITAÇÃO DE RAÍZES <i>IN VITRO</i> DE <i>M. floribunda</i>	47
7.6.1	Elicitação De Raízes cultivadas <i>in vitro</i> De <i>M. floribunda</i> Com o Microrganismo Endofítico <i>M. thiocyanatum</i>	47
7.6.1.1	Análise do extrato das raízes de <i>M. floribunda</i> elicitada com microrganismo endofítico e padrões de triterpenos quinonametídeos por CLUE-DAD-MS.....	49
7.6.2	Elicitação Química das Raízes <i>In Vitro</i> de <i>M. floribunda</i>	51
7.7	CONFIRMAÇÃO DO MEVALONATO NA BIOSÍNTESE DA MAITENINA.....	66
7.7.1	Isolamento do Triterpeno Maitenina de <i>M. floribunda</i>	66
7.7.2	Estudo da Rota Biossintética por Meio da Incorporação de 1- ¹³ C Acetato de Sódio e 2- ¹³ C Acetato de Sódio nas Raízes de <i>M.</i> <i>floribunda</i>	66
8	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Exemplos de triterpenos quinonametídeos encontrados em espécies de <i>Celastraceae</i>	7
Figura 2-	Retardantes de crescimento que também atuam como inibidores do citocromo P450 (CYP).....	13
Figura 3-	Ancimidol atuando como bloqueador da etapa de oxidação do intermediário <i>ent</i> -kaureno durante a formação do ácido kaurenóico na biossíntese das giberelinas.....	13
Figura 4-	Rotas biossintéticas envolvidas na formação dos terpenoides.....	15
Figura 5-	Estrutura dos constituintes isolados de <i>Maytenus floribunda</i> .	17
Figura 6-	Plântula <i>in vitro</i> de <i>Monteverdia floribunda</i> (A), rizogênese a partir de folhas (B), início do desenvolvimento da cultura de raízes (C) e raízes cultivadas em meio líquido utilizadas nos experimentos (D).....	32
Figura 7-	Imagem de microscopia eletrônica do corte transversal da raiz da plântula (A) e imagem ampliada da raiz da plântula (A1); imagem do caule da plântula (B) e imagem ampliada do caule da plântula (B1); imagem da raiz oriunda da cultura de raízes (C) e imagem ampliada da raiz oriunda da cultura de raízes (C1) de <i>Monteverdia floribunda</i> cultivada <i>in vitro</i> colonizadas com microrganismos endofíticos.....	35
Figura 8-	Cromatogramas do extrato de raízes de <i>Monteverdia floribunda</i> obtidos por CLAE: a) raízes cultivadas <i>in situ</i> ; b) raízes cultivadas <i>in vitro</i> ; 22 β -hidroxi-maitenina (1), maitenina (2), celastrol (3) e pristimerina (4).....	37
Figura 9-	Concentração de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina nas raízes de <i>Monteverdia floribunda</i> cultivadas <i>in vitro</i> por 95 dias.....	39
Figura 10-	Concentração de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina e celastrol no meio de cultura das raízes de <i>M. floribunda</i> cultivadas <i>in vitro</i> por 90 dias.....	41

- Figura 11- Cromatogramas obtidos por CLUE dos padrões de pristimirina (A), celastrol (B), maitenina (C) e 22 β -hidroximaitenina (D) e dos extratos de raízes cultivadas *in vitro* de *Monteverdia floribunda* (E) e extrato obtido do meio de cultivo das raízes (F)..... 42
- Figura 12- Cultivo de raízes de *Monteverdia floribunda* em biorreatores do tipo coluna de bolhas, com capacidade para 1 L (A), formação de biofilme do endofítico (B)..... 45
- Figura 13- Cromatogramas obtidos por CLUE dos padrões de 22 β -hidroximaitenina (C), maitenina (D), celastrol (E) e pristimirina (F) e dos extratos de raízes de *Monteverdia floribunda* cultivadas em biorreatores (A), e em erlenmeyers (B)..... 46
- Figura 14- Variação na concentração de TQs produzidos por raízes *in vitro* de *Monteverdia floribunda* elicitadas com a cultura filtrada (CF) e liofilizado celular (LC) do endofítico *Methylobacterium thiocyanatum* em diferentes concentrações, após 15 dias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5% de probabilidade, separadamente para 22 β -hidroximaitenina, maitenina, celastrol e pristimirina..... 48
- Figura 15- Cromatogramas obtidos por CLUE dos padrões de 22 β -hidroximaitenina (D), maitenina (E), celastrol(F) e pristimirina(G) e dos extratos de raízes de *Monteverdia floribunda* elicitadas com o filtrado (C), com o liofilizado celular (B) e com o controle (A)..... 50
- Figura 16- Cromatogramas obtidos por CLUE dos extratos de raízes de *Monteverdia floribunda* cultivadas *in vitro* e elicitadas: (A) controle, (B) ancymidol, (C) uniconazol, (D) paclobutrazol, (E) terbinafina, (F) giberelina-GA3, (G) associação de giberelina + paclobutrazol, e dos padrões: (H) 22 β -hidroximaitenina, (I) maitenina, (J) celastrol e (K) pristimirina..... 59

Figura 17-	Elicitores químicos e a produção de triterpenos quinonametídios em raízes de <i>Monteverdia floribunda</i>	60
Figura 18-	Estrutura química do uniconazol isolado do extrato de <i>Monteverdia floribunda</i>	60
Figura 19-	Espectro de RMN de ^1H do uniconazol (600 MHz, MeOD).....	62
Figura 20-	Espectro de RMN de ^1H do uniconazol com integrais (600 MHz, MeOD).....	63
Figura 21-	Mapa de contorno de gHMQC do uniconazol (600 MHz, MeOD).....	64
Figura 22-	Mapa de contorno de gHMBC do uniconazol (600 MHz, MeOD).....	65
Figura 23-	Estrutura química da maitenina isolada de <i>Monteverdia floribunda</i>	66
Figura 24-	Espectro de RMN de ^{13}C da maitenina isolada de raízes <i>in vitro</i> de <i>Monteverdia floribunda</i> enriquecidas com 1- ^{13}C acetato de sódio.....	67
Figura 25-	Espectro de RMN de ^{13}C da maitenina isolada de raízes <i>in vitro</i> de <i>Monteverdia floribunda</i> enriquecidas com 2- ^{13}C acetato de sódio.....	68
Figura 26-	Espectro de RMN de ^{13}C da maitenina isolada de raízes <i>in vitro</i> de <i>Monteverdia floribunda</i>	71
Figura 27-	Via biossintética do triterpenóide maitenina procedente da via MVA após a metabolização de 1- ^{13}C acetato de sódio.....	72
Figura 28-	Via biossintética do triterpenóide maitenina procedente da via MVA após a metabolização de 2- ^{13}C acetato de sódio.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) de triterpenos quinonametídeos em calos, células em suspensão e cultura de raízes de espécies de <i>Celastraceae</i>	10
Tabela 2-	Rendimento do extrato diclorometânico em relação a biomassa seca das raízes <i>in vitro</i> de <i>Monteverdia floribunda</i> em diferentes dias de cultivo.....	36
Tabela 3-	Variação na concentração de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina em raízes de <i>Monteverdia floribunda</i> cultivadas <i>in situ</i> e <i>in vitro</i>	38
Tabela 4-	Comparação dos teores de triterpenos quinonametídios encontrados no meio de cultura e nas raízes <i>Monteverdia floribunda</i> cultivadas <i>in vitro</i> entre 60 e 70 dias de cultivo.....	40
Tabela 5-	Variação na concentração de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina em raízes de <i>Monteverdia floribunda</i> cultivadas em biorreator e em erlenmeyer.....	44
Tabela 6-	Variação na concentração de 22 β -hidroxi-maitenina ($\mu\text{g}/\text{g}$ PS) produzida por raízes <i>in vitro</i> de <i>M. floribunda</i> elicitadas por ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina e giberelina nas concentrações 25, 50 e 100 μM e associação de giberelina (25, 50 e 100 μM) + paclobutrazol (25, 50 e 100 μM), após 10, 15 e 20 dias de cultivo.....	55
Tabela 7-	Variação na concentração de maitenina ($\mu\text{g}/\text{g}$ PS) produzida por raízes <i>in vitro</i> de <i>M. floribunda</i> elicitadas por ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina e giberelina nas concentrações 25, 50 e 100 μM e associação de giberelina (25, 50 e 100 μM) + paclobutrazol (25, 50 e 100 μM), após 10, 15 e 20 dias de cultivo.....	56

Tabela 8-	Varição na concentração de celastrol ($\mu\text{g/g}$ PS) produzida por raízes <i>in vitro</i> de <i>M. floribunda</i> elicitadas por ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina e giberelina nas concentrações 25, 50 e 100 μM e associação de giberelina (25, 50 e 100 μM) + paclobutrazol (25, 50 e 100 μM), após 10, 15 e 20 dias de cultivo.....	57
Tabela 9-	Varição na concentração de pristimirina ($\mu\text{g/g}$ PS) produzida por raízes <i>in vitro</i> de <i>M. floribunda</i> elicitadas por ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina e giberelina nas concentrações 25, 50 e 100 μM e associação de giberelina (25, 50 e 100 μM) + paclobutrazol (25, 50 e 100 μM), após 10, 15 e 20 dias de cultivo.....	58
Tabela 10-	Dados de RMN ^1H e ^{13}C (mapa de contorno HMQC) do uniconazol em comparação com o uniconazol da literatura...	61
Tabela 11-	Mapa de contorno HMBC do uniconazol.....	61
Tabela 12-	Dados de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3 , 25°C) da Maitenina isolada das raízes <i>in vitro</i> de <i>Monteverdia floribunda</i> , após a incorporação de 1- ^{13}C acetato de sódio e 2- ^{13}C acetato de sódio (CDCl_3 , 25°C).....	68

RESUMO

Os triterpenos quinonametídeos (TQs) são substâncias naturais que apresentam ação anticâncer. Eles ocorrem naturalmente em plantas da família Celastraceae e são marcadores quimiotaxômicos destas. Entretanto, o principal obstáculo para produzir em escala é a reduzida quantidade produzida nos tecidos de plantas cultivadas *in situ*. Além disso, por estas moléculas apresentarem alta complexidade estrutural, sua obtenção através de síntese orgânica é dificultada. Neste contexto, a espécie *Monteverdia floribunda* (Celastraceae) foi selecionada como alvo deste trabalho, visto que esta é produtora de triterpenos quinonametídeos e sua introdução *in vitro* poderá contribuir como fonte potencial de obtenção destes compostos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer a produção de TQs a partir de culturas *in vitro* de raízes de *M. floribunda*; isolar, identificar e avaliar a influência dos endófitos que hospedam a espécie na produção de TQs; e estudar a biossíntese dos TQs isolados. Para isto, sementes de *M. floribunda* foram coletadas, desinfestadas e introduzidas *in vitro*. Após a germinação, as plântulas foram repicadas e as folhas foram utilizadas como explantes para indução de raízes. Estas foram seccionadas e transferidas para o meio WPM. O isolamento do microrganismo endofítico das raízes de *M. floribunda* foi realizado com raízes adventícias axênicas cultivadas *in vitro*. Foi realizada a elicitação das raízes adventícias de *M. floribunda* com a cultura filtrada e com o liofilizado celular do microrganismo endofítico. Os teores dos TQs foram determinados por CLAE. Para a determinação da rota biossintética dos TQs de *M. floribunda* raízes cultivadas *in vitro* foram transferidas para meio de cultura contendo 1-¹³C-acetato de sódio e 2-¹³C-acetato de sódio. Foram obtidos espectros de RMN de ¹³C dos TQs. A cultura *in vitro* de raízes de *M. floribunda* foi estabelecida com sucesso. Foi detectada a produção dos TQs: 22β-hidroximaitenina, maitenina, celastrol e pristimirina nas raízes *in vitro*. Raízes *in vitro* de *M. floribunda* acumularam mais TQs do que raízes de plantas *in situ*. Raízes cultivadas em biorreatores produziram mais triterpenos quinonametídeos que as cultivadas em erlenmeyers. O microrganismo endofítico isolado foi identificado como *Methylobacterium thiocyanatum*, e este produziu efeito elicitor na produção de TQs. Os elicitores químicos terbinafina, ancymidol e a giberelina e associação de giberelina + paclobutrazol aumentou o teor do TQS até 10 dias de estímulo, depois deste período os níveis se mantiveram constantes. Foi determinado que a biossíntese da maitenina ocorre pela via do mevalonato.

Palavras-chaves: Triterpenos quinonametídeos. Celastraceae. *M. floribunda*. Elicitação. Endofítico.

Abstract

Quinonamethide triterpenes (QTs) are natural substances that exhibit anticancer activity. QTs occur naturally in Celastraceae plants and are chemotaxonomic markers for those species. However, QTs are produced in small quantities by plants grown in situ what signify a great obstacle for their obtaining in large scale. Moreover, because those molecules display high structural complexity, producing them via organic synthesis is arduous. Based on this, in this work *in vitro* root cultures of *Monteverdia floribunda* were established in order to isolate, identify and evaluate the role of endophytes on the production of TQs. Furthermore, the biosynthesis of isolated TQs was investigated. To start *in vitro* cultures, seeds of *M. floribunda* were collected, sterilized and inoculated on semisolid MS medium. After germination, leaves were excised from plantlets and cultured on WPM culture medium for root induction. The isolation of the endophytic microorganism from the roots of *M. floribunda* was carried out with axenic adventitious roots grown in vitro. The adventitious roots of *M. floribunda* were carried out with the filtered culture and with the cell lyophilisate of the endophytic microorganism. TQ contents were determined by HPLC. To verify the biosynthetic route of TQs *M. floribunda in vitro* roots were transferred to culture medium added with 1-¹³C-sodium acetate and 2-¹³C-sodium acetate and were analyzed by ¹³C NMR spectroscopy. Obtained results indicated that *M. floribunda in vitro* cultures roots were successfully established and the production of the TQs 22 β -hydroxy-maytenin, maytenin, celastrol and pristimerin was determined demonstrating that *M. floribunda in vitro* roots accumulated more TQs than in situ plants and that roots cultured in bioreactors produced more TQs than roots cultured in Erlenmeyer flasks. The host endophyte isolated was identified as *Methylobacterium thiocyanatum* it was observed to elicit TQ production. The chemical elicitors terbinafine, ancymidol, gibberellin and paclobutrazol added with gibberellin increased yields of TQs up to 10 days of elicitation, but after this period TQ production remained stable. Finally It was determined that maytenin biosynthesis occurs via the mevalonate pathway.

Keywords: Quinonamethide triterpenes. *Celastraceae*. *M. floribunda*. Elicitation. Endophytic.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a procura por novos fármacos de origem natural tem sido conduzida por investigações interdisciplinares em parcerias com diversos grupos de pesquisa no Brasil e no mundo. Esta procura por novas moléculas terapeuticamente ativas se dá devido à crescente agressividade de doenças e a resistência aos medicamentos usuais. Dentre as doenças que mais têm sido estudadas, está o câncer, que é a segunda principal causa de morte em todo o mundo (STEWART; WILD, 2014).

Os triterpenos quinonametídeos (TQs), destacam-se entre as moléculas bioativas com efeitos antineoplásicos que estão sendo investigadas, pois possuem efeito antitumoral cientificamente comprovado contra diversos tipos de cânceres (NGASSAPA et al., 1994; ALMEIDA et al., 2010; ORAMAS-ROYO et al., 2010; SUNG et al., 2010; SEO et al., 2011, HERNANDES et al., 2016). Esta classe de substâncias naturais (alvo desta pesquisa) é produzida apenas por espécies da família Celastraceae (BRUNING; WAGNER, 1978; GUNATILAKA, 1996), tais como *Cheiloclinium cognatum*, *Peritassa laevigata*, *P. campestris*, *Monteverdia aquifolium* e *M. ilicifolia*, sendo estas duas últimas, parte da lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS) no Brasil (BRASIL, 2009).

A busca por outras espécies de Celastraceae produtivas de triterpenos quinonametídeos é de grande importância, visto que, o descobrimento de espécies mais produtoras poderá contribuir como fonte potencial de obtenção destes compostos, e também existem poucos estudos em relação à produção em escala destes metabólitos a partir de técnicas biotecnológicas como, por exemplo, culturas de tecidos *in vitro*, utilizando-se estratégias de elicitação (abióticas ou mesmo bióticas).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar a possibilidade de produção *in vitro* de raízes de *Monteverdia floribunda* (Reissek) - Lundell (Celastraceae) como fonte de triterpenos quinonametídeos; isolar, identificar e avaliar a influência dos endófitos que hospedam a espécie na produção de TQs e contribuir ao estudo de elucidação da biossíntese dos TQs isolados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CÂNCER E SUA TERAPÊUTICA

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo. A ocorrência mundial da doença no ano de 2012 foi de aproximadamente 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de óbitos (STEWART; WILD, 2014). Em 2015 o número de óbitos subiu para 8,8 milhões, sendo as mortes mais freqüentes nos cânceres de mama (1,7 milhões), pulmão (1,69 milhões), fígado (788 mil), intestino (774 mil) e estômago (754 mil) (WHO, 2018). A estimativa global até 2034 é de um aumento de até 57 % de novos casos por ano, cerca de 22 milhões que terminarão em 13 milhões de mortes (STEWART; WILD, 2014).

Câncer é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de doenças caracterizadas por células anormais que se dividem sem parar, que invadem e se espalham nos tecidos e órgãos adjacentes formando tumores. Além disso, algumas células cancerígenas podem migrar para outras áreas do corpo através do sangue ou sistema linfático (metástase) formando tumores secundários em locais longe do tumor original (INCA, 2018; NCI, 2018; WHO, 2018).

A terapêutica do câncer pode ser feita através de cirurgia, imunoterapia, radioterapia e terapia sistêmica (quimioterapia ou terapia endócrina) (WHO, 2018). Dentre estas, a mais utilizada é a quimioterapia (MANSOORI et al., 2017). Porém, ainda que diversos tipos de câncer sejam inicialmente suscetíveis à quimioterapia, estes podem com o tempo desenvolver resistência às drogas através de mecanismos como: inativação de drogas, alteração do alvo das drogas, efluxo de drogas, reparo de danos ao DNA, inibição de morte celular e transição epitélio-mesenquimal, bem como heterogeneidade inerente de células tumorais e efeitos epigenéticos (HOUSMAN et al., 2014).

Segundo Mansoori et al. (2017) atualmente 90 % das falhas na quimioterapia estão relacionadas à resistência às drogas. Além disso, a elevada toxicidade conferida aos quimioterápicos e seus efeitos colaterais reforçam a necessidade de investigação de novas drogas antitumorais com menos efeitos colaterais e/ou com maior eficiência terapêutica (DEMAIN; VAISHNAV, 2010). Diante desta problemática, a busca por novos fármacos ainda é uma meta prioritária para a terapêutica do câncer.

2.1.1 Produtos Naturais Produzidos Por Plantas Como Fonte De Medicamentos Anticâncer

Produtos Naturais (PNs) são compostos químicos convertidos e transformados por organismos vivos como plantas, animais e microrganismos, para que estes possam viver, crescer e se reproduzir. A capacidade de transformar e sintetizar os produtos químicos varia muito entre os organismos. As vias para produzir e modificar substâncias essenciais como os carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos, em geral, são as mesmas em todos os organismos com pequenas variações e esses compostos são denominados metabólitos primários. Diferentemente dos metabólitos primários normalmente encontrados em todos os organismos, existem metabólitos secundários que têm uma distribuição muito mais limitada na natureza. Tais compostos são uma expressão da individualidade das espécies, sendo encontrados em organismos específicos ou então em grupos de organismos (DEWICK, 2009).

Os metabólitos secundários podem ser constitutivos, estando sempre presente num organismo ainda que possam variar em teor ou até mesmo com alguma modificação estrutural. Além disso, esses compostos podem ser sintetizados eventualmente como resultado da interação entre organismo e meio ambiente, como por exemplo, substâncias tóxicas utilizadas na defesa contra predadores e microrganismos; atrativos voláteis e corantes destinados a traír ou sinalizar algo importante para outras espécies, bem como compostos cuja finalidade é contribuir para a superação de situações de estresse, advindo do ambiente onde o organismo vive (WRIGHT, 2019).

Os metabólitos secundários são sintetizados a partir de intermediários biossintéticos derivados do metabolismo primário como acetil-coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e fosfato de metileritritol. Estes, mesmo sendo poucos, permitem produzir um número infinito de PNs (DIAS et al., 2012).

A abundante diversidade de PNs corresponde a variados fatores, mas principalmente a considerável biodiversidade de organismos terrestres e marinhos que ao longo de milhões de anos vem evoluindo em resposta a pressões bióticas e abióticas, elaborando inúmeros metabólitos secundários com estruturas complexas e conseqüentemente com variadas atividades biológicas (DEMAIN; VAISHNAV, 2010; MISHRA; TIWARI, 2011). Assim, os produtos naturais, ao longo da história, tem

exercido uma função importante no tratamento de doenças humanas, principalmente nas terapias contra o câncer (CRAGG; PEZZUTO, 2015).

Os compostos responsáveis por estas atividades pertencem a diversas classes de compostos como antraciclinas, enedienos, indolocarbazóis, isoprenoides, macrolidiospolicetídeos, peptídeos não ribossômicos, alcaloides, entre outros (ELRAYESS; EL-HAK, 2019).

As moléculas com atividades antitumorais possuem diversos mecanismos de ação, como a indução de apoptose (morte celular programada) através da clivagem do DNA mediada pela inibição da topoisomerase I ou II; permeabilização mitocondrial; inibição de enzimas chaves envolvidas na transdução de sinais (por exemplo, proteases) ou metabolismo celular; inibição da angiogênese induzida por tumores (recrutamento de novos vasos sanguíneos) (DEAMAIN; VAISHNAV, 2010). Em uma análise realizada por Newman e Cragg (2016) que abrangeu o período de 1940 até o final de 2014, das 175 pequenas moléculas aprovadas para o tratamento de câncer, 49 % são PNs ou derivados diretamente destes.

Dentre os primeiros agentes anticancerígenos derivados de planta comercialmente disponíveis destacam-se os alcaloides indólicos vimblastina (Velban[®]) e vincristina (Oncovin[®]) isolados a partir da espécie *Catharanthus roseus* a partir dos quais, foram desenvolvidos análogos semissintéticos eficazes sendo estes: vinorelbina (Navelbine[®]), vindesina (Eldisine[®]) e o mais recente vinflunina (um análogo bifluorado de segunda geração da vinorelbina) (Javlor[®]).

Outros dois potentes agentes anticancerígenos semissintéticos foram desenvolvidos a partir da podofilotoxina extraída das raízes da espécie *Podophyllum peltatum* são eles: etoposido (Vepesid[®]) e teniposido (Vumon[®]). Além destes, os taxanos são considerados uma das classes de quimioterápicos mais importantes para o tratamento do câncer, e atualmente as duas drogas clinicamente mais eficazes dessa classe são: paclitaxel (Taxol[®]), isolada originalmente da casca do tronco da espécie *Taxus brevifolia* e o análogo semissintético docetaxel (Taxotere[®]), sintetizado a partir da bacatina III, que foi isolada das folhas de *Taxus baccata*.

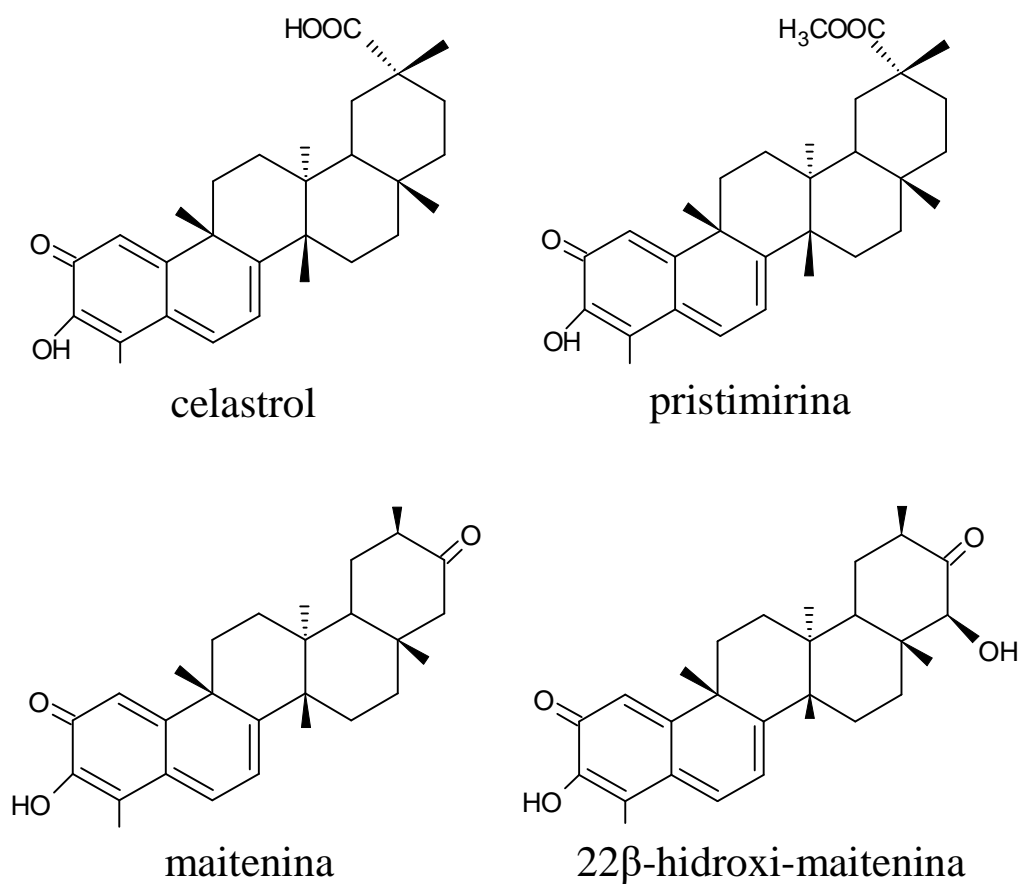
Recentemente estão disponíveis no mercado derivados da camptotecina, extraída da espécie *Camptotheca acuminata*, utilizados como ativos anticâncer. São eles: o análogo semissintético conhecido como irinotecano (Camptosar[®]) e o análogo sintético topotecano (Hycamtin[®]) (GRAGG; PEZZUTO, 2015).

Os produtos naturais, a par de todas as moléculas sintéticas utilizadas como anti neoplásicas, são ainda a melhor opção de descoberta de novos agentes e modelos para semissíntese de ativos efetivos no combate ao câncer (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Além das drogas comercialmente disponíveis, outras moléculas bioativas com efeitos antineoplásicos estão sendo investigadas. Entre estas, se destaca as que são produzidas por plantas da família Celastraceae (HERNANDES et al., 2020).

As espécies da família Celastraceae são produtoras de triterpenos quinonametídeos (TQs), em especial o celastrol e seu éster metílico a pristimerina, 22 β -hidroxi-maitenina e a maitenina que apresentam comprovada atividades antitumoral (Figura 1).

Figura 1 - Exemplos de triterpenos quinonametídeos encontrados em espécies de *Celastraceae*.



Fonte: Mayara Valdevite.

2.1.1.1 Triterpenos quinonametídeos com atividade anticâncer

A potencialidade anticâncer da maitenina foi demonstrada em ensaios clínicos com pacientes com carcinomas de amígdala, língua e laringe, reduzindo de 40 a 60 % das lesões e não apresentando toxicidade gastrointestinal e hematológica (SANTANA et al., 1971). A maitenina também apresenta atividade em diversos tipos de células tumorais como: sarcoma 180 (tumor ascite), U343, B16, MCF7, entre outras (ALMEIDA et al., 2010; COPPEDE, 2013; FOX, 1991; SETZER et al., 2001; YELANI et al., 2010).

A atividade da pristimirina também foi confirmada por Yang et al., (2008) frente às linhagens de próstata humana (PC-3, LNCaP e C4-2B), apresentando 3 vezes mais seletividade para células tumorais em relação às não tumorais. A ação antitumoral da pristimirina foi confirmada contra câncer de mama MDA-MB-231, células tumorais de adenocarcinoma murino de mama (LM3), de pulmão (LP07) e células tumorais leucêmicas HL-60 (WU et al., 2005; GOMES, 2008; COSTA et al., 2008). Estudos realizados com o celastrol, outro triterpeno quinonametídeo, confirmaram a atividade citotóxica deste composto frente às linhagens tumorais de adenocarcinoma, melanoma, células leucêmicas e glioblastoma (LU et al., 2009; CHEN et al., 2009, COPPEDE, 2013).

A promissora molécula celastrol apresenta atividade anti-cancer, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e anti-diabética em inúmeros modelos celulares já executados *in vivo*. Esta molécula é promissora por apresentar uma potente ação contra glioblastoma multiforme, um tipo de tumor maligno agressivo intracranial que acomete seres humanos. A combinação de celastrol com outros fármacos promove adicional estresse nos mecanismos homeostáticos do tumor e pode acelerar a resposta da toxicidade mediada por celastrol (BORIDY et al., 2014). Alguns renomados grupos de pesquisa têm explorado a estrutura química do celastrol por meio do design, síntese química e avaliação biológica de análogos indol-celastrol, a fim de obter moléculas ainda mais promissoras que o produto natural celastrol (TANG et al., 2015).

Apesar do extenso potencial farmacológico dos TQs, existem fatores limitantes a produção de medicamentos a partir dessas moléculas: 1) essas substâncias são acumuladas exclusivamente nas raízes; 2) as raízes apresentam crescimento lento; 3) a concentração dessas moléculas na raiz é muito baixa, menos

de 0,001 %; 4) a síntese química, até o momento, é inviável em função da elevada complexidade estrutural. Nesta circunstância, ferramentas biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais apresentam-se como uma alternativa viável para produção dessas moléculas (PAZ, 2016; HERNANDES et al., 2016).

2.2 TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA ESTUDO E OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As culturas *in vitro* de células e órgãos vegetais tem sido fonte potencial de metabólitos secundários, que são utilizados como produtos farmacêuticos, agroquímicos, aromas, entre outros (MURTHY et al., 2014), a exemplo da cultura de células e tecidos de *Taxus brevifolia* que resultou na produção da substância antitumoral paclitaxel (Taxol®) e de *Catharanthus roseus* produtora dos alcaloides vincristina e vinblastina (COLLIN, 2001; WEI, 2010).

A cultura de tecidos e órgãos possui inúmeras vantagens, dentre estas se destaca: 1) produção contínua e monitorada de metabólitos de interesse, sem que haja interferência sazonal; 2) a extração e isolamento da biomolécula facilitada quando comparada a extração da planta inteira, devido à ausência (ou menor quantidade) de compostos como hidrocarbonetos, pigmentos e outros e, 3) o rendimento dos metabólitos secundários de interesse pode ser otimizado através do uso de fitorreguladores e elicitores (PAZ, 2016).

Estudos visando a otimização da produção de triterpenos quinonametídeos *in vitro* tem sido realizado com as espécies de *Salacia campestris*, *Maytenus ilicifolia* e outras espécies de Celastracea (PAZ et al., 2013; COPPEDE et al., 2013; 2014; INACIO et al. 2017; 2019) comprovando que a cultura de tecido é uma técnica viável para a produção dessas moléculas (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$ PS) de triterpenos quinonametídeos em calos, células em suspensão e cultura de raízes de espécies de *Celastraceae*.

Espécies	Fonte	Celastrol	Maitenina	Netzahual-coieno	Pristimirina	22 β -hidroximaitenina	Referências
<i>Maytenus aquifolium</i>	Calos	-	90	-	-	30	Corsino et al. (1998)
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Calos	-	40	-	-	24	Buffa Filho et al. (2004)
	Calos	-	1150	-	-	1030	Coppede et al. (2014)
	Células em suspensão	300	4290	-	130	2330	
<i>Peritassa campestris</i>	Raiz	-	970	-	-	-	Paz et al. (2013)
	Raiz	-	2484	-	-	700	Inácio et al. (2017)
<i>Peritassa laevigata</i>	Raiz	-	4020	-	-	3200	Pina et al. (2016)
<i>Tripterygium wilfordii</i>	Células em suspensão	140	-	-	-	-	Kutney et al. (1981)
	Calos	10	-	-	-	-	Su et al. (2014)
	Células em suspensão	130	-	-	-	-	
<i>Cheiloclinium cognatum</i>	Raiz	-	6266,8	143	-	4250	Pina et al. (2016)

Fonte: (Pina et al., 2016 – modificada).

2.2.1 Elicitação

Uma das estratégias mais eficazes para melhorar a produção biotecnológica de compostos secundários é a elicitação. Embora uma proliferação de células possa ser induzida por fatores físicos tais como lesão mecânica, a adição de elicitores bióticos ou abióticos ao meio de cultura é a principal estratégia biotecnológica aplicada à culturas de células para modular a produção de bioativos (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016; NAIK; AL-KHAYRI, 2016).

Elicitação é um método bem conhecido e amplamente aplicado para aumentar a produção de diversas classes de metabólitos secundários em sistemas vegetais (PERASSOLO et al., 2011). Um elicitor é uma substância de origem biótica ou abiótica que, quando adicionado a uma cultura, mimetiza situações de estresse nas células vegetais, causando respostas adaptativas que aconteceriam no ambiente natural da planta. Isso geralmente causa o efeito de maior acúmulo de metabólitos secundários, pois os elicitores causam alterações fisiológicas que

envolvem aumenta o nível de expressão de genes relacionados ao metabolismo secundário (ZHANG et al., 2012; ZHAO et al., 2005).

Elictores como jasmonatos, ácido salicílico e também extratos de microrganismos têm sido empregados com sucesso para estimular a produção de metabólitos secundários (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016).

Em nosso grupo de pesquisa o efeito do metil jasmonato (MeJA) em culturas de células em suspensão tem sido investigado quanto ao acúmulo de triterpenos, e como resultado, foi observado que células em suspensão de *M. ilicifolia* elicitadas com MeJA, acumularam os TQs maitenina e 22 β -hidroxi-maitenina em concentrações muito maiores do que as células não elicitadas (COPPEDE, 2013). Outro trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa é a elicitação com extratos de microrganismos endofíticos da própria espécie. Assim, a associação da cultura de raízes *in vitro* de *Peritasssa campestres* com o microrganismo endofítico *Bacillus megaterium* isolado de *P. cancestres* aumentou 2,3 vezes a concentração de maitenina e até quase três vezes a concentração de 22 β -hidroxi-maitenina (INÁCIO et al. 2017).

2.2.2 Associação Planta e Microrganismos Endofíticos

Diversos microrganismos que coabitam simbioticamente com plantas são denominados endófitos, incluindo fungos, actinobactérias e outras bactérias. Estes são capazes de inter-relacionar-se com as plantas povoando os tecidos internos de órgãos como raízes, folhas, caules, frutos, flores e sementes, tanto nos espaços intercelulares como nos intracelulares (QIN et al., 2010; MANO; MORISAKI, 2008).

A técnica biotecnológica de co-cultivo *in vitro*, é um método utilizado com êxito no estudo das interações simbióticas de planta+microrganismo. Essa técnica tem mostrado que existe uma relação positiva entre plantas e microrganismos na produção de biomoléculas de interesse farmacológico. Um exemplo interessante é o da espécie *Artemisia annua*, que teve a produção de artemisinina aumentada em 52 %, quando estimulada com o fungo *Colletotrichum gloesporioides* (endofítico da espécie) (WANG et al., 2006). Outro exemplo é o da espécie *Dracaena cochinchinensis*, muito empregada na medicina chinesa, que quando contaminada com um endofítico do gênero *Fusarium* sp. acumulou flavonoides em grandes concentrações nos tecidos inoculados (JIANG et al., 2003). Além dos exemplos

citados anteriormente, um estudo realizado com *Atractylodes lancea* mostrou que células em suspensão foram elicitadas com extrato autoclavado do fungo endofítico do gênero *Cunninghamella* sp. aumentando a biomassa e o teor de óleo essencial, em especial a quantidade de β -eudesmol que foi 42 % maior do que o grupo controle (GANG et al., 2012).

Raízes em suspensão de *Taverniera cuneifolia* produtoras de ácido glicirrízico (AG) foram elicitadas com culturas microbianas vivas, como resultado houve um aumento de seis vezes na produção de AG *in vitro*, quando utilizado o elicitor fúngico *Mucor hiemalis* e o bacteriano *Rhizobium leguminosarum*, mostrando que indutores vivos podem ser considerados um sistema útil para a produção de AG (AWAD, et al. 2014).

Estudos realizados com a espécie medicinal *Echinacea purpurea* têm mostrado que a interação entre bactérias endofíticas e raízes cultivadas *in vitro* podem interferir positivamente no aumento de metabólitos secundários (MAGGINI et al., 2017; 2019).

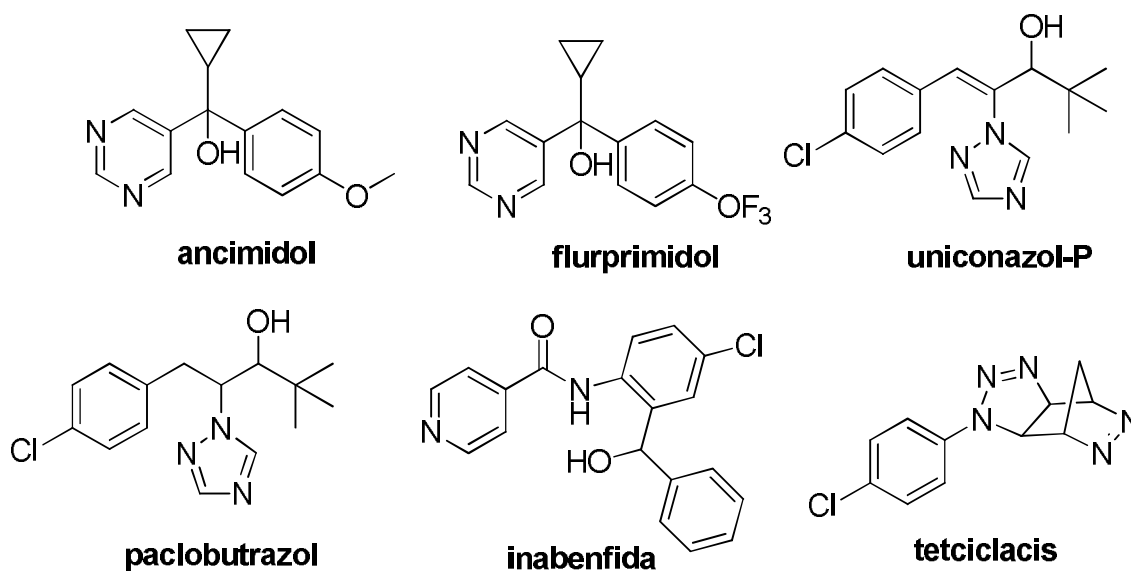
2.2.3 Elicitação Química com Inibidores do Complexo Citocromo P450

Alguns inibidores do complexo citocromo p450 são utilizados como retardantes de crescimento em plantas, promovendo baixa taxa da divisão celular, sem causar fitotoxicidade. Os retardantes de crescimento são antagonistas das giberelinas e auxinas, sendo alguns desses compostos conhecidos por conter um núcleo heterocíclico com átomo de nitrogênio. Exemplos desses inibidores são ancimidol e flurprimidol os quais são comercialmente utilizados na produção de plantas ornamentais (RADEMACHER et al., 2000).

O inibidor flurprimidol atua como retardante de crescimento, porém promove desenvolvimento de folhas e raízes (SINGH et al., 2015). Estes retardantes de crescimento também atuam como inibidores de monooxigenases, que são enzimas capazes de catalisar etapas oxidativas durante a biossíntese de metabólitos secundários. Durante a biossíntese das giberelinas os inibidores ancimidol, flurprimidol, uniconazol-P, paclobutrazol e tetciclacis (Figura 2) atuam como inibidores do complexo enzimático citocromo P450 (CYP), bloqueando a conversão de ent-kaureno em ácido kaurenóico (Figura 3) (RADEMACHER, et al., 2000).

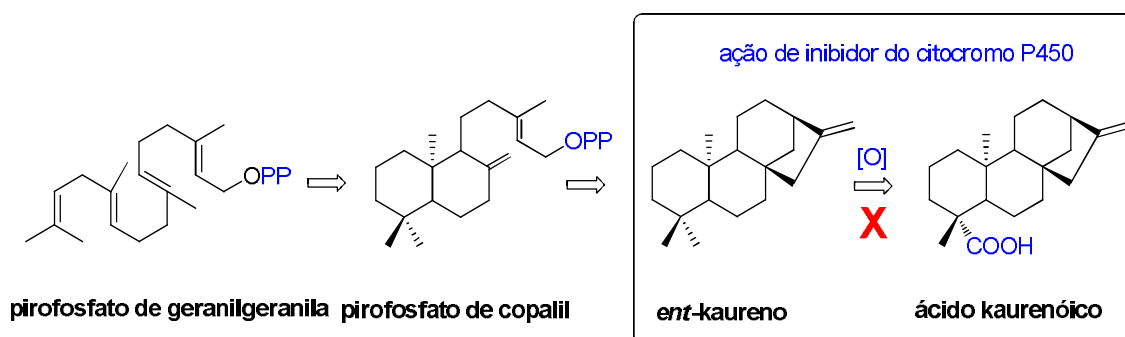
A molécula flurprimidol é similar a ancimidol, ambos atuam na inibição da biossíntese das giberelinas, no entanto, flurprimidol é mais ativo e mais estável que ancimidol (SINGH, et al., 2015). Muitos destes derivados azois inibem a ação de uma grande variedade de enzimas do complexo enzimático citocromo P450 (CYP), que já foram relatados em estudos biossintéticos dos brassinosteróides e do ácido abscísico (SUTTLE et al., 2012). Estudos utilizando inibidores desta natureza são importantes para identificar intermediários biossintéticos e auxiliar na elucidação das rotas biossintéticas.

Figura 2. Retardantes de crescimento que também atuam como inibidores do citocromo P450 (CYP).



Fonte: Mayara Valdevite

Figura 3. Ancimidol atuando como bloqueador da etapa de oxidação do intermediário *ent*-kaureno durante a formação do ácido kaurenóico na biossíntese das giberelinas.



Fonte: Mayara Valdevite

2.3 BIOSÍNTESE DOS TRITERPENOS

A biossíntese destes terpenoides têm como precursor-chave as unidades de pirofosfato de isopentenila (IPP) e o seu isômero, pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). O ácido mevalônico era conhecido, na década de noventa, como o único precursor responsável pela biossíntese universal que levava à formação das unidades de IPP (ADAM et al., 1998). Outra via envolvida na formação de compostos terpenoídicos, denominada de via alternativa (via independente do mevalonato) ou via 2-C-metil-*D*-eritritol-4-fosfato (triose/piruvato) foi estabelecida (ROHMER et al., 1993; 1996). Assim, as unidades de IPP podem ser formadas por meio de duas vias biossintéticas: a via do mevalonato (MVA), que envolve condensações de unidades de acetil-CoA, e a via da triose/piruvato (MEP), que envolve a condensação de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato (ROHMER et al., 1993; 1996; ADAM et al., 1998).

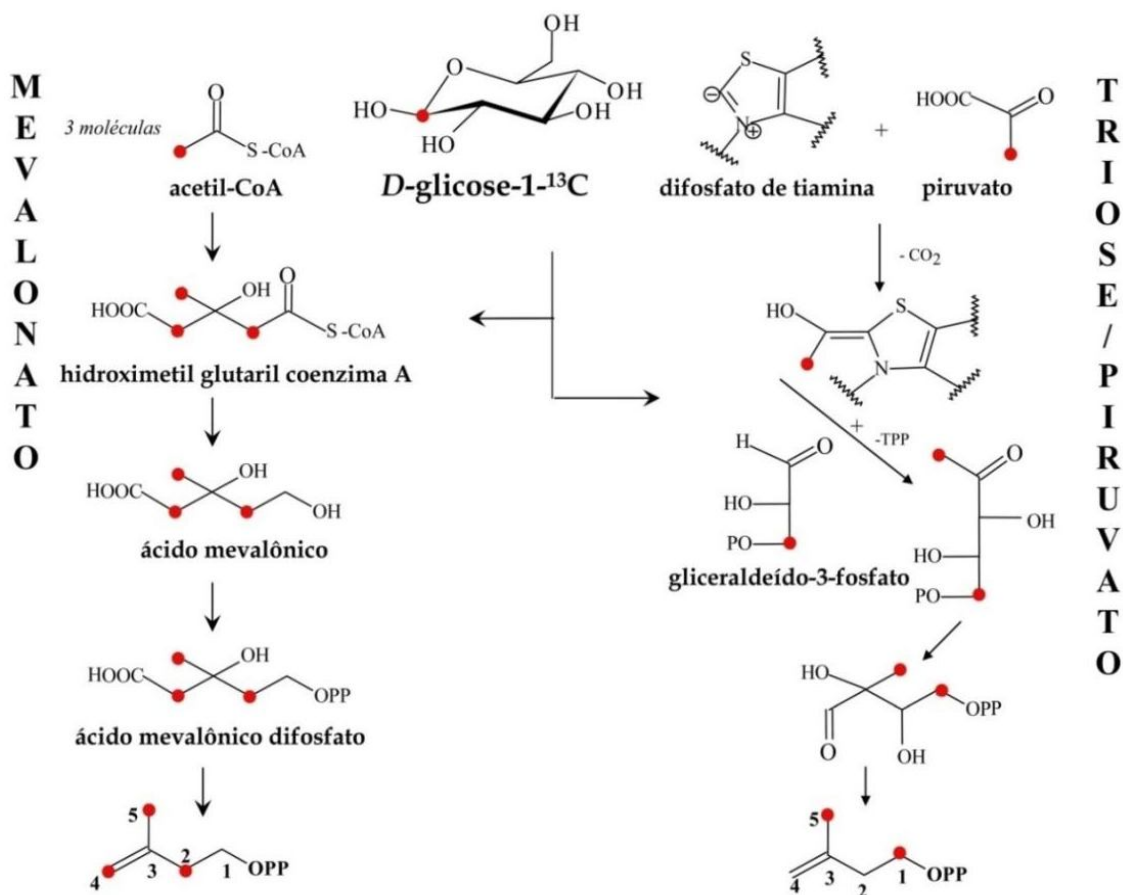
A investigação da biossíntese que leva à formação das unidades de IPP é geralmente feita através de incorporação de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-glicose. Dependendo da via de metabolização envolvida, a marcação dos carbonos das unidades isoprênicas será diferenciada. No caso da via mevalonoídica, os carbonos C-2, C-4 e C-5 estarão enriquecidos, enquanto que se a via triose-piruvato (MEP) for determinante os carbonos C-1 e C-5 estarão enriquecidos. Ambas as vias podem ocorrer concomitantemente, ou seja, as duas vias de metabolização estão operantes e assim todos os carbonos, exceto C-3, podem estar enriquecidos (Figura 4).

A avaliação da incorporação é feita através de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C quantitativa, ou seja, através do aumento da intensidade dos sinais de carbonos distintos que levam a diferenciação das vias envolvidas na formação do metabólito em análise (ADAM et al., 1998). Os estudos de marcação isotópica são de grande importância, uma vez que permitem a determinação da via operante, além de predizer as principais organelas ou compartimentos envolvidos na biossíntese dos metabólitos considerados (KIRBY; KEASLING, 2009).

Outros precursores isotópicos também podem ser utilizados para investigar qual rota terpenoídica é a via operante no vegetal. Se a via é do MVA utiliza-se $1\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato de sódio, $1,2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato de sódio, ou $5\text{-}^{13}\text{C}$ -mevalonolactona. Se a via do MEP for determinante utiliza-se $1\text{-}^{13}\text{C}$ -piruvato de sódio ou $2\text{-}^{13}\text{C}$ -gliceraldeído-3P. Estudos prévios descritos por Corsino et al. (2000) mostraram que houve

incorporação radiotópica de 5-³H-mevalonolactona durante a biossíntese de pristimerina e maitenina nas raízes de *Maytenus aquifolium* (Celastraceae). Recentemente, trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram que a via do mevalonato é a rota biossintética envolvida na formação do triterpeno quinanometídeo 22β-hidroxi-maitenina nas raízes *in vitro* de *Peritassa levigata* (Celastraceae) (PINA et al., 2016).

Figura 4 - Rotas biossintéticas envolvidas na formação dos terpenoides.



Fonte: DEWICK 2009; HIRAI 2000.

2.4 A FAMÍLIA CELASTRACEAE

A Família *Celastraceae* engloba 55 gêneros com aproximadamente 855 espécies, sendo de hábito arbóreo, arbustivo ou liana. Geralmente suas flores são pequenas e regulares, sendo a maioria pentâmera e simétrica. Os frutos são

carnudos, capsulares, bagas, aquenóides ou sâmaras. As sementes apresentam dois cotilédones, largos e foliáceos. É considerada nativa de regiões tropicais, subtropicais e do Cerrado (SMITH, 1940; LORENZI, 2002; ALVARENGA; FERRO, 2006; SIMMONS, 2004).

Em razão de seus extratos possuírem propriedades medicinais, as plantas desta família têm sido utilizadas por comunidades tradicionais como estimulante, bloqueador de apetite, sedativo, emético, purgativo, restaurador de memória, contraceptivo masculino, anti-tumoral, anti-leucêmico, anti-bacteriano, inseticida e repelente de insetos (SPIVEY et al., 2002).

Estudos realizados com enfoque etnobotânico, químico e farmacológico comprovaram as atividades antioxidante (VELLOSA et al., 2006), antimicrobiana (CUNICO et al., 2002) entre outras, sendo que as principais espécies estudadas foram *Maytenus ilicifolia* (LIÃO et al., 1994; COPPEDE et al., 2014), *Cheilochlinium cognatum* (BUFFA-FILHO et al., 2002b), *Maytenus vitis-idaea* (ALMEIDA et al., 2010), *Triterygium regelli* (CORSINO et al., 2000; SEO et al., 2010) e *Salacia campestris* (PAZ et al., 2013).

Os marcadores quimitaxonômicos dessas espécies são os triterpenos quinonametídeos. Além desses compostos, foram isolados triterpenos pentacíclicos, fenilalquilaminas, maitansinóides e flavonoides (SPIVEY et al., 2002).

2.4.1 *Monteverdia floribunda* (Reissek) Biral

Segundo o Missouri Botanical Garden (2020), a espécie *Monteverdia floribunda* possui algumas sinônimas botânicas: *Maytenus floribunda* (Reissek), *Maytenus erythrocarpa* Rusby e *Maytenus cardenasii* Rusby; e está classificada como:

Divisão Angiospermae Magnoliophyta

Classe Equisetopsida C. Agardh

Subclasse Magnoliidae Novák ex Takht

Superorder Rosanae Takht

Ordem Celastrales Link

Família Celastraceae R. Br.

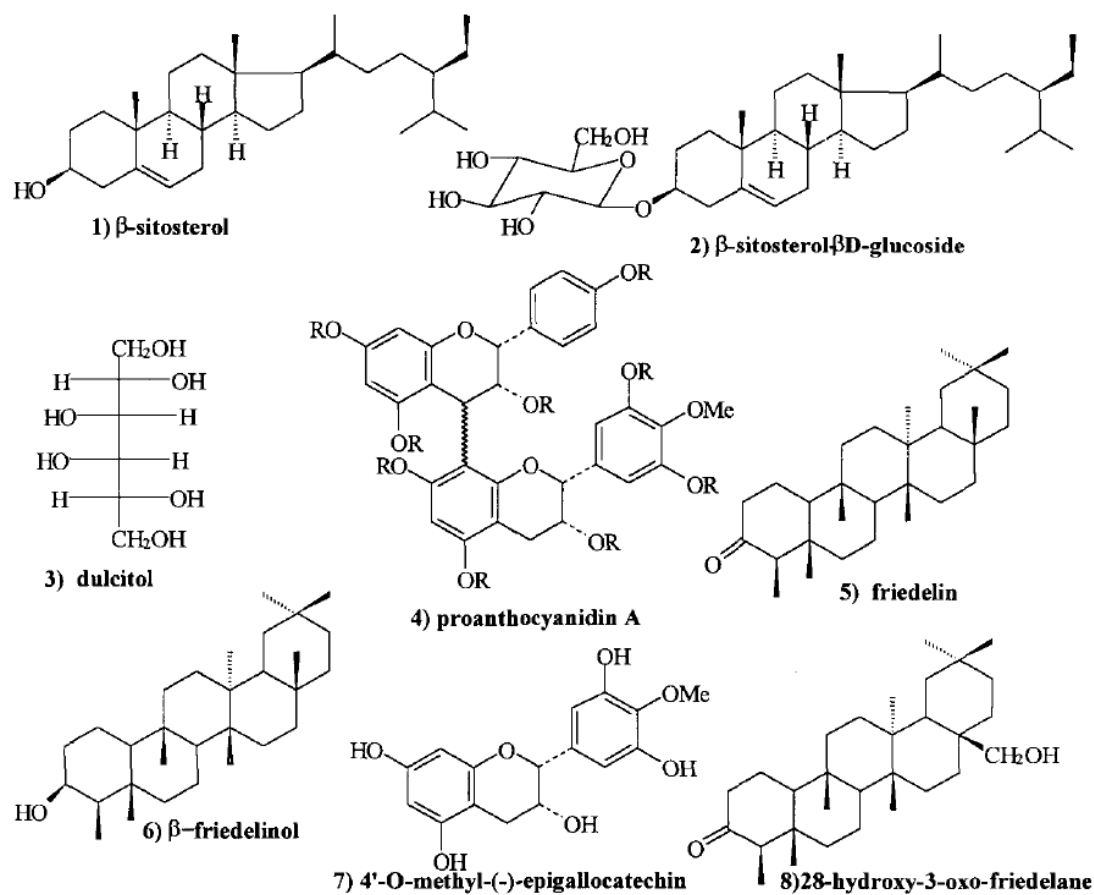
Gênero *Monteverdia* A. Rich.

Espécie *Monteverdia floribunda* (Reissek) Biral

Monteverdia floribunda (Reissek) Biral, (Synonym *Maytenus floribunda*) é uma espécie arbórea da família Celastraceae amplamente distribuída no Brasil, incluindo os biomas Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica ocorrendo em altitudes que variam de 250 a 1400 m (Biral et al. 2015, 2017).

Análises fitoquímicas têm sido realizadas com *M. floribunda* e uma grande variedade de metabólitos secundários foi identificada, com destaque à classe dos triterpenos. A partir de extratos da casca da madeira foi isolado polioldulcitol, os esteroides: β -sistosterol e β -sistosterol- β D-glicosídeo; os flavonoides: 4'-O-metil(-)-epigallocatequina e a proantocianidina A; e os triterpenos: friedelina, friedelinol e 28-hidroxi-3-oxo-friedelano. Os extratos produzidos da folha mostram a presença de β -sistosterol e β -sistosterol- β D-glicosídeo (SALAZAR, 1993) (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura dos constituintes isolados de *M. floribunda*.



Fonte: SALAZAR, 1993.

3 JUSTIFICATIVA

Centenas de substâncias naturais são anualmente confirmadas quanto à atividade antineoplásica. Entretanto, o baixo rendimento destes compostos produzidos pelas plantas e a impossibilidade de síntese química inviabiliza o desenvolvimento de novos medicamentos, a serem utilizados na terapêutica do câncer. O principal obstáculo à produção de medicamentos antineoplásicos a partir de triterpenos quinonametídeos, é que estes estão restritos a uma fina camada de tecidos que recobre as raízes de plantas da família Celastraceae. Portanto, esse trabalho propôs o cultivo *in vitro* de raízes da espécie *M. floribunda*, a fim de se obter um bioprocesso viável de produção de extratos ricos em triterpenos quinonametídeos.

4 HIPÓTESE

É viável a produção de triterpenos quinonametídeos a partir do cultivo de raízes *in vitro* de *M. floribunda* e a elicitação química ou por microrganismo endofítico induz o aumento no teor dos metabólitos bioativos.

5 OBJETIVO

5.1 OBJETIVOS GERAIS

Estabelecer a cultura de raízes *in vitro* de *Monteverdia floribunda* visando obtenção de triterpenos quinonametídeos por meio de elicitação biótica e abiótica, além de avaliar a rota biossintética da maitenina com o uso de precursores marcados isotopicamente.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1º- Estabelecer a cultura *in vitro* de raízes da espécie *M. floribunda*;
- 2º- Isolar, identificar e multiplicar microrganismo endofítico presente nas culturas *in vitro* de raízes de *M. floribunda*;
- 3º- Avaliar o perfil químico via CLAE-DAD dos triterpenos quinonametídeos produzidos *in vitro* e comparar com o perfil de metabólitos de raízes produzidas *ex vitro*;
- 4º- Determinar a curva de crescimento e acúmulo de TQs em raízes *in vitro* de *M. floribunda*;
- 5º- Estabelecer cultivo em biorreator das raízes *in vitro* de *M. floribunda*;
- 6º- Realizar elicitação com os microrganismos endofíticos isolados das raízes *in vitro* de *M. floribunda* e determinar a melhor concentração na produção dos TQs;
- 7º- Realizar elicitação utilizando inibidores do citocromo P450 (ancimidol, uniconazol-P, terbinafina e paclobutrazol) e giberelina nas raízes *in vitro* de *M. floribunda* e determinar a melhor concentração e melhor tempo de estimulação na produção dos TQs;
- 8º- Confirmar a participação mevalonato na biossíntese da maitenina por meio da incorporação de 1-¹³C-acetato de sódio e 2-¹³C-acetato de sódio.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 COLETA E BENEFICIAMENTO DE RAIZ DE *M. FLORIBUNDA*

Para a realização dos experimentos, foram coletadas sementes e raízes de planta localizada em Jardinópolis-SP, habitat de ocorrência natural da espécie.

Raízes foram coletadas de uma única planta, secas em estufa de ar circulante a 45 °C, e posteriormente foram trituradas em moinhos de facas para o preparo de extratos.

Ramos floridos foram seccionados para a confecção de exsicata a qual foi identificada pelo Dr. Leonardo Biral (Universidade tecnológica Federal do Paraná-UTFPR) e depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HMURP – UNAERP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) com o voucher 1569.

A espécie de *Monteverdia floribunda* usada no estudo foi autorizada pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético / Ministério do Meio Ambiente (CGEN / MMA; protocolo no. A049425) através dos escritórios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6.2 INTRODUÇÃO DE *M. FLORIBUNDA IN VITRO*

Sementes de *M. floribunda* foram coletadas e desinfestadas com Captan (Orthocide® 500) e Tiofanato-metilico (Cercobin® 700WP) a 1 % por 24 horas. Posteriormente, foram transferidas para solução com os antibióticos ampicilina, cefotaxima, gentamicina e estreptomicina (10 mg.L⁻¹ de cada antibiótico) por 24 horas; em seguida foram imersas em hipoclorito de cálcio (0,5 %) por 30 min e lavadas com água destilada estéril (3 X). Após esses procedimentos estas foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) basal, semissólido suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 2,5 g.L⁻¹ de agente gelificante Phytigel®.

As sementes foram mantidas em sala de cultura a 25 ± 2 °C, com 55-60 % de umidade relativa, além do controle de fotoperíodo; 16 h de luz e 8 h em ausência de luz.

Após a germinação, as plântulas foram repicadas, os segmentos nodais foram transferidos para o meio de cultura MS/2 (MURASHIGE; SKOOG, 1962) basal,

semissólido suplementado com 15 g.L⁻¹ de sacarose e 2,5 g.L⁻¹ de agente gelificante Phytigel[®], as folhas e raízes foram utilizadas como explantes para indução de raízes e para isto, estas foram seccionadas e transferidas para o meio WP suplementado com 19,68 µM de IBA, 20 g.L⁻¹ de glicose, 899,74 µM de PVP (polivinilpirrolidona) e 2,5 g.L⁻¹ de agente gelificante Phytigel[®].

O tecido foliar 70 dias após a inoculação apresentou rizogênese e as raízes foram transferidas para erlenmeyer com o mesmo meio de cultura, porém sem o agente gelificante, estes foram depositados em mesa agitadora orbital a 90 rpm, na ausência de luz. Para a multiplicação das raízes, foi realizada repicagem a cada 60 dias.

6.3 ISOLAMENTO, CULTIVO, ESTOQUE E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMO ENDOFÍTICO DE RAÍZES ADVENTÍCIAS DE *M. FLORIBUNDA* *IN VITRO*

O isolamento dos microrganismos endofíticos das raízes de *M. floribunda* foi realizado com raízes adventícias axênicas cultivadas *in vitro*. Essas raízes foram trituradas com o auxílio de grau e pistilo (autoclavados). A trituração ocorreu com solução salina 0,85 % e uma alíquota das raízes trituradas foi plaqueada.

Para o plaqueamento da amostra, foram utilizados dois meios de cultura: Batata dextrose ágar (BDA) e Tripsina soja ágar (TSA). As placas com as amostras inoculadas foram mantidas em estufa a 28 °C, até a visualização das colônias.

Posteriormente, as colônias isoladas foram reinoculadas em meio de cultura TSA e mantidas em estufa nas mesmas condições por 48 horas, a fim de garantir a pureza das colônias. Foram realizados três repiques antes da identificação.

Para a obtenção do estoque, a bactéria foi crescida em meio de cultura líquido DSMZ 805 (ATLAS, 2010) em estufa a 28 °C por 48 horas a 120 rpm. Posteriormente, 800 µL de meio de cultivo contendo os microrganismos, foram transferidos para microtubos e sobre eles foram adicionados 200 µL de glicerol 70 %. Logo após, foram estocados em freezer -20 °C, por 24 horas, e transferidos para freezer -80 °C, onde permanecem estocados até o momento atual.

6.3.1 Identificação do Microrganismo Endofítico

A amostra com o microrganismo isolado de raízes *in vitro* de *M. floribunda* foi identificada por genética molecular pela Fundação André Tosello, Campinas, SP e o relatório de identificação encontra-se em anexo (anexo I).

6.3.2 Microscopia Eletrônica de Raízes de *M. floribunda* *In Vitro* Colonizadas Com Microrganismo Endofítico

Plântula e raiz cultivadas *in vitro* foram seccionada com 0,5 cm a partir da coifa e na parte terminal contrária ao meristema da raiz, foi realizado o corte transversal manualmente. O fragmento da raiz foi colocado diretamente no cilindro do microscópio (Olympus-micronal BX41) e a imagem foi obtida utilizando câmera digital DCE-5C USB 2.0 e microscópio de varredura (Hitachi TM3030PLUS). Esse experimento foi realizado no laboratório de farmacologia da Universidade Federal do Amapá.

6.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM RAÍZES ADVENTÍCIAS *IN VITRO* DE *M. FLORIBUNDA*

6.4.1 Estabelecimento da Curva de Crescimento das Raízes *In Vitro* de *M. floribunda*

Para o estabelecimento da curva de crescimento de raízes com 60 dias em meio líquido, foram pesadas $1,00 \pm 0,20$ g de raízes e inoculadas em erlenmeyers de 150 mL contendo 50 mL de meio WPM líquido com 20 g.L^{-1} de glicose, suplementado com $19,68 \mu\text{M}$ de IBA e $899,74 \mu\text{M}$ de PVP. O pH foi ajustado para $6,00 \pm 0,05$ e os erlenmeyers foram mantidos em agitador orbital a 90 rpm em sala de crescimento de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ na ausência de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições em triplicata, totalizando 9 frascos por ponto de coleta.

A coleta do material foi realizada a partir do dia inicial de cultivo (tempo zero) até o nonagésimo dia. Com intervalo de cinco dias, entre cada ponto de coleta, as raízes foram retiradas do meio de cultura, pesadas e secas em estufa de ar circulante por 48 horas a $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.4.2 Cultivo de Raízes de *M. floribunda* em Biorreatores de Coluna de Bolhas

Para o cultivo em biorreatores do tipo coluna de bolhas, 10 g de raízes adventícias com 90 dias de idade foram transferidas para biorreatores de 1L contendo 500 mL de meio de cultura (descrito no item 6.4.1). Os biorreatores foram ligados a bombas de ar (Big Air®, modelo: A420, potência: 5w, velocidade: 3, capacidade: 4,5 L/min de vazão de ar.), e mantidos no escuro em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, com 55-60 % de umidade relativa.

Para comparação entre a produção de biomassa e acúmulo de TQs no biorreator e erlenmeyer, 2 g de raízes com 90 dias de idade foram transferidas para erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura (idêntico ao meio usado no biorreator). Estes também foram mantidos no escuro em sala de crescimento sob agitação constante de 90 rpm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições em cada tratamento

A avaliação das raízes foi realizada aos 40 dias de cultivo. Estas foram retiradas do meio de cultura, pesadas e secas em estufa de ar circulante por 48 horas a 43 °C.

6.4.3 Elicitação de Raízes *In Vitro* de *M. floribunda* com seu Microrganismo Endofítico

A elicitação das raízes adventícias de *M. floribunda* com microrganismo endofítico, foi realizada conforme descrito por Savithaet et al. (2006). Inicialmente, o microrganismo mantido em estoque foi reativado em placas de petri contendo o meio de cultura DSMZ 805 e foi incubado em estufa a 28 °C, por cinco dias. Após a reativação, os microrganismos foram transferidos para erlenmeyers contendo o mesmo meio nutritivo, porém líquido e mantido a 28 °C em mesa agitadora a 120 rpm por 72 horas. Os microrganismos foram quantificados em espectrofotômetro a 550 nm antes e após o crescimento em meio líquido. A absorbância obtida em espectrofotômetro no momento da inoculação dos microrganismos em meio líquido foi $1,042 \pm 0,08$ e após 72 horas de crescimento $1,367 \pm 0,06$, indicando um crescimento de aproximadamente 1,31 vezes.

Após aferir a absorvância, os microrganismos foram autoclavados por 15 min a 121 °C e 1atm, sendo em seguida, centrifugados na velocidade máxima (26300 g) por uma hora, em temperatura ambiente. Esse material foi então separado em sedimento e sobrenadante obtidos da cultura do microorganismo endofítico. O sobrenadante sem nenhum processamento e sedimento liofilizado foram utilizados no experimento de elicitação.

A elicitação foi realizada em Erlenmeyer (125 mL) contendo 15 mL de meio de cultura (descrito no item 6.4.1), 1 g de raiz (cultivada por 60 dias) e sedimento celular liofilizado nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50 % (p/v) ou sobrenadante nas concentrações de 5, 7,5 e 10 % (v/v). Após adição dos elicitores o meio de cultura foi autoclavado. As raízes foram mantidas sob agitação constante em mesa orbital a 90 rpm na ausência de luz por um período de 15 dias.

6.4.4 Elicitação Química Das Raízes *in vitro* De *M. floribunda*

Para a elicitação química de *M. floribunda*, 1 g de raízes adventícias com 60 dias de idade foram inoculadas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura (descrito no item 6.4.1). Os erlenmeyers contendo as raízes foram mantidos em agitador orbital a 90 rpm em sala de crescimento de 25 (\pm 2) °C na ausência de luz por um período de 50 dias.

Posteriormente, o meio de cultura foi trocado por um novo meio (descrito acima) acrescido dos agentes elicitores: ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, ácido giberélico (todos Sigma®) e cloridrato de terbinafina (InfinityPharma®), nas concentrações 25, 50 e 100 μ M. Após a troca do meio de cultura contendo os agentes elicitores, as raízes foram mantidas nas mesmas condições de agitação, luz e temperatura descritas anteriormente.

A avaliação do efeito dos agentes elicitores foi realizada em três períodos diferentes (10, 15 e 20 dias de exposição). Em cada período de avaliação foi retirada uma triplicata de cada tratamento. As raízes coletadas foram secas e extraídas conforme metodologia descrita no item 6.5.2.

6.5 CONFIRMAÇÃO DO MEVALONATO NA BIOSSÍNTESE DA MAITENINA

A confirmação de etapas iniciais da rota biossintética foi realizada com o auxílio da Prof^a Dr^a Adriana Aparecida Lopes - Universidade de Ribeirão Preto.

6.5.1 Estudo da Rota Biossintética por Meio da Incorporação de 1-¹³C Acetato de Sódio e 2-¹³C Acetato de Sódio nas Raízes de *M. floribunda*

Para a confirmação do mevalonato como precursor na biossíntese da maitenina, 1 g de raízes adventícias cultivadas *in vitro* foram inoculadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de crescimento (WPM líquido com 20 g.L⁻¹ de glicose, suplementado com 19,68 µM de IBA e 899,74 µM de PVP). O pH foi ajustado para 6,00 ± 0,05 e autoclavado. Após a autoclavagem, foi adicionado ao meio 0,25 % de 1-¹³C-acetato de sódio e/ou 2-¹³C-acetato de sódio.

Para o preparo dos marcadores isotópicos adicionados ao meio de cultivo, estes foram solubilizados em água destilada e esterilizados através de membrana Whatman® 0.2 µm.

As culturas enriquecidas com ¹³C-acetato de sódio mais o controle (raízes inoculadas em meio de crescimento sem adição do ¹³C-precursor) foram mantidas em agitador orbital a 90 rpm em sala de crescimento de 25 (± 2) °C na ausência de luz por um período de 20 dias.

Decorrido o período de incubação, as raízes foram secas, pulverizadas e extraídas com diclorometano conforme descrito no item 6.6.2. Os extratos foram submetidos à FR-CLAE semi-preparativa conforme descrito no item 6.8.1

Após purificação da maitenina enriquecida com 1-¹³C-acetato de sódio, 2-¹³C-acetato de sódio e controle (não enriquecida), esta foi analisada por RMN de ¹³C (conforme descrito no item 6.8.1.1) e os resultados obtidos foram comparados a dados espectroscópicos oriundos da literatura (TAKAISHI et al., 2015).

6.6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *M. FLORIBUNDA*

6.6.1 Obtenção do Extrato das Raízes de *M. floribunda* Cultivadas *in situ*

Casca das raízes de *M. floribunda* foram lavadas e colocadas para secar em estufa de ar circulante (Marconi®) a 45 °C, durante 4 dias. Posteriormente estas foram trituradas em moinho de facas (Marconi® MA680). Em seguida foram submetidas a extração com diclorometano (volume duas vezes superior ao de matéria seca) em banho ultrassom Unique® (Indaiatuba, SP, Brazil) por 30 minutos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes.

Decorrido o período de extração/ultrassonicação, as soluções das extrações das raízes obtidas *in situ* foram filtradas em papel filtro. O filtrado foi rotaevaporado para concentração dos constituintes e obtenção dos extratos brutos secos.

6.6.2 Obtenção dos Extratos das Raízes Produzidas *In Vitro* de *M. floribunda*

As raízes foram submetidas à secagem em estufa a 45 °C por 24 horas e posteriormente foram maceradas em gral com pistilo. Em seguida foram submetidas à extração com diclorometano (1 g PS/10 mL solvente) em banho de ultrassom Unique® (Indaiatuba, SP, Brazil) por 30 min, esse procedimento foi repetido por 3 vezes.

Decorrido o período de extração/ultrassonicação, as soluções das extrações das raízes obtidas *in vitro* foram filtradas em papel filtro e secas em capela de exaustão.

6.7 ANÁLISE DOS TRITERPENOS QUINONAMETIDEOS DAS RAÍZES DE *M. FLORIBUNDA*

6.7.1 Preparo de Amostras Obtidas na Curva de Crescimento Para Análise em CLAE-DAD-FR

Os extratos brutos obtidos da biomassa nos diferentes períodos da curva de crescimento foram solubilizados em MeOH:H₂O (85:15), na concentração de 3 mg.mL⁻¹ e foi aplicado em cartucho de sílica gel de fase reversa (Sigma Aldrich®)

C18 ec, 6 mL/500 mg), previamente ativado com 5 mL de MeOH e equilibrado com 3 mL de MeOH:H₂O (85:15), em seguida, 1 mL do extrato das amostras foi eluído com 2 mL de MeOH:H₂O (85:15) e analisadas em CLAE.

6.7.2 Análise Quali e Quantitativa do Extrato Bruto e Padrões de Triterpenos Quinonametideos Por CLAE-DAD-FR

6.7.2.1 Análise por CLAE-DAD-FR de raízes de *M. Floribunda*

Os TQs presentes em extratos de raízes cultivadas *in situ* e *in vitro* foram quantificados por FR-CLAE usando um sistema AVP LC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com injetor SIL-10AF, um detector de matriz de fotodiodo SPD-M20A (PDA) e uma coluna Phenomenex (Torrance, CA, EUA) Luna[®] (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula). O volume de injeção foi de 20 µL de amostras, e estas foram eluídas em uma mistura de 0,1 % de ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B); 15 (A) : 85 (B) por 10 min; de 15 (A) : 85 (B) para 0 (A) : 100 (B) por 10 min; e 0 (A) : 100 (B) por 5 minutos (tempo total: 25 min) com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os componentes foram monitorados por PDA com o comprimento de onda ajustado a 420nm.

6.7.3 Análise do Extrato Bruto e Padrões de Triterpenos Quinonametideos em cromatógrafo líquido de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e de massas (CLUE-EM)

Extratos brutos (1 mg) dos tratamentos controle, ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina, ácido giberélico e ácido giberélico + paclobutrazol (50 µM com 15 dias de cultivo) e dos padrões autênticos de maitenina, 22-β-hidróxi-maitenina, celastrol e pristimerina, foram solubilizados em 1,0 mL de metanol (grau CLAE) obtendo-se uma concentração de 1,0 mg/mL. A solução estoque foi diluída para obter uma concentração final de 50 µg/mL, e posteriormente, analisada em um sistema ACQUITY UPLC *H-Class* (Waters Corporation) de cromatografia líquida de ultra-performance (CLUE) acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD, *do inglês*, DiodeArray Detector) e ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S tandem quadrupole (Waters Corporation, Milford, MA) operando com uma fonte de ionização

química à pressão atmosférica (APCI, *do inglês*, Atmospheric Pressure Chemical Ionization) em modo positivo de análise. Um volume de 5 μL de amostra foi injetada em uma coluna Ascentis® Express C₁₈ (100 x 4,6 mm, 2,7 μm o diâmetro da partícula) da Supelco. A fase móvel consistiu de 0.1 % de Ácido Fórmico (solvente A) e Metanol + 0.1 % de Ácido Fórmico (solvente B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente de 30 a 95 % de Metanol a uma taxa de fluxo de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$. O tempo total de análise foi de 15 min. Os compostos foram monitorados no DAD na faixa de 210 a 600 nm. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de APCI foram: voltagem da corona = 7 μA , voltagem do cone = 40 V, source offset = 60 V, temperatura da fonte API = 150 °C, temperatura da probe de APCI = 400 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 250 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise *Full-scan* foi de 100 a 600 Da.

A análise em cromatógrafo líquido de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e de massas (CLUE-EM) foi realizada no Departamento de Química Orgânica da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Dr. Eduardo José Crevelin.

6.8 PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE *M. FLORIBUNDA*

6.8.1 Isolamento De Maitenina Por CLAE Preparativo

Os extratos obtidos foram solubilizados na concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e submetidos à FR-CLAE semi-preparativa usando o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, acoplado a bombas de modelo LC-6AD Shimadzu, com controlador de sistema CBM-20A Shimadzu, degaseificador DGU-20A, detectores de arranjo de diodos UV/VIS SPD-M20A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF Shimadzu e software Class VP. Para as análise semi-preparativa foi acoplada ao cromatógrafo uma coluna Phenomenex (Torrance, CA, EUA) Luna® (250 x 10,0 mm, 5 μm de tamanho de partícula). Foi injetado 100 μL de amostra e eluída em um sistema (A:B; A-H₂O; B-MeOH (80%) + ACN (20%)); de 0-35 min. isocrático (20:80); de 35-50 min. gradiente (15:85 até 00:100); de 50-60 min. isocrático (20:80). O tempo de análise total foi de 60 minutos. O fluxo utilizado foi de 3 mL/min , e a detecção feita em $\lambda=420$ nm.

6.8.1.1 Ressonância magnética nuclear da maitenina

Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker: Avance III HD 600 (equipado com criossonda), operando a 500 MHz na frequência do ^1H e a 100 MHz na frequência do ^{13}C , localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no Instituto de Química (UNESP-Araraquara).

6.8.2 Isolamento De Uniconazol-P Por CLAE Preparativo

O extrato obtido no experimento de elicitação das raízes *in vitro* com uniconazol foi solubilizado na concentração de 50 mg.mL^{-1} e submetidos à FR-CLAE semi-preparativa usando um sistema AVP LC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com injetor SIL-10AF, com controlador de sistema CBM-20A, degaseificador DGU-20A, um detector de matriz de fotodiodo SPD-M20A (PAD) e uma coluna Phenomenex (Torrance, CA, EUA) Luna[®] (250 x 10,0 mm, 5 μm de tamanho de partícula). O volume de injeção foi de 100 μL de amostra, e estas foram eluídas em gradiente (A:B; A-Ácido fórmico 0,1 %; B-metanol + Ácido fórmico 0,1 %) de 20:80 para 05:95 em 30 min; de 05:95 para 00:100 em 6 min e 20:80 por 4 min fluxo: 3,0 mL/min; tempo: 50 min; Os componentes foram monitorados por PAD com o comprimento de onda ajustado a 225 nm.

6.8.2.1 Ressonância magnética nuclear do uniconazol-P

A identificação da uniconazol-P foi realizada por RMN 1D e 2D no “Instituto Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara-SP utilizando Espectrômetro Bruker Avance III 600MHz e utilizando o solvente MeOD como solvente de referência.

6.9 CURVA ANALÍTICA DOS PADRÕES

O método utilizado na quantificação foi o de padronização externa, que consistiu na construção de curvas analíticas para cada padrão (22 β -hidroximaitenina, maitenina, celastrol e pristimirina) (ANEXO II). Foram preparadas

soluções estoque, diluindo-se 1 mg do padrão em 1 mL de MeOH (grau CLAE) e a partir destas, foram preparadas as soluções de trabalho (RIBANI et al., 2004).

Os padrões 22 β -hidroxi-maitenina e maitenina foram fornecidos pela Prof^a Dr^a Ana Maria Soares Pereira (foram obtidos os dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 - RMN de ¹H e ¹³C)) e celastrol e pristimirina foram comprados de Sigma-Aldrich[®].

6.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

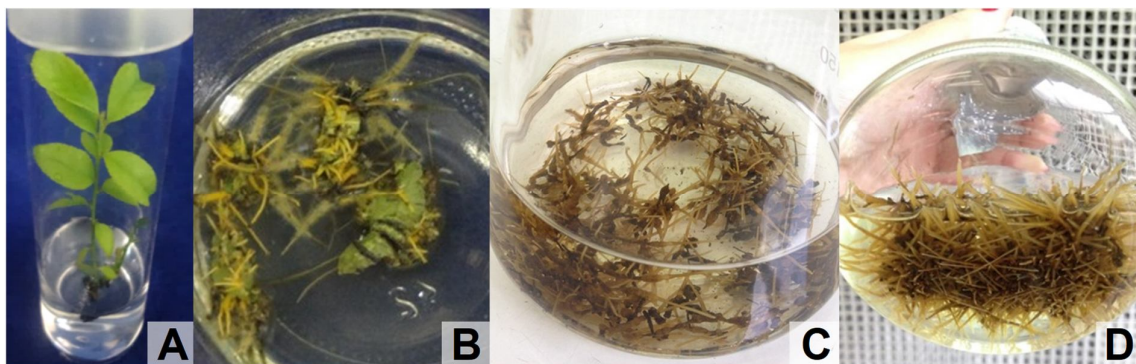
O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.5.1 (FERREIRA, 2005), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 0,5 % de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 INTRODUÇÃO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE RAÍZES DE *M. FLORIBUNDA*

A rizogênese a partir de folhas oriundas das plântulas cultivadas *in vitro* ocorreu no septuagésimo dia após a inoculação e os segmentos de folhas contendo raízes ao serem transferidos para meio de cultura líquido, após 90 dias, produziram raízes independentes do tecido foliar (Figura 6).

Figura 6 - Plântula *in vitro* de *Monteverdia floribunda* (A), rizogênese a partir de folhas (B), início do desenvolvimento da cultura de raízes (C) e raízes cultivadas em meio líquido utilizadas nos experimentos (D).



Fonte: Mayara Valdevite

7.2 ISOLAMENTO, CULTIVO, ESTOQUE E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO ENDOFÍTICO DE RAÍZES ADVENTÍCIAS DE *M. FLORIBUNDA* CULTIVADAS *IN VITRO*

Raízes cultivadas por mais de um ano *in vitro* apresentaram microrganismo endofítico com coloração rósea. Após isolamento do mesmo e o cultivo em meios BDA e TSA o microrganismo cresceu apenas no meio TSA. A classificação taxonômica realizada por método molecular identificou o microrganismo como *Methylobacterium thiocyanatum* (Anexo I).

Esse microrganismo foi isolado pela primeira vez em *Allium aflatunense* e não há dados até o momento sobre o seu efeito na produção do metabolismo secundário

das plantas (WOOD et al., 1998). Entretanto, há relato do efeito positivo de *Methylobacterium extorquens*, que está estreitamente relacionada do ponto de vista genético com a *M. thiocyanatum*, sobre a produção do composto furanoide denominado 2,5-dimetil-4-hidroxi-2H-furanono (DMHF), responsável pelo aroma do morango (VERGINER et al., 2010).

O gênero *Methylobacterium* é caracterizado por bactérias Gram-negativas que possuem geralmente pigmentação rosa devido à síntese de carotenoides (VAN DIEN et al., 2003). Estes organismos se apresentam na forma de haste, estritamente aeróbica e crescem usando compostos contendo apenas um carbono, como metanol e metilamina (TOYAMA et al., 1998). Assim, essas bactérias são designadas por metilotróficos facultativos pigmentados rosa (pink-pigmented methylotrophic bacteria - PPFMs).

Os membros do gênero *Methylobacterium* ocupam diferentes habitats devido à sua grande plasticidade fenotípica, incluindo solo, água, superfícies foliares, nódulos, grãos e ar (MADHAIYAN et al., 2006; TANI et al., 2011; WELLNER et al., 2019). Crescem em tecido meristemático, podendo atingir populações de 10⁴ a 10⁶ unidades formadoras de colônias (CFU) por grama de tecido vegetal (DORONINA et al., 2002). Além disso, eles podem formar biofilmes (ANDREOTE et al., 2006) e usar o metabolismo metilotrófico como uma vantagem adaptativa durante a colonização do hospedeiro vegetal (SY et al., 2005).

A associação entre *Methylobacterium spp* e as plantas hospedeiras variam podendo ser: fortes ou simbióticas (JOURAND et al., 2004), a fracas ou epífitas (OMER et al., 2004) e intermediárias ou endofíticas (LAVACA et al., 2004). Algumas espécies podem fixar nitrogênio e conseqüentemente formar nódulos (SY et al., 2001), outras produzem fitoregulador promovendo o crescimento das plantas (MEENA et al., 2011; MADHAIYAN et al., 2006; TANI et al., 2011), também existem aquelas que induzem maior atividade fotossintética (CERVANTES-MARTINEZ et al., 2004) ou interagem com patógenos das plantas (LACAVA et al., 2004; ARAÚJO et al., 2002).

7.2.1 Microscopia Eletrônica de Raízes de *M. floribunda in vitro* Colonizadas com Microrganismo Endofítico

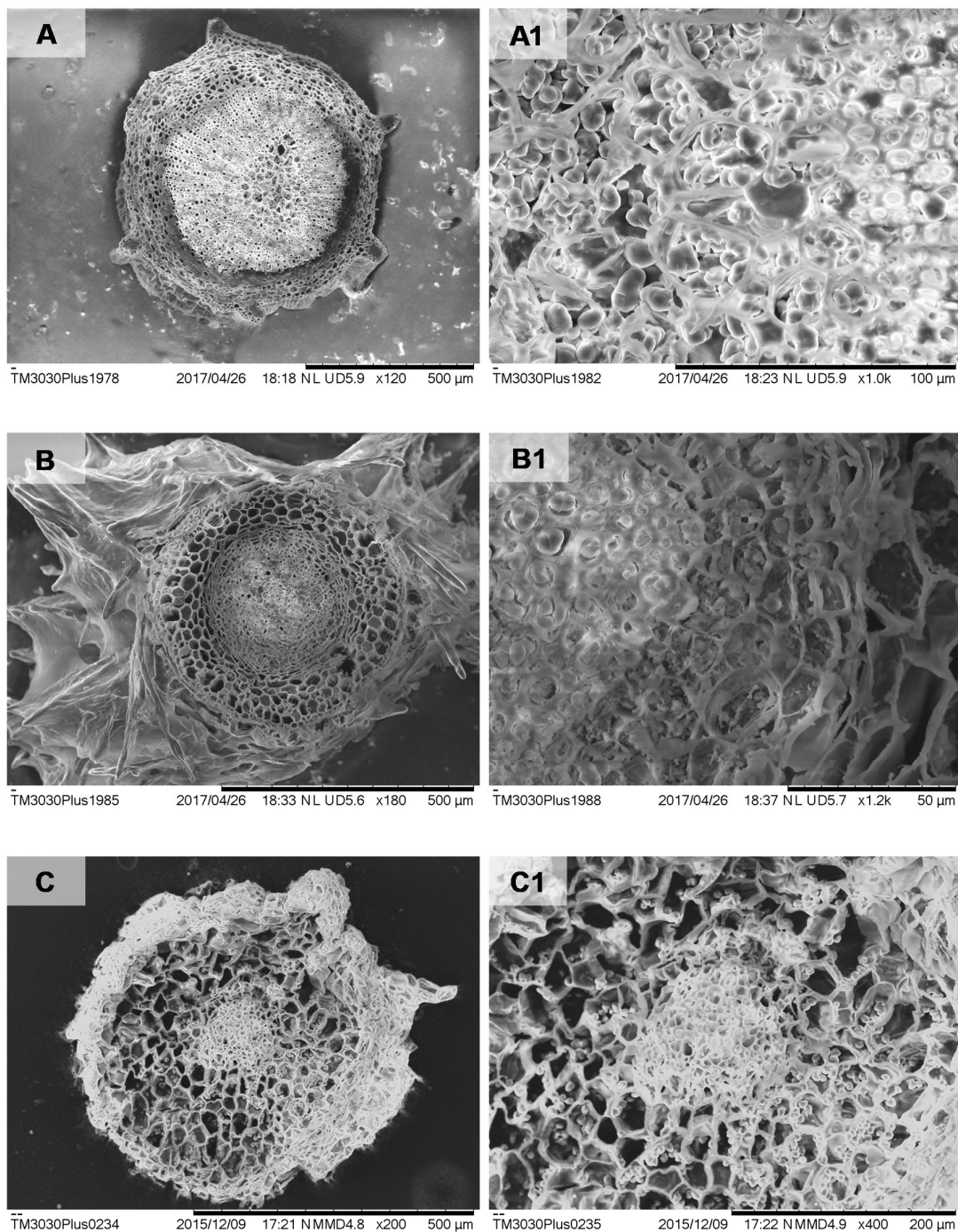
A imagem de microscopia eletrônica de raiz e caule de plântulas cultivada *in vitro*, bem como de raízes adventícias de *M. floribunda*, obtidas a partir de folhas, cultivadas *in vitro* evidenciou a presença de microrganismos endofíticos, localizados nos espaços intercelulares. As colônias estão presentes no parênquima e no sistema vascular da raiz (Figura 7).

Microrganismos endofíticos podem interagir intimamente com as plantas e colonizar seus tecidos internos (MANO; MORISAKI, 2008), vivendo em simbiose nos diferentes órgãos, principalmente nos espaços inter e intracelulares (QIN et al., 2010). Atualmente, existe um grande número de estudos mostrando a importâncias desses organismos para a planta, pois atuam na adaptação a ambientes estressantes, na proteção a patógenos e na biossíntese de fitoreguladores e metabólitos secundários (KUÚNIAR et al., 2019).

A presença desses microrganismos em culturas de tecidos vegetais sob condições axênicas era, até pouco tempo, desconsiderada. Na grande maioria das vezes, os endófitos não são visíveis, podendo ser observados somente através de análise microscópica (BARROW et al., 2004) ou quando há um extravasamento do microrganismo para o meio de cultura com intenso crescimento.

Diversas substâncias de interesse econômico como taxol, camptotecina, ácido glicirrizico e rubrolona (KUÚNIAR et al., 2019; AWAD et al 2014; KAPOOR et al 2019). Assim, a presença e identificação de microrganismos endofíticos em culturas de tecidos deve ser considerada como um fator importante, considerando que pode promover a produção de compostos de interesse.

Figura 7 - Imagem de microscopia eletrônica do corte transversal da raiz da plântula (A) e imagem ampliada da raiz da plântula (A1); imagem do caule da plântula (B) e imagem ampliada do caule da plântula (B1); imagem da raiz oriunda da cultura de raízes (C) e imagem ampliada da raiz oriunda da cultura de raízes (C1) de *Monteverdia floribunda* cultivada *in vitro* colonizadas com microrganismos endofíticos.



7.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS DAS RAÍZES DE *M. FLORIBUNDA* CULTIVADAS *IN SITU* E *IN VITRO*

7.3.1 Análise do Extrato das Raízes de *M. floribunda* Cultivada *In Situ* e *In Vitro* e Determinação de TQs por FR-CLAE

Raízes obtidas *in situ* foram extraídas com diclometano e o rendimento de extrato bruto foi de 3,47 %.

Os rendimentos das raízes cultivadas *in vitro* variam de 2,95 a 4,31 % entre os dias de cultivo (Tabela 2). Não houve um padrão para o rendimento dos extratos obtidos conforme os dias de cultivo. O mesmo foi observado em um trabalho realizado por Paz (2011) com uma espécie (*S. campestris*) da mesma família.

Tabela 2 - Rendimento do extrato diclorometânico em relação à biomassa seca das raízes *in vitro* de *Monteverdia floribunda* em diferentes dias de cultivo.

Dia de cultivo	Rendimento do extrato DCM em relação à massa seca (%)
Zero	3,60 ± 0,61
5	3,46 ± 0,41
10	3,30 ± 0,06
15	3,55 ± 0,15
20	3,11 ± 0,10
25	3,06 ± 0,12
30	2,95 ± 0,17
35	3,16 ± 0,11
40	3,55 ± 0,36
45	4,05 ± 0,22
50	3,64 ± 0,92
55	3,64 ± 0,43
60	3,44 ± 0,18
65	4,05 ± 0,74
70	4,15 ± 0,21
75	4,31 ± 0,41
80	3,44 ± 0,58
85	3,99 ± 0,27
90	4,02 ± 0,51

Não houve diferença no perfil químico das raízes de *M. floribunda* cultivadas *in situ* e *in vitro*. Os triterpenos 22 β -hidroxi-maitenina (1), maitenina (2), celastrol (3) e pristimirina (4) foram encontrados tanto nas raízes cultivadas *in situ* quanto nas produzidas *in vitro* (Figura 8), porém o que diferiu foi a concentração desses compostos. O acúmulo de 22 β -hidroximaitenina na raiz cultivada *in vitro* foi 6,47 vezes maior que na raiz cultivada *in situ* (1.196,87 e 184,91 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de PS de extrato, respectivamente). A concentração de maitenina (substância majoritária das raízes cultivadas *in vitro*) também foi superior nas raízes *in vitro* (5.586,08 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de PS de extrato), acumulando 9,33 vezes mais do que as raízes *in situ* (599,03 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de PS de extrato). Houve também uma produção acentuada de celastrol nas raízes *in vitro* (1.943,61 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de PS de extrato), acumulando 17,08 vezes mais que as raízes *in situ*. Quanto a pristimirina, esta foi a substância majoritária encontrada nas raízes cultivadas *in situ* e o seu acúmulo nestas raízes foi 20,28 vezes superior aos encontrados nas raízes *in vitro* (2.558,94 e 126,17 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de PS de extrato, respectivamente) (Tabela 3).

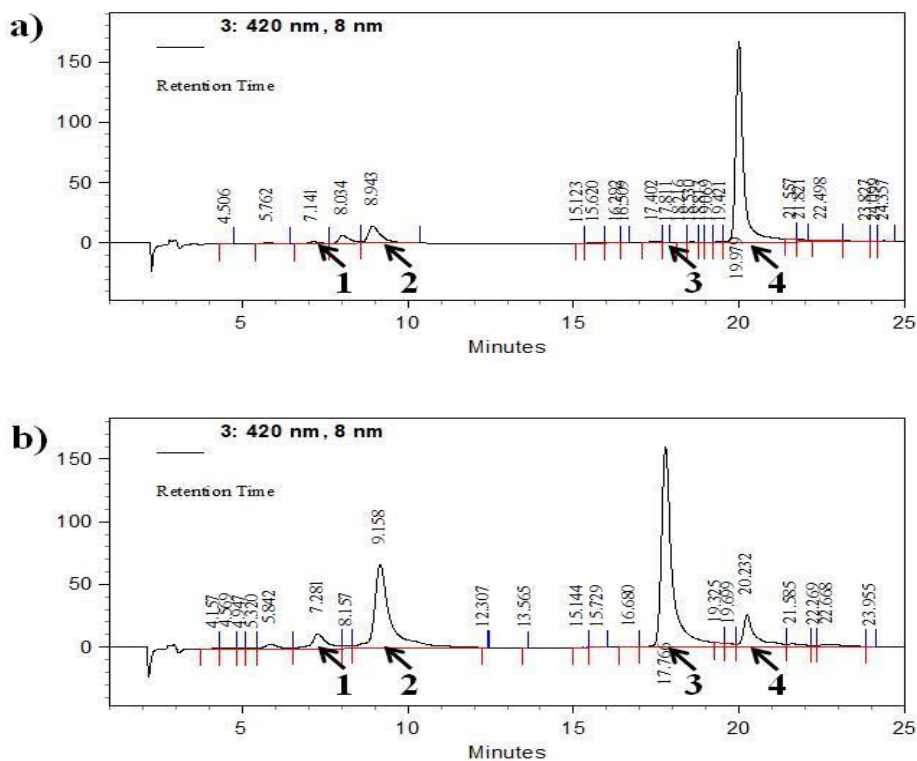
Estudos comparativos realizados com cultura de células em suspensão de *Maytenus ilicifolia* visando a produção de maitenina e raízes de *Peritassa laevigata* (Celastraceae) objetivando o acúmulo de 22 β -hidroxi-maitenina também mostraram que os teores desses TQs foram mais elevados no material cultivado *in vitro* do que nas raízes coletadas *in situ* (Coppede et al., 2014; Pina et al. 2016a). Esses exemplos permitem inferir que a técnica de cultura de tecido pode ser uma solução mais viável para a obtenção desses compostos do que a produção no campo, principalmente considerando o fato de que essas espécies são arbóreas, necessitam de mãos de 10 anos para atingir a fase adulta, e que ao ser retirada as raízes, a planta é exterminada.

Tabela 3- Variação na concentração de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina em raízes de *Monteverdia floribunda* cultivadas *in situ* e *in vitro*.

Material analisado	Triterpenos quinonametideos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ PS de extrato)			
	22 β -hidroxi-maitenina	Maitenina	Celastrol	Pristimirina
<i>In situ</i>	184,91 b	599,03 b	113,82 b	2.558,94 a
<i>In vitro</i>	1.196,87 a	5.586,08 a	1.943,61 a	126,17 b
CV (%)	26,76	9,30	14,36	4,71

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5% de probabilidade, separadamente para 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina

Figura 8 - Cromatogramas do extrato de raízes de *Monteverdia floribunda* obtidos por CLAE: a) raízes cultivadas *in situ*; b) raízes cultivadas *in vitro*; 22 β -hidroximaitenina (1), maitenina (2), celastrol (3) e pristimerina (4).



7.4 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE PRODUÇÃO DE TQs EM RAÍZES DE *M. FLORIBUNDA* CULTIVADAS *IN VITRO*

7.4.1 Análise do Extrato das Raízes de *M. floribunda* e Determinação da Curva de Produção de TQs *In Vitro* por FR-CLAE

A curva de crescimento mostrou que a produção de biomassa dobrou em quinze dias e o maior acúmulo ocorreu de 50 a 60 dias (1,65 a 1,68 g de PS), que representou aumentos de 3,5 vezes em relação à massa de inóculo empregada. Após 70 dias houve um declínio que se manteve até o último dia de avaliação (Figura 9). Este resultado corrobora com estudos com outras espécies da família

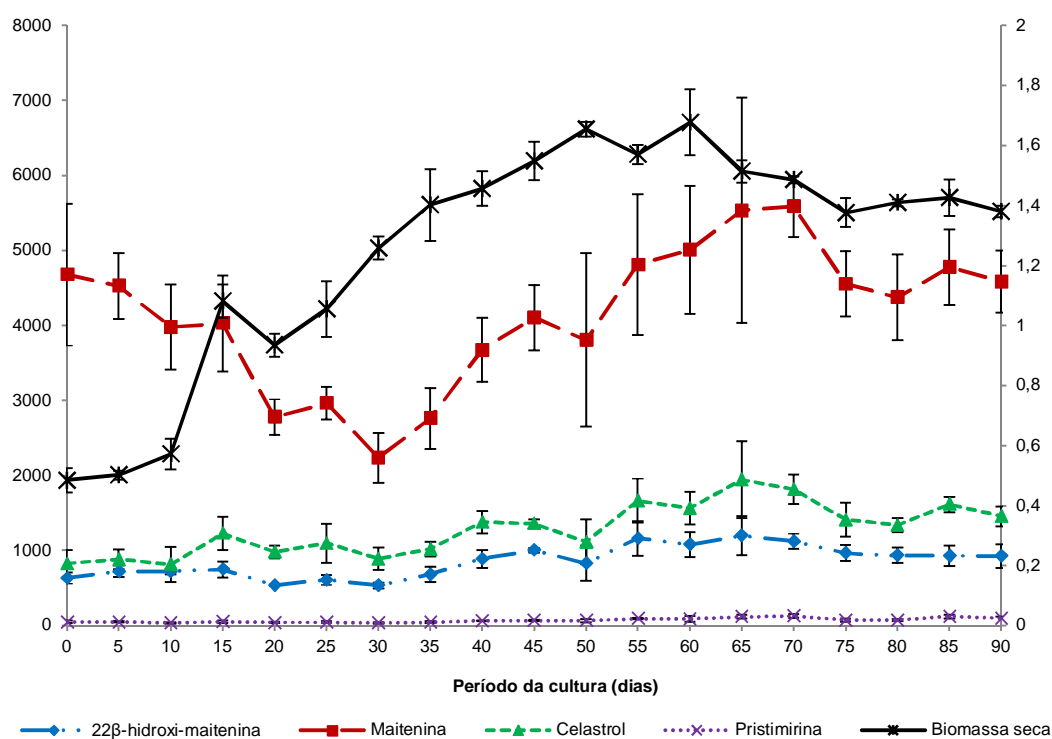
Celastraceae, como *Salacia campestris* (PAZ et al., 2013) e *Peritassa laevigata* (PINA et al., 2016).

As análises em CLAE das raízes de *M. floribunda* cultivadas por 90 dias *in vitro* evidenciaram que as mesmas produziram pristinirina (TR = 30,2 min), celastrol (TR = 21,7 min), maitenina (TR = 9,5 min) e 22 β -hidroxi-maitenina (TR = 7,8 min) em concentrações variadas no decorrer dos dias de cultura.

A produção de pristinirina pelas raízes de *M. floribunda* foi relativamente estável durante todo o período experimental. A maior acumulação de celastrol (1.943,61 \pm 512,74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato) ocorreu aos 65 dias, enquanto que maitenina e 22 β -hidroxi-maitenina foram produzidos em maior quantidade aos 70 dias (5.586,08 \pm 405,67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato e 1.196,87 \pm 101,35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato, respectivamente).

Trabalhos publicados com raízes de espécies pertencentes à família *Celastraceae*, mostraram também que no sexagésimo e septuagésimo dia do crescimento das raízes houve o maior acúmulo de maitenina (PAZ, 2013; PINA et al., 2016).

Figura 9- Concentração de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristinirina nas raízes de *Monteverdia floribunda* cultivadas *in vitro* por 95 dias.



7.4.2 Avaliação do Perfil Químico e Quantificação dos TQs Exudados em Meio de Cultivo das Raízes de *M. floribunda in vitro*

Foi quantificado no meio de cultura 22 β -hidroxi-maitenina (5,33 \pm 0,08 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco de extrato), maitenina (10,53 \pm 0,47 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato) e celastrol (8,27 \pm 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato) (Figura 10). Esses resultados mostram que as raízes excretam para o meio de cultura, em média, 0,3 % do teor de TQs que produzem nas raízes (Tabela 4).

A excreção de 22 β -hydroxy-maitenina e maitenina no meio de cultura por raízes cultivadas *in vitro* foi anteriormente relatada em *C. cognatum* (Pina et al. 2016). Entretanto, este é o primeiro relato de celastrol excretado no meio de cultura.

As plantas liberam, na rizosfera, uma variedade de compostos biologicamente ativos na forma de exsudato, cuja finalidade está relacionada às interações ecológicas com a comunidade microbiana, agindo não apenas como moléculas de sinalização, atrativas e estimulantes, mas também como inibidoras ou repelentes de organismos, que podem ser prejudiciais para a planta. Em geral, os compostos secretados pelas raízes pertencentes à classe dos fenólicos que promove atração de microrganismos benéficos a planta e os terpenóides que apresentam uma função de combater ou regular de forma direta ou indireta a presença de patógenos e endofíticos (BAETZ; MARTINOIA, 2014).

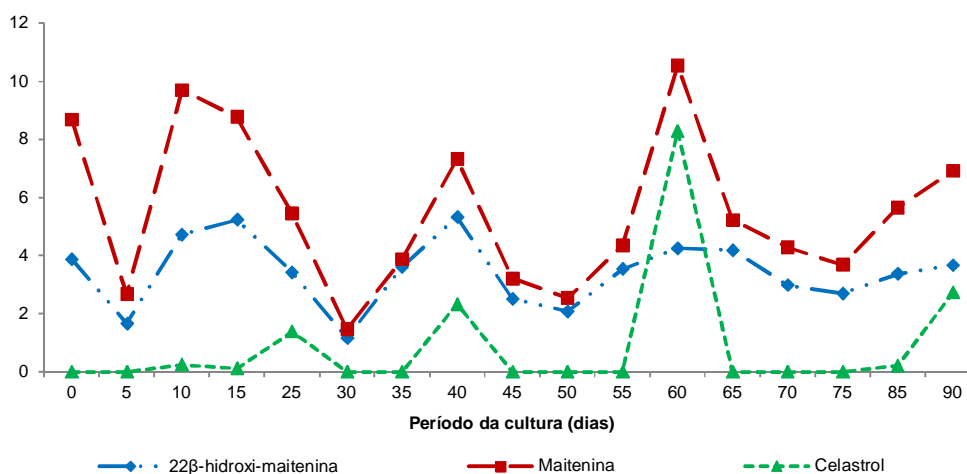
A presença de TQs no exsudato no meio de cultura, em que foram cultivadas as raízes *in vitro* de *M. floribunda*, pode elucidar o papel desses terpenóides no controle do endofíticos, considerando que em estudo realizado com raízes de outra espécie de *Celastraceae* (*Peritassa campestris*), também cultivada *in vitro*, foi demonstrado que houve correlação positiva entre o teor de TQs o crescimento de *Bacillus Megaterium* que é endofítico da espécies (INACIO et al., 2019).

A produção de TQs em meio de cultura, demonstrada no presente estudo, abre uma nova perspectiva para a obtenção em larga escala desses metabólitos, considerando que nesse caso não há necessidade da destruição da raiz para obtenção dos metabólitos de interesse, os quais podem ser obtidos de modo contínuo.

Tabela 4 - Comparação dos teores de triterpenos quinonametídios encontrados no meio de cultura e nas raízes *Monteverdia floribunda* cultivadas *in vitro* entre 60 e 70 dias de cultivo.

Material analisado	Triterpenos quinonametídios ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de PS de extrato)		
	22 β -hydroxy-maitenina	maitenina	celastrol
Raiz <i>in vitro</i>	1.196,9 (\pm 261,44)	5.586,1 (\pm 405,67)	1.943,6 (\pm 512,74)
Meio de cultura	5,33 (\pm 0,08)	10,53 (\pm 0,47)	8,27 (\pm 3,0)

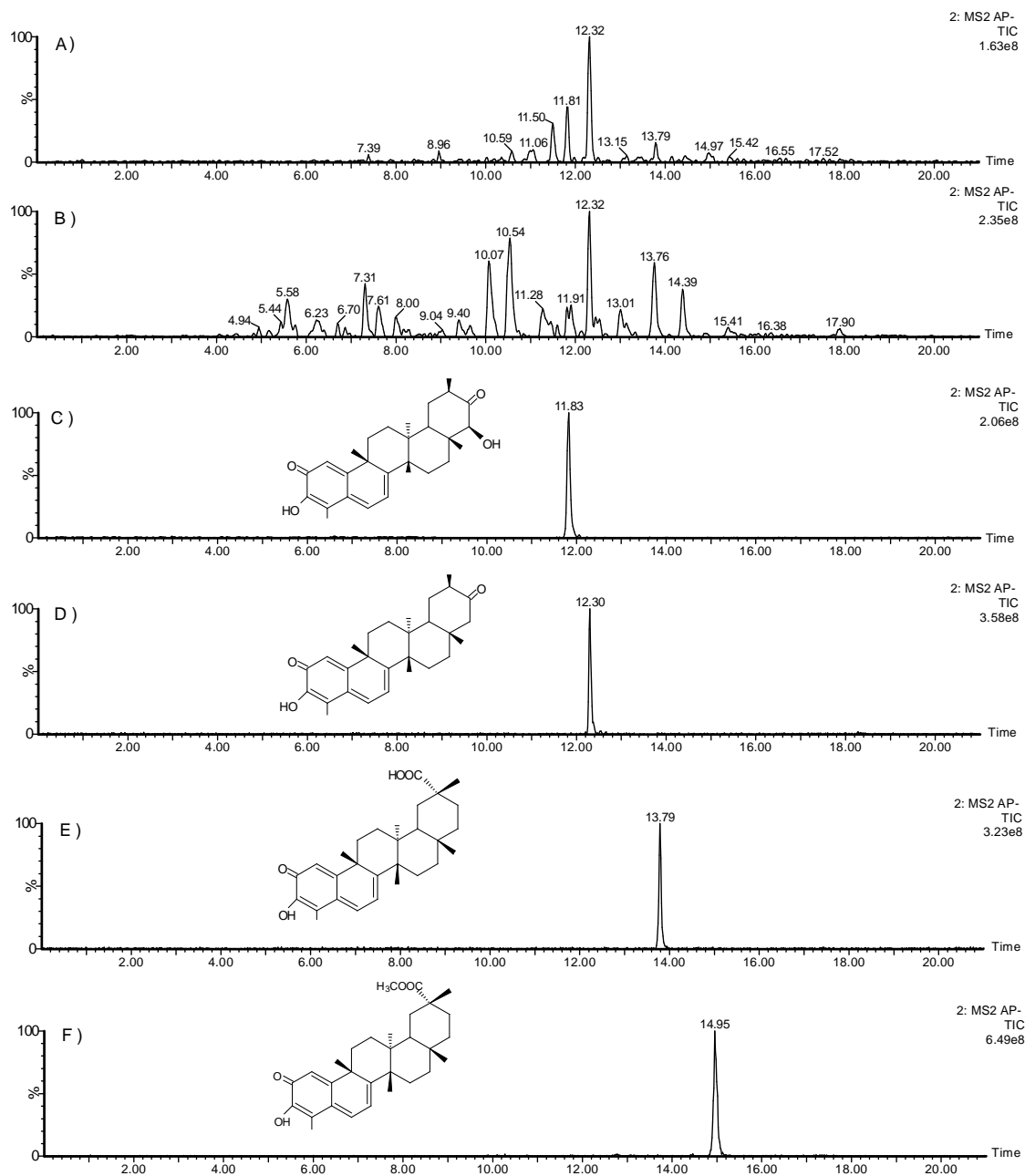
Figura 10 - Concentração de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina e celastrol no meio de cultura das raízes de *Monteverdia floribunda* cultivadas *in vitro* por 90 dias.



7.4.3 Análise do Extrato da Curva de Crescimento das Raízes e Meio de Cultura de *M. floribunda* cultivadas *In Vitro* e Padrões de Triterpenos Quinonametídios por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)

A análise em CLUE detectou os triterpenos quinonametídios 22 β -hidroxi-maitenina (Figura 11-C), maitenina (Figura 11-D) celastrol (Figura 11-E) e pristimerina (Figura 11-F), no extrato bruto de raízes adventícias de *M. floribunda* cultivadas *in vitro* (Figura 11-A). Além disso, também foram detectados no meio de cultura em que as raízes foram cultivadas os mesmos triterpenos, exceto a pristimerina (Figura 11-B).

Figura 11 - Cromatogramas obtidos por CLUE dos padrões de 22 β -hidroxi-maitenina (C), maitenina (D), celastrol (E) e pristimirina (F) e dos extratos de raízes cultivadas *in vitro* de *Monteverdia floribunda* (A) e extrato obtido do meio de cultivo das raízes (B).



7.5 CULTIVO DE RAÍZES DE *M. FLORIBUNDA* EM BIORREATORES DE COLUNA DE BOLHAS

Em quarenta dias, a produção de biomassa fresca de raízes cultivadas em Erlenmeyer aumentou de 2,86 vezes em relação ao peso inicial e no biorreator o aumento foi de 1,44 vezes mais em relação à massa de inóculo empregada.

Os triterpenos 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina foram produzidos tanto nas raízes cultivadas em biorreatores quanto nas cultivadas em erlenmeyers, o que diferiu foi a concentração desses compostos. O acúmulo de 22 β -hidroxi-maitenina na raiz cultivada em biorreator foi 2,13 vezes maior do que na raiz cultivada em erlen (314,80 e 147,76 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato, respectivamente). A concentração de maitenina, o composto majoritário das raízes, também foi superior nas raízes cultivadas em biorreatores (2.426,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato), acumulando 3,10 vezes mais que as raízes cultivadas em erlen (782,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato). A produção de celastrol nas raízes cultivadas em biorreatores também foi superior (704,44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato), acumulando 2,07 vezes mais que as raízes cultivadas em erlen. Assim como os outros TQs a pristimirina teve seu teor aumentado (2,21 vezes) quando as raízes foram cultivadas em biorreatores (16,37 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS de extrato) (Tabela 5).

Assim ficou evidenciado que a produção dos TQs foi maior em biorreator, entretanto, considerando o acúmulo de biomassa e o teor de TQs produzidos no Erlenmeyer e no biorreator, conclui-se que não houve diferença, em termos de produtividade das substâncias 22 β -hidroxi-maitenina, celastrol e pristimirina, enquanto que a produtividade de maitenina foi maior quando as raízes foram produzidas no biorreator.

O suprimento de ar ideal dentro do recipiente de cultura do biorreator é um fator importante e quando há quantidade excessiva de ar pode ocorrer a formação de espuma em grande quantidade, o que prejudica o cultivo em função do expressiva concentração de proteína que se forma nos tecidos (BAQUE et al 2012). Isso não foi observado nas culturas de *M. floribunda*, mostrando que a vazão de ar utilizada foi adequada e um fato importante observado nas raízes cultivadas em biorreator foi que a partir de vigésimo dias do início da cultura houve visivelmente a multiplicação do microrganismos endofítico, que apresenta uma coloração rósea.

Esse microrganismo se manteve fixado na estrutura de vidro esmerilhada, por onde o ar era liberado, comprometendo a aeração do meio e intensificando a proliferação até o quadragésimo dia de cultura (Figura 12).

Essa proliferação não foi observada na cultura em erlenmeyer, Assim, inferimos que o aumento no teor dos TQs nas raízes cultivadas em biorreatores está relacionada a presença do endofítico *M. thiocyonatum*. Em trabalho realizado com *Peritassa campestri*, outra espécie de celastraceae, foi elucidado que existe uma modulação na produção de maitenina quando raízes são cultivadas na presença de bactéria endofítica (INÁCIO et al., 2019).

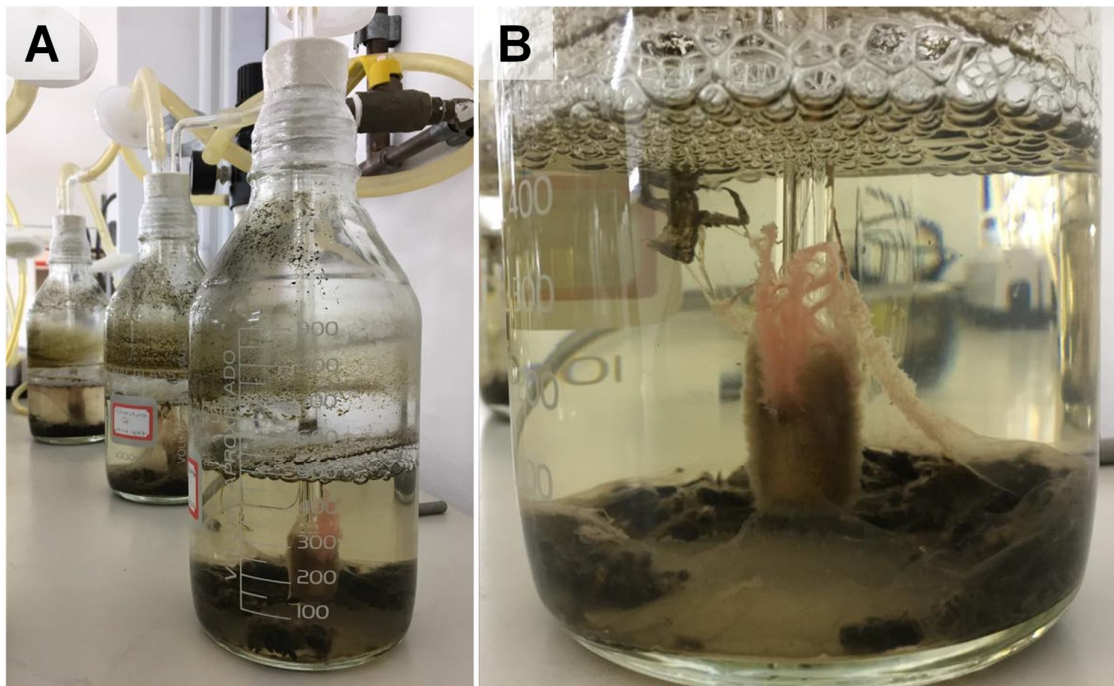
A contaminação bacteriana endofítica quando atinge níveis elevados nos tecidos pode assumir um caráter patogênico, e na cultura de tecido pode ocorrer mudança de pH do meio de cultura, redução da multiplicação celular e causar necrose de tecidos (LEIFERT; CASSELLS, 2001). Assim, uma proporção adequada entre o crescimento da planta e a multiplicação do endofítico deve ser estabelecida, para que haja uma relação simbiótica e mutualística, evitando portanto o estabelecimento de uma condição patogênica, o que tem sido observado com outros organismos (WHEELER et al., 2019).

Tabela 5 - Variação na concentração de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina em raízes de *Monteverdia floribunda* cultivadas em biorreator e em erlenmeyer.

Tratamento	Triterpenos quinonametideos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ PS de extrato)			
	22 β -hidroxi-maitenina	Maitenina	Celastrol	Pristimirina
Erlenmeyer	147,76 b	782,79 b	340,53 b	7,40 b
Biorreator	314,80 a	2.426,79 a	704,44 a	16,37 a
CV (%)	24,18	19,94	24,14	23,61

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5% de probabilidade, separadamente para 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina.

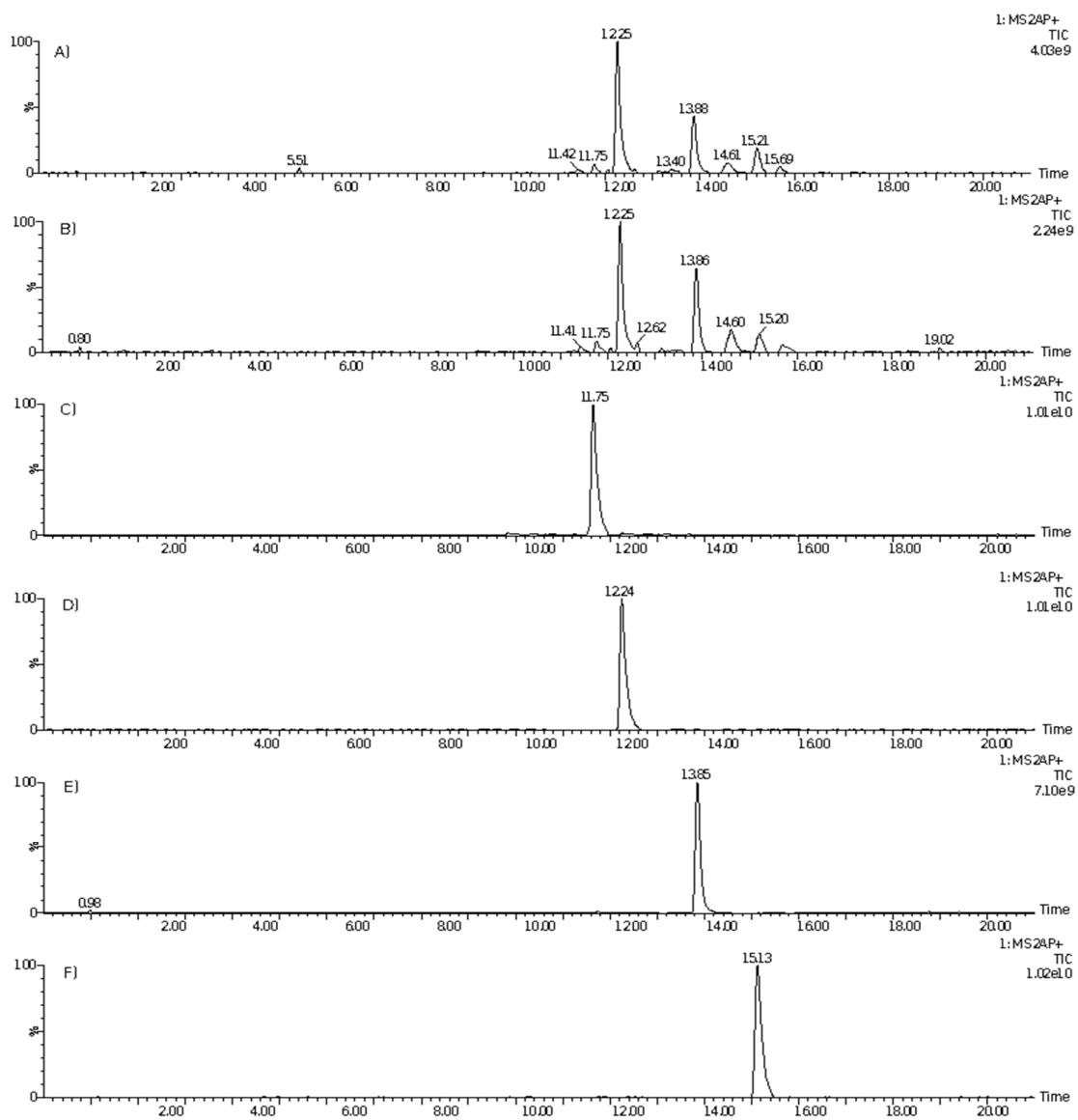
Figura 12 - Cultivo de raízes de *Monteverdia floribunda* em biorreatores do tipo coluna de bolhas, com capacidade para 1 L (A), formação de biofilme do endofítico (B).



7.5.1 Análise do Extrato das Raízes de *M. floribunda* Cultivadas em Biorreatores e em Erlenmeyers e Padrões de Triterpenos Quinonametídeos por CLUE

A análise em CLUE detectou os triterpenos quinonametídeos 22 β -hidroximaitenina (Figura 13-D), maitenina (Figura 13-E), celastrol (Figura 13-F) e pristimerina (Figura 13-G), no extrato bruto das raízes de *M. floribunda* cultivadas em biorreatores (Figura 13-A) e cultivadas em Erlenmeyer (Figura 13-B). Não houve diferença qualitativa no perfil químico entre os diferentes tratamentos.

Figura 13 - Cromatogramas obtidos por CLUE dos padrões de 22 β -hidroxi-maitenina (C), maitenina (D), celastrol (E) e pristimirina (F) e dos extratos de raízes de *Monteverdia floribunda* cultivadas em biorreatores (A), e em erlenmeyers(B).



7.6 ELICITAÇÃO DE RAÍZES *IN VITRO* DE *M. floribunda*

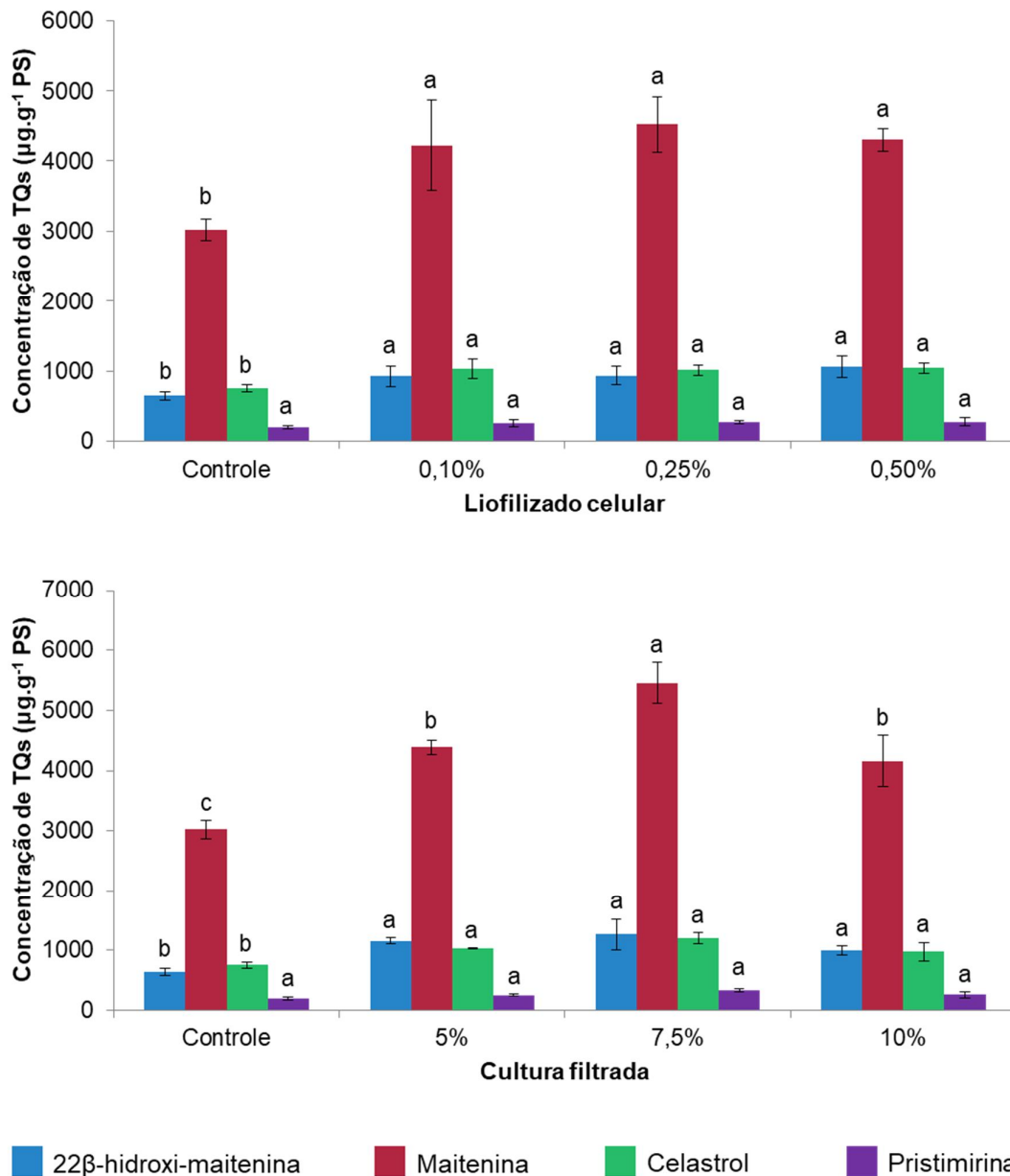
7.6.1 Elicitação De Raízes Cultivadas *in vitro* De *M. floribunda* Com o Microrganismo Endofítico *M. thiocyanatum*

A elicitação de raízes de *M. floribunda*, com *M. thiocyanatum*, de modo geral aumentou a produção de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina e celastrol, tanto com a utilização de liofilizado de células da bactéria, quanto do filtrado do meio de cultura em que o microorganismo se desenvolveu. Houve diferença significativa na produção dos TQs nas raízes quanto a concentração e tipo de elicitor aplicado, sendo o melhor resultado foi obtido com o filtrado à 7,5 % que promoveu acúmulo de 1,80 vezes mais maitenina do que o controle (Figura 14).

O estímulo de produção dos TQs por elicitação com endofítico parece ser uma estratégia viável para essa classe de compostos, pois anteriormente foi verificado que raízes de *P. campestris* cultivadas *in vitro* e elicidadas com o seu microrganismo endofítico *Bacillus megaterium* produziram até três vezes mais TQs do que o controle (INÁCIO et al., 2017).

Essa estratégia também tem sido utilizada com outras espécies de planta que também tiveram os teores de metabólitos secundários aumentados quando elicidadas com microrganismos endofíticos (SINGH et al., 2017; YUE et al. 2014; LI; TAO, 2009).

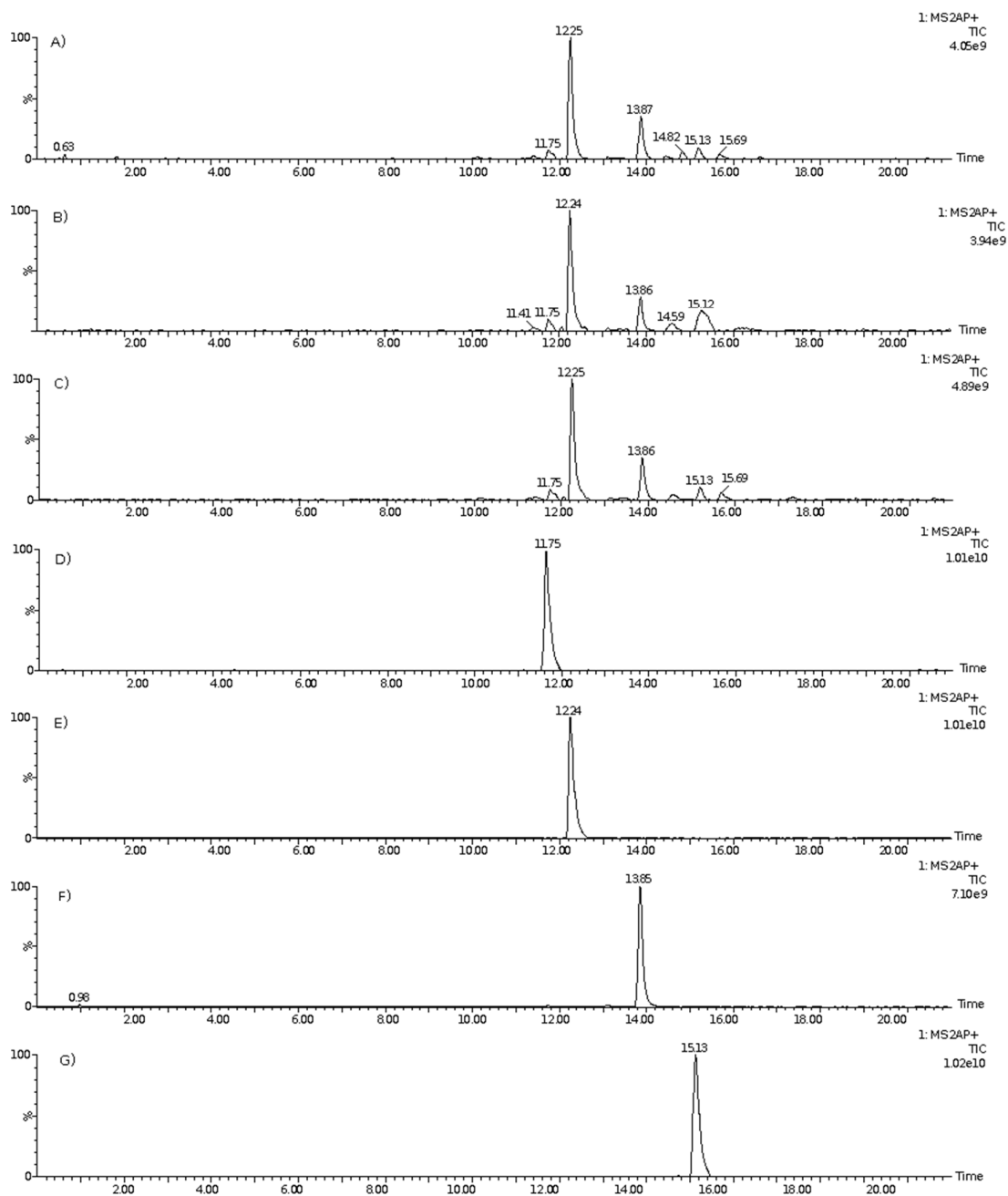
Figura 14- Variação na concentração de TQs produzidos por raízes *in vitro* de *Monteverdia floribunda* elicitadas com a cultura filtrada (CF) e liofilizado celular (LC) do endofítico *Methylobacterium thiocyanatum* em diferentes concentrações, após 15 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5 % de probabilidade, separadamente para 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina, celastrol e pristimirina.



7.6.1.1 Análise do extrato das raízes de *M. floribunda* elicitada com microrganismo endofítico por CLUE.

A análise em CLUE, detectou os triterpenos quinonametídeos 22 β -hidroximaitenina (Figura 15-D), maitenina (Figura 15-E), celastrol (Figura 15-F) e pristimerina (Figura 15-G), no extrato bruto das raízes de *M. floribunda* elicitadas com o filtrado (Figura 15-C), com o liofilizado celular (Figura 15-B) e controle (Figura 15-A). Não houve diferença qualitativa no perfil químico entre os diferentes tratamentos e controle.

Figura 15 - Cromatogramas obtidos por CLUE dos padrões de 22 β -hidroxi-maitenina (D), maitenina (E), celastrol (F) e pristimirina (G) e dos extratos de raízes de *Monteverdia floribunda* elicidadas com o filtrado (C), com o liofilizado celular (B) e com o controle (A).



7.6.2 Elicitação Química das Raízes *In Vitro* de *M. floribunda*

A produção de promotores de crescimento a exemplo de GA ou a utilização exógena de GA3 interfere positivamente na síntese de metabólitos secundários os quais, de modo geral, contribuem para a superação de estresse biótico e abiótico em que a planta está submetida e os inibidores de crescimento vegetal atuam inibindo a biossíntese de giberelina (GA) por bloqueio da formação de monooxigenases dependentes do citocromo P450, o que interfere direta ou indiretamente na formação de ácido abscísico, etileno, esteróis, flavonoides, terpenóides, alcaloides, entre outras classes de metabólitos secundários (RADEMACHER, 2000). Desse modo, é importante avaliar em cultura de células e tecidos esses compostos atuam como elicitores de metabólitos secundários de interesse.

No experimento realizado *in vitro* com raízes de *M. floribunda* houve um aumento do teor do TQS (22 β -hidroxi-maitenina) nas raízes cultivadas sem adição de ilicitores, entre o décimo e o décimo quinto dia de cultura, enquanto que de modo geral na presença de ilicitores a produção desse composto se manteve estável ao longo do tempo, com exceção da terbinafina que promoveu uma redução de 22 β -hidroxi-maitenina com o passar dos dias (Tabela 6).

A resposta de produção dos TQs frente aos elicitores químicos não seguiu um padrão. O ancymidol na concentração de 25 e 100 μ M por 10 dias de cultivo e 50 μ M por 15 dias elicitou 22 β -hidroxi-maitenina, produzindo em média 2 vezes mais desse composto do que o controle. A ação da giberelina (100 μ M) com 10 dias também foi positiva, com incremento de 1,3 vezes mais 22 β -hidroxi-maitenina do que o controle e em relação a maitenina o cultivo com 50 μ M de GA3 por 10 dias também promoveu um aumento de 1,5 vezes mais que o controle (Tabela 7).

Estudo realizado com aplicação de GA3 em *Cannabis sativa* mostrou que esse regulador tem um efeito positivo na produção de terpenóides, produzidos pela via do mevalonato, com aumento da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (MANSOURI et al., 2010). Isso pode explicar o aumento do teor de maitenina nas raízes de *M. floribunda*, uma vez que foi elucidado no presente trabalho (item 7.7) que a biossíntese desse composto se faz através da via do mevalonato.

O cultivo de raízes *in vitro* por 10 dias em meio de cultura contendo a associação de giberelina (25 μ M) + paclobutrazol (25 e 100 μ M) aumentou o teor da maitenina nas raízes em 1,6 vezes mais do que o controle. Um resultado ainda

melhor foi obtido com giberelina (50 μM) + paclobutrazol (100 μM), também em 10 dias, com uma produção de 2,5 vezes mais do que o controle (Tabela 7).

É comum a utilização do paclobutrazol em cultura de raízes de plantas medicinais. Entretanto, o seu efeito na produção de metabólitos secundários pode ser neutro como observado com os TQs acumulados nas raízes de *M. floribunda*, negativo como demonstrado com a espécie *Ophiopogon japonicas* quanto a produção de saponinas esteroidais (ZHANG, et al 2019) ou positivo a exemplo de *Catharanthus roseus*, quanto ao acúmulo de ajmalicina (JALEEL et al., 2007), sendo sempre necessário avaliar caso a caso. Contudo, quando o efeito é negativo ou neutro, a associação do paclobutrazol com GA3, pode contribuir para um aumento no composto de interesse, como observado com a produção de maitenina em *M. floribunda* e o acúmulo de ácido cafárico, nas raízes de *Echinacea purpura* cultivadas *in vitro* (JONES et al., 2009).

Um dado relevante do presente trabalho foi a constatação de que raízes de *M. floribunda* absorveram e acumularam paclobutrazol nos tecidos (Figura 16). Isso deve ser um alerta quanto ao uso indiscriminado dessa substância, em plantas alimentícias e medicinais, pois tem sido enquadrada na categoria de pesticida e tanto os Estados Unidos quanto a União Europeia estipulam que os resíduos de paclobutrazol nos vegetais devem estar abaixo de 0,01 mg kg⁻¹ (JIANG et al., 2019). Além disso, quando o paclobutrazol é aplicado em plantas que estão no campo há um acúmulo no solo, prejudicando várias espécies sensíveis a esse produto, podendo se tornar um grave problema ambiental (SHARMA; AWASTHI, 2005). O uso dessa substância em cultura *in vitro* poderá contribuir para a produção de compostos de interesse farmacêutico, desde que o teor residual do paclobutrazol no tecido das plantas e extratos seja bem controlado e que haja cuidado com o descarte do meio de cultura na natureza.

Raiz de *M. floribunda* cultivada, *in vitro* por 10 dias, na presença de terbinafina (25 μM) aumentou a produção de celastrol em 1,12 vezes mais do que o controle (Tabela 8).

O aumento do teor de celastrol nas raízes cultivadas *in vitro* na presença de terbinafina pode ser explicada pela inibição que essa substância promove quanto a produção do 2,3-oxidoesqualeno, que ocorre através da oxidação do esqualeno pela enzima esqualeno monooxigenase. Vários estudos têm mostrado uma relação direta e positiva da terbinafina e 2,3-oxidoesqualeno na biossíntese de triterpenos, tanto

em plantas cultivadas no campo quanto em cultura de tecidos (HENRY et al., 1992, FULTON et al., 1994; FLORES-SÁNCHEZ et al., 2002). Assim, considerando que *M. floribunda* produz friedelina, friedelinol e 28-hidroxi-3-oxo-friedelano e que os quinonametídios são biossintetizados a partir desse triterpenos pentacíclicos (SALAZAR, 1993; CORSINO et al., 2000) é possível afirmar que a terbinafina tem um efeito positivo na biossíntese do celastrol.

A pristimirina produzida em raiz de *M. floribunda*, ao contrário da 22 β -hidroximaitenina, maitenina e celastrol, não foi elicitada pelo GA3 e por nenhum dos inibidores de crescimento utilizados (Tabela 9) e além disso, a produção desse TQs foi reduzida com o aumento da concentração de uniconazol nas raízes cultivadas por 10 dias na presença dessa substância.

O uniconazol é ao mesmo tempo um inibidor de monooxigenase e um promotor de malonil CoA (ILAN; DOUGALL 1992; 1994). É considerado um regulador do crescimento de planta e atua na proteção ao estresses biótico e abiótico, estimula a biossíntese de lignina e portanto, fornece resistência mecânica às plantas (AHMAD et al., 2018)

O cultivo das raízes por 15 dias na presença de ancymidol, na concentração de 50 μ M, aumentou a produção de maitenina em 1,6 vezes quando comparado ao controle. O acymidol inibe a síntese de ácido giberélico e de celulose, tendo como principal mecanismo de ação na célula a inibição do ent-kaureno oxidase, uma monooxigenase dependente do citocromo P450, que catalisa a oxidação do ent-caureno em ácido ent-caurenóico (SHIVE; SISLER, 1976; COOLBAUGH et al., 1978; HOFMANNOVA et al., 2008). Em função disso, esse inibidor de crescimento tem sido utilizado em cultura de tecido para elicitar terpenóides a exemplo do taxol (VEERESHAM et al 2003).

Os melhores resultados desse experimento para a produção de TQs foram obtidos com os elicitores ancymidol, GA3 e associação de GA3 + placlobutrazol (Figura 17).

Todos os dados apresentados quanto ao efeito dos elicitores químicos foram monitorados por análises cromatográficas obtida por CLUE e por espectros de massas que confirmaram a presença dos TQs nas raízes cultivadas com os elicitores abióticos (Figura 16). Além disso, foi isolado por CLAE preparativo o pico majoritário apresentado na Figura 16-C e foi realizada a identificação estrutural por RMN (1D e 2D) de 1 H (Figura 21 e 22), em conjunto com o espectro dos mapas de

contorno HMQC (correlação heteronuclear de quantum múltiplo “Heteronuclear multiple-quantum correlation”) e HMBC (correlação heteronuclear a múltiplas ligações “Heteronuclear multiple-bond correlation”) (Figura 23 e 24; Tabela 11). Os dados obtidos mostraram dois sinais característicos na região de hidrogênios pertencentes ao grupamento triazol; δH 8,9 s (1H) e δH 8,0 s (1H); hidrogênios aromáticos; δH 7,43 m (4H), um hidrogênio de ligação dupla; um hidrogênio ligado a grupamento oxigenado; δH 4,63 s, além de três grupos metílicos δH 0,65 (9H), o que permitiu identificar a substância isolada das raízes, cultivadas *in vitro*, como sendo o uniconazol (Figura 18). A tabela 10 apresenta os dados comparativos espectrais do uniconazol obtidos experimentalmente em conjunto com dados da literatura.

O isolamento e a identificação do uniconazol é um dado importante porque mostra que essa substância foi absorvida do meio de cultura e incorporada aos tecidos das raízes. Embora essa substância não tenha, de modo geral, promovido efeito significativo quanto ao acúmulo de TQs ela passou a ser uma substância halogênica. Quando um composto é adicionado ao meio de cultura e passa a fazer parte da planta é necessário questionar se a presença da substância é positiva ou negativa, pois pode modificar a ação terapêutica do extrato ou exigir processos adicionais de purificação para eliminar o composto quando é indesejável.

Assim como foi identificado a presença do uniconazol nas raízes também foi confirmada por espectroscopia de massa a incorporação do acymidol, paclobutrazol e terbinafina nos tecidos das raízes (ANEXO III).

Tabela 6 - Variação na concentração de 22 β -hidroxi-maitenina ($\mu\text{g/g PS}$) produzida por raízes *in vitro* de *M. floribunda* elicitadas por ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina e giberelina nas concentrações 25, 50 e 100 μM e associação de giberelina (25, 50 e 100 μM) + paclobutrazol (25, 50 e 100 μM), após 10, 15 e 20 dias de cultivo.

Elicitor	Concentração (μM)	22 β -hidroxi-maitenina ($\mu\text{g.g}^{-1}$ PS)				CV(%)
		Dias de cultivo				
		10	15	20		
Ancymidol	0	277,87 cB	426,51 bA	478,24 aA	7,26	
	25	553,38 aA	444,23 bB	405,74 aB	4,35	
	50	414,69 bB	580,85 aA	432,71 aB	5,13	
	100	568,66 aA	470,25 bB	464,71 aB	3,64	
	CV(%)	3,08	3,02	7,83		
Uniconazol	0	277,87 aB	426,51 aA	478,24 aA	7,26	
	25	252,94 aA	411,28 aA	329,42 bA	13,58	
	50	434,29 aA	307,24 bA	304,14 bA	17,88	
	100	220,79 aA	256,50 bA	259,78 bA	7,10	
	CV(%)	18,25	6,76	12,32		
Paclobutrazol	0	277,87 aB	426,51 aA	478,24 aA	7,26	
	25	350,97 aA	323,70 aA	246,65 bA	9,46	
	50	252,18 aA	288,82 aA	313,06 bA	12,75	
	100	249,31 aA	205,18 aA	259,51 bA	8,60	
	CV(%)	11,86	8,70	8,12		
Terbinafina	0	277,87 aB	426,51 aA	478,24 aA	7,26	
	25	599,48 aA	296,71 bA	386,90 bA	18,41	
	50	372,93 aA	380,05 bA	190,80 cB	8,27	
	100	430,53 aA	282,79 bB	236,95 cB	7,95	
	CV(%)	16,86	5,51	9,09		
Giberelina	0	277,87 bB	426,51 aA	478,24 aA	7,26	
	25	250,61 bA	369,47 aA	262,62 aA	16,84	
	50	286,63 bA	313,40 aA	324,04 aA	9,47	
	100	358,08 aA	221,96 aA	388,10 aA	12,08	
	CV(%)	6,17	11,97	13,25		
Giberelina 25 μM + Paclobutrazol	0	277,87 aB	426,51 aA	478,24 aA	7,26	
	25	476,19 aA	389,10 aA	365,63 aA	9,28	
	50	354,66 aA	303,86 bA	251,32 aA	9,41	
	100	372,24 aA	311,80 bA	305,73 aA	7,31	
	CV(%)	5,87	7,82	11,03		
Giberelina 50 μM + Paclobutrazol	0	277,87 aB	426,51 aA	478,24 aA	7,26	
	25	411,64 aA	250,29 aA	319,68 bA	16,89	
	50	403,16 aA	304,08 aA	237,10 cA	12,50	
	100	558,94 aA	331,95 aA	224,32 cA	13,05	
	CV(%)	16,32	8,47	7,20		
Giberelina 100 μM + Paclobutrazol	0	277,87 aB	426,51 aA	478,24 aA	7,26	
	25	285,47 aA	383,72 aA	327,90 bA	8,78	
	50	249,52 aA	283,04 bA	282,63 bA	5,70	
	100	233,92 aA	184,08 cA	209,88 bA	19,95	
	CV(%)	12,29	10,14	7,91		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula separadamente para as diferentes concentrações e maiúscula, separadamente para os diferentes dias não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5% de probabilidade.

Tabela 7- Variação na concentração de maitenina ($\mu\text{g/g PS}$) produzida por raízes *in vitro* de *M. floribunda* elicitadas por ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina e giberelina nas concentrações 25, 50 e 100 μM e associação de giberelina (25, 50 e 100 μM) + paclobutrazol (25, 50 e 100 μM), após 10, 15 e 20 dias de cultivo.

Elicitor	Concentração (μM)	maitenina ($\mu\text{g.g}^{-1}$ PS)			
		Dias de cultivo			CV(%)
		10	15	20	
Ancymidol	0	1273,80 aA	1439,28 bA	1618,97 aA	7,95
	25	2223,08 aA	1489,42 bA	1132,99 bA	8,81
	50	1391,25 aB	2365,03 aA	1252,12 bB	10,78
	100	1804,04 aA	1543,26 bB	1503,67 aB	2,56
	CV(%)	7,84	9,52	6,06	
Uniconazol	0	1273,80 aA	1439,28 aA	1618,97 aA	7,95
	25	1061,54 aA	1033,32 aA	1235,04 aA	7,10
	50	1723,56 aA	1086,96 aA	1213,22 aA	19,44
	100	1511,92 aA	867,88 aA	962,17 aA	14,49
	CV(%)	18,70	8,75	7,03	
Paclobutrazol	0	1273,80 aA	1439,28 aA	1618,97 aA	7,95
	25	1458,37 aB	1646,40 aA	998,00 bC	3,22
	50	1454,87 aA	1327,77 aA	1653,78 aA	8,43
	100	1397,95 aA	1039,64 aB	1041,23 bB	1,10
	CV(%)	6,62	6,67	5,99	
Terbinafina	0	1273,80 aA	1439,28 aA	1618,97 aA	7,95
	25	2623,72 aA	1387,29 aA	1801,28 aA	11,11
	50	1628,44 aA	950,96 aA	744,01 bA	21,34
	100	2062,59 aA	1298,47 aA	701,89 bA	17,74
	CV(%)	13,56	16,44	11,69	
Giberelina	0	1273,80 bA	1439,28 aA	1618,97 aA	7,95
	25	1366,23 bA	1198,70 aA	1269,63 bA	0,83
	50	1917,73 aA	1038,69 aB	1177,03 bB	4,99
	100	1165,19 bB	957,87 aB	1803,58 aA	8,68
	CV(%)	6,72	8,05	4,94	
Giberelina 25 μM + Paclobutrazol	0	1273,80 bA	1439,28 aA	1618,97 aA	7,95
	25	2064,25 aA	1339,58 aA	1641,94 aA	10,91
	50	1378,91 bA	1483,70 aA	991,96 bB	4,88
	100	2076,54 aA	791,82 aA	1132,80 bA	27,48
	CV(%)	7,37	24,21	12,77	
Giberelina 50 μM + Paclobutrazol	0	1273,80 bA	1439,28 aA	1618,97 aA	7,95
	25	1400,26 bA	1062,28 aA	1552,08 aA	10,99
	50	1324,63 bA	1202,29 aA	1001,63 bA	15,34
	100	3224,14 aA	1594,95 aB	1415,29 aB	12,71
	CV(%)	15,39	8,34	8,29	
Giberelina 100 μM + Paclobutrazol	0	1273,80 aA	1439,28 aA	1618,97 aA	7,95
	25	1700,12 aA	2133,93 aA	1668,40 aA	6,93
	50	1531,57 aA	1093,97 aA	1422,05 aA	16,16
	100	1482,84 aA	856,57 aA	854,18 bA	20,56
	CV(%)	12,98	11,61	12,48	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula separadamente para as diferentes concentrações e maiúscula, separadamente para os diferentes dias não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5% de probabilidade.

Tabela 8 - Variação na concentração de celastrol ($\mu\text{g/g}$ PS) produzida por raízes *in vitro* de *M. floribunda* elicitadas por ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina e giberelina nas concentrações 25, 50 e 100 μM e associação de giberelina (25, 50 e 100 μM) + paclobutrazol (25, 50 e 100 μM), após 10, 15 e 20 dias de cultivo.

Elicitor	Concentração (μM)	Celastrol ($\mu\text{g.g}^{-1}$ PS)			
		Dias de cultivo			CV(%)
		10	15	20	
Ancymidol	0	925,07 aA	821,54 aA	826,65 aA	8,17
	25	1049,12 aA	596,17 aC	711,51 aB	4,21
	50	863,27 aA	851,38 aA	657,61 aA	13,08
	100	673,29 aA	711,32 aA	580,04 aA	2,97
	CV(%)	5,24	8,83	11,50	
Uniconazol	0	925,07 aA	821,54 aA	826,65 aA	8,17
	25	717,04 aA	812,48 aA	658,07 aA	11,59
	50	674,80 aA	606,49 bA	507,09 aA	7,69
	100	776,58 aA	434,45 bA	481,53 aA	20,53
	CV(%)	14,93	9,51	9,28	
Paclobutrazol	0	925,07 aA	821,54 aA	826,65 aA	8,17
	25	746,15 aA	762,63 aA	622,59 aA	6,60
	50	710,10 aA	582,74 bA	786,91 aA	4,81
	100	428,33 aA	586,54 bA	529,60 aA	12,37
	CV(%)	6,54	7,04	9,97	
Terbinafina	0	925,07 bA	821,54 aA	826,65 aA	8,17
	25	1036,89 aA	620,27 bA	758,02 aA	6,73
	50	798,16 cA	873,62 aA	642,63 aA	7,65
	100	687,54 dA	609,41 bA	380,58 bB	6,86
	CV(%)	4,26	9,58	8,87	
Giberelina	0	925,07 aA	821,54 aA	826,65 aA	8,17
	25	410,90 cB	767,13 aA	468,32 aB	9,64
	50	829,34 aA	537,15 bA	633,06 aA	6,40
	100	618,56 bA	398,29 cB	700,49 aA	7,30
	CV(%)	6,98	7,45	9,49	
Giberelina 25 μM + Paclobutrazol	0	925,07 aA	821,54 aA	826,65 aA	8,17
	25	710,61 bA	761,03 aA	623,82 bA	6,23
	50	587,59 bB	712,81 aA	555,30 bB	4,59
	100	664,99 bA	685,30 aA	508,50 bA	9,73
	CV(%)	4,36	8,41	9,44	
Giberelina 50 μM + Paclobutrazol	0	925,07 aA	821,54 aA	826,65 aA	8,17
	25	683,46 bA	545,12 bA	579,46 bA	8,01
	50	618,73 bA	590,47 bA	479,86 bA	11,67
	100	990,68 aA	616,88 bB	474,45 bC	5,59
	CV(%)	8,01	7,23	10,00	
Giberelina 100 μM + Paclobutrazol	0	925,07 aA	821,54 aA	826,65 aA	8,17
	25	669,09 aA	754,16 aA	620,07 aA	3,71
	50	527,97 aA	482,26 bA	603,90 aA	6,57
	100	737,10 aA	493,53 bA	506,19 aA	12,21
	CV(%)	9,08	6,74	8,26	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula separadamente para as diferentes concentrações e maiúscula, separadamente para os diferentes dias não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5% de probabilidade.

Tabela 9 - Variação na concentração de pristimirina ($\mu\text{g/g}$ PS) produzida por raízes *in vitro* de *M. floribunda* elicitadas por ancymidol, uniconazol, paclobutrazol, terbinafina e giberelina nas concentrações 25, 50 e 100 μM e associação de giberelina (25, 50 e 100 μM) + paclobutrazol (25, 50 e 100 μM), após 10, 15 e 20 dias de cultivo.

Elicitor	Concentração (μM)	Pristimirina ($\mu\text{g.g}^{-1}$ PS)			
		Dias de cultivo			CV(%)
		10	15	20	
Ancymidol	0	259,77 aA	94,32 aB	101,31 bB	10,50
	25	130,27 bA	65,75 aA	218,64 aA	13,73
	50	80,94 cA	131,68 aA	71,35 bA	28,01
	100	90,06 cA	108,35 aA	88,35 bA	13,64
	CV(%)	9,05	24,43	15,75	
Uniconazol	0	259,77 aA	94,32 aB	101,31 aB	10,50
	25	187,70 bA	81,90 aA	110,23 aA	15,80
	50	85,98 cA	310,34 aA	192,27 aA	26,67
	100	48,51 dB	179,82 aA	64,42 aA	16,60
	CV(%)	7,91	25,97	23,17	
Paclobutrazol	0	259,77 aA	94,32 bB	101,31 bB	10,50
	25	71,13 cB	184,85 aA	84,34 bA	12,27
	50	75,56 cA	72,83 bA	83,71 bA	12,72
	100	133,17 bA	59,94 bA	184,27 aA	13,72
	CV(%)	8,43	14,94	14,38	
Terbinafina	0	259,77 aA	94,32 cB	101,31 aB	10,50
	25	250,88 aA	70,56 cB	125,57 aB	14,34
	50	126,52 bA	286,28 aA	168,28 aA	14,10
	100	71,62 bC	237,04 bA	109,33 aB	4,56
	CV(%)	12,61	8,68	15,87	
Giberelina	0	259,77 aA	94,32 bB	101,31 aB	10,50
	25	164,22 aA	244,80 aA	139,51 aA	39,57
	50	226,17 aA	60,45 bB	187,16 aA	16,95
	100	120,34 aA	80,84 bA	147,31 aA	26,90
	CV(%)	16,54	17,97	43,45	
Giberelina 25 μM + Paclobutrazol	0	259,77 aA	94,32 bB	101,31 aB	10,50
	25	134,37 bA	87,94 bA	114,70 aA	15,58
	50	141,28 bA	177,52 aA	94,27 aA	13,40
	100	135,89 bA	178,97 aA	80,03 aA	16,64
	CV(%)	11,77	13,81	17,74	
Giberelina 50 μM + Paclobutrazol	0	259,77 aA	94,32 bB	101,31 aB	10,50
	25	181,32 bA	88,66 bB	76,63 aB	18,87
	50	142,32 bA	81,60 bA	148,76 aA	15,91
	100	141,67 bA	180,04 aA	195,32 aA	22,83
	CV(%)	7,75	24,06	25,29	
Giberelina 100 μM + Paclobutrazol	0	259,77 aA	94,32 aB	101,31 bB	10,50
	25	170,89 aA	121,41 aA	251,84 aA	16,65
	50	140,28 aA	193,68 aA	132,84 bA	15,82
	100	81,20 aB	154,37 aA	64,87 bB	17,16
	CV(%)	11,22	14,10	20,81	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula separadamente para as diferentes concentrações e maiúscula, separadamente para os diferentes dias não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5% de probabilidade.

Figura 16 - Cromatogramas obtidos por CLUE dos extratos de raízes de *Monteverdia floribunda* cultivadas *in vitro* e elicidadas: (A) controle, (B) ancymidol, (C) uniconazol, (D) paclobutrazol, (E) terbinafina, (F) giberelina-GA3, (G) associação de giberelina + paclobutrazol, e dos padrões: (H) 22 β -hidroxi-maitenina, (I) maitenina, (J) celastrol e (K) pristimirina.

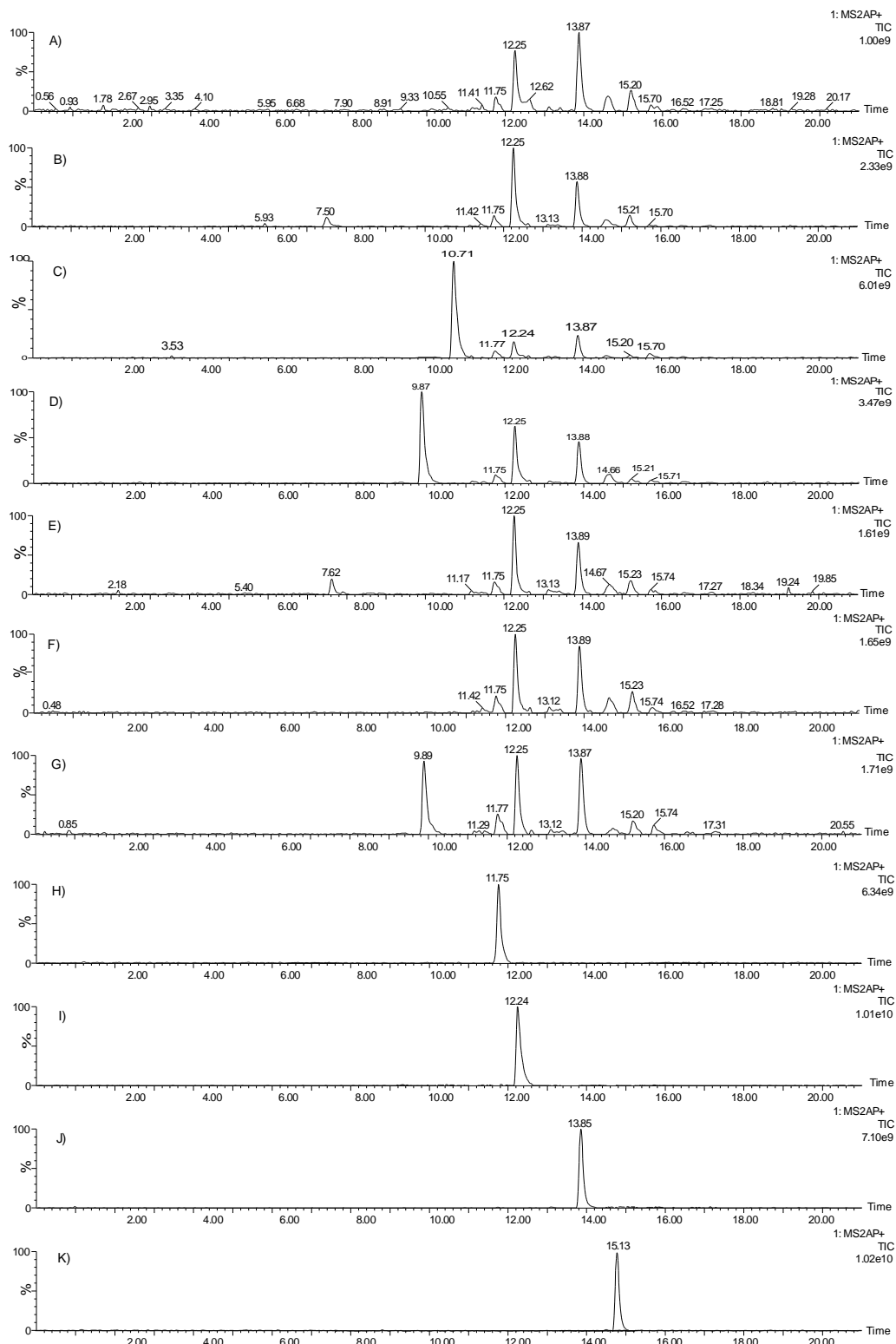
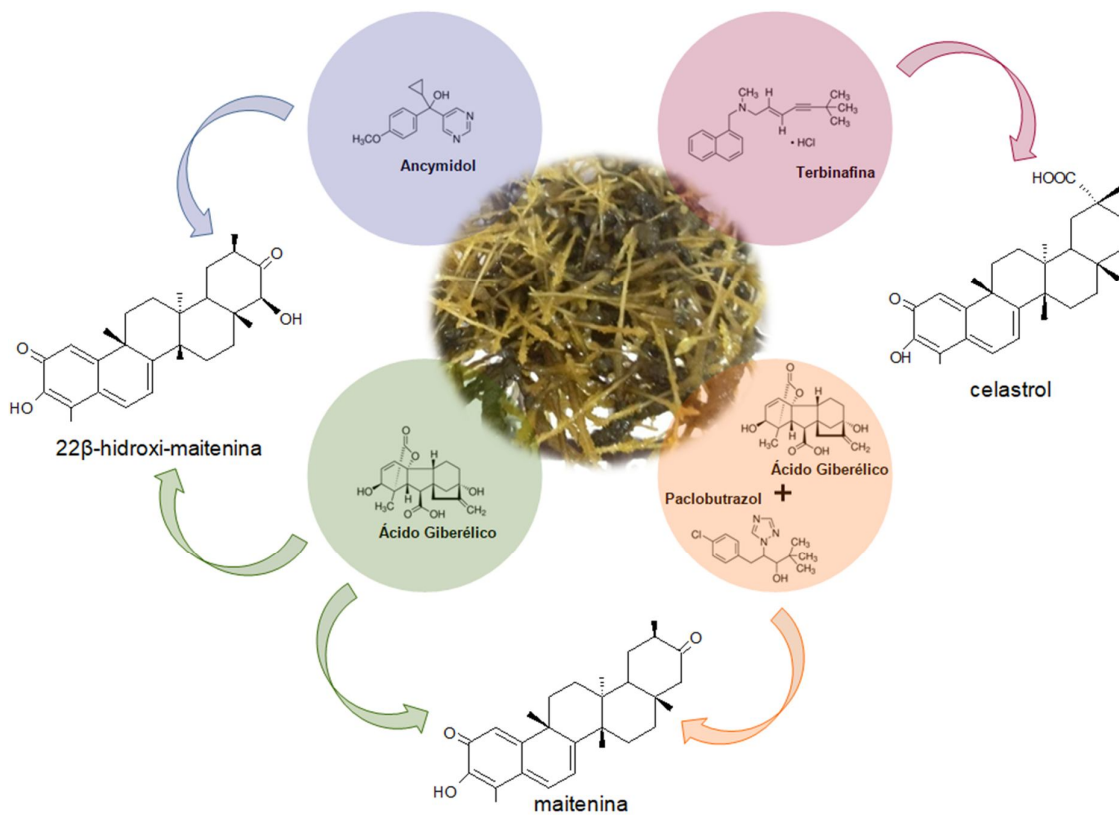
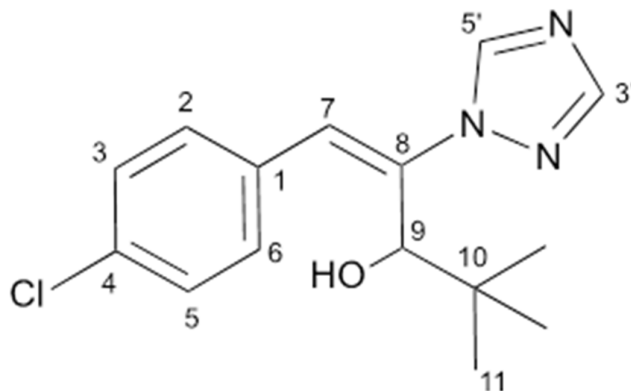


Figura 17 - Elictores químicos e a produção de triterpenos quinonametídios em raízes de *Monteverdia floribunda*.



Fonte: Mayara Valdevite

Figura 18 - Estrutura química do uniconazol-P.



Fonte: Mayara Valdevite

Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (mapa de contorno HMQC) do uniconazol em comparação com o uniconazol da literatura*

	uniconazol(CD_3OD)		uniconazol*(CDCl_3)
	^1H (δ)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)
C-1	-	133,6	133,05
C-2	7,43 m (4H)	130,2	129,95
C-3	7,43 m (4H)	128,7	128,80
C-4	-	133,9	134,99
C-5	7,43 m (4H)	128,7	128,80
C-6	7,43 m (4H)	130,2	129,95
C-7	7,08 s (1H)	128,9	128,65
C-8	-	138,4	138,34
C-9	4,63 s	74,0	75,48
C-10	-	35,8	36,06
C-11	0,65 s (9H)	25,2	25,93
C-3'	8,09 s (1H)	150,7	151,02
C-5'	8,9 s (1H)	144,6	143,14

*Sugiura, M.; Kimura, A.; Fujiwara, H. Discrimination of enantiomers by means of NMR spectroscopy using chiral liquid crystalline solution: application to triazole fungicides, uniconazole and diniconazole, *Magn. Reson. Chem.* 44, 121-126, 2006.

Tabela 11 - Mapa de contorno HMBC do uniconazol.

• C-5' (8,9)	→	150,7 (C-3')
• C-3' (8,0)	→	144,6 (C-5')
• 7,0 (C-7)	→	138,4 (C-8); 130,2 (C-2); 74,0 (C-9)
• 4,6 (C-9)	→	128,9 (C-7); 35,8 (C-10); 25,2 (C-11)
• 0,65 (C-11)	→	74,0 (C-9); 35,8 (C-10)

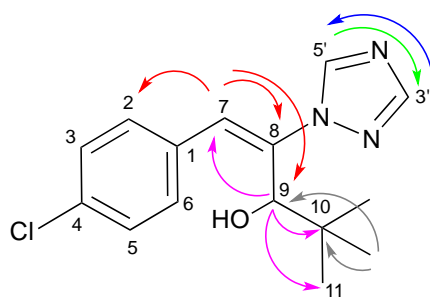


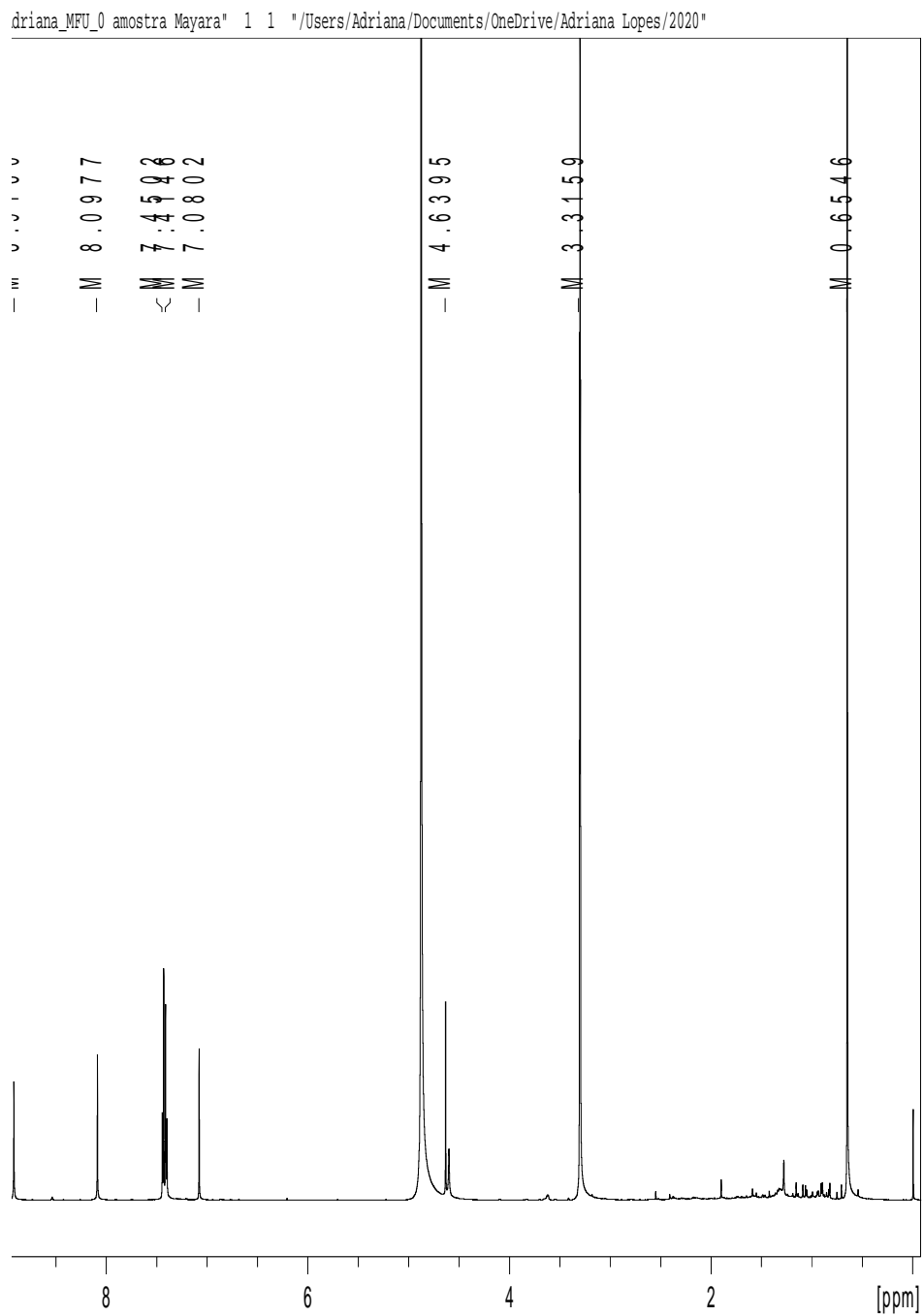
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H do uniconazol (600 MHz, MeOD).

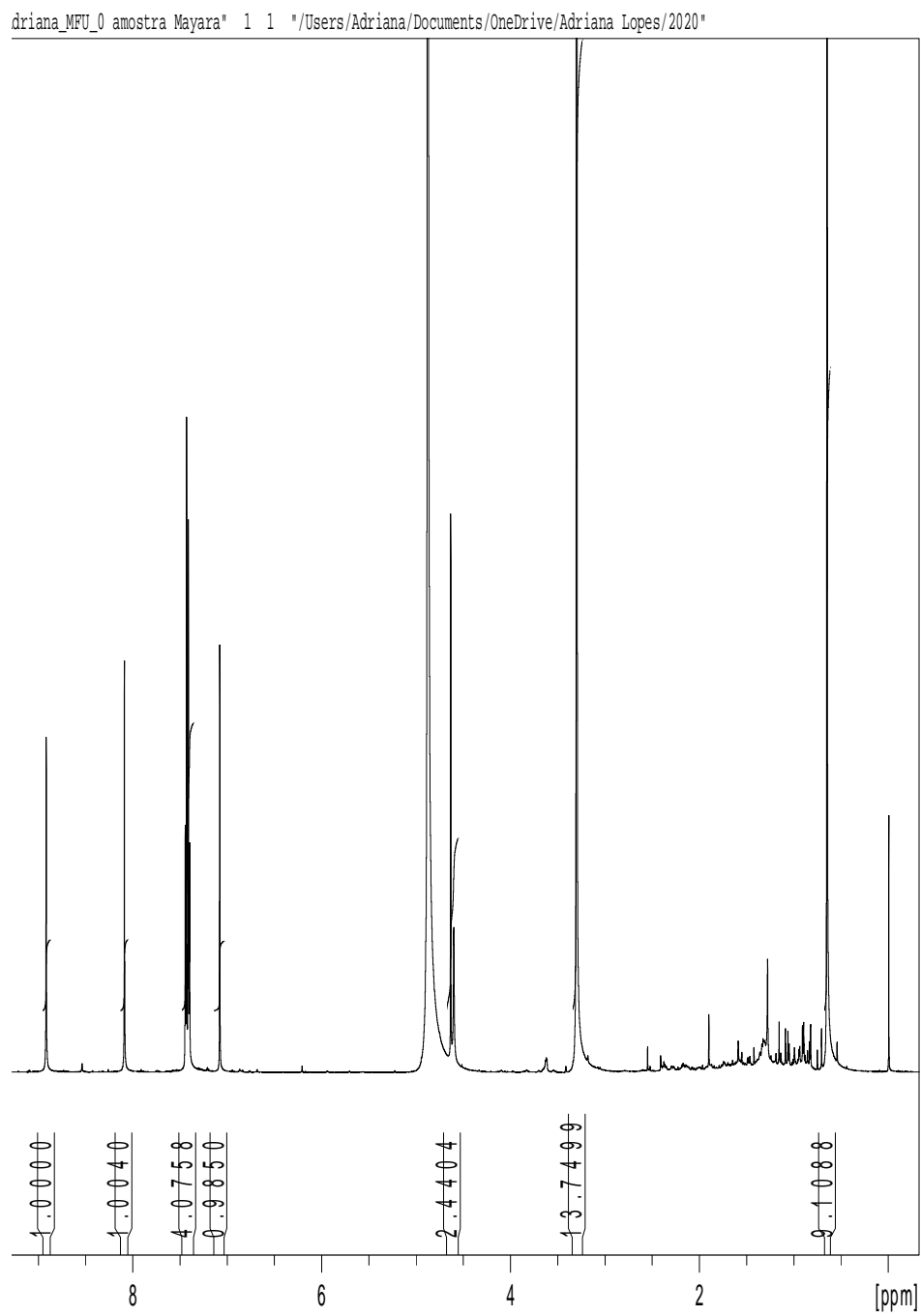
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H do uniconazol com integrais (600 MHz, MeOD).

Figura 21 - Mapa de contorno de gHMQC do uniconazol (600 MHz, MeOD).

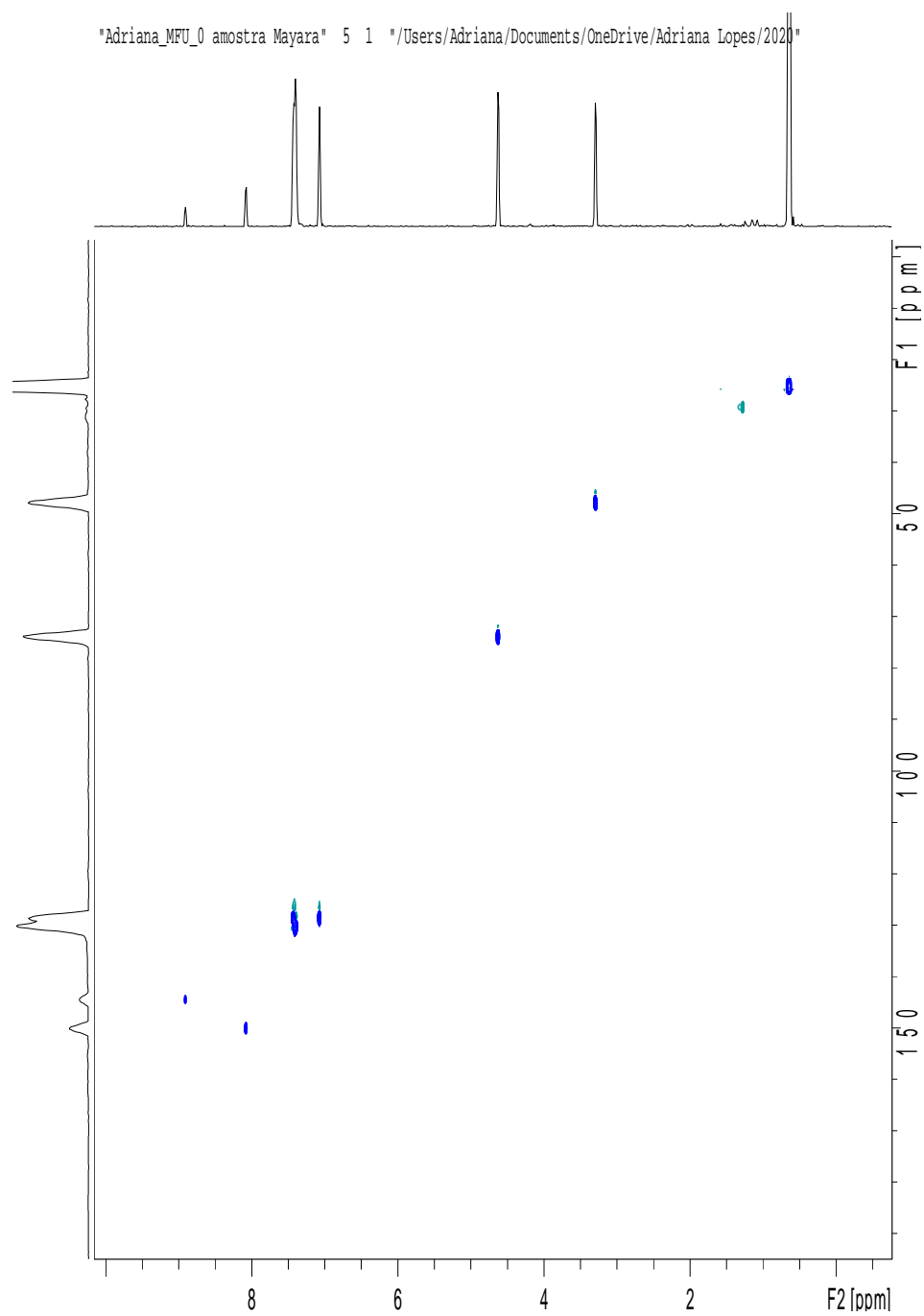
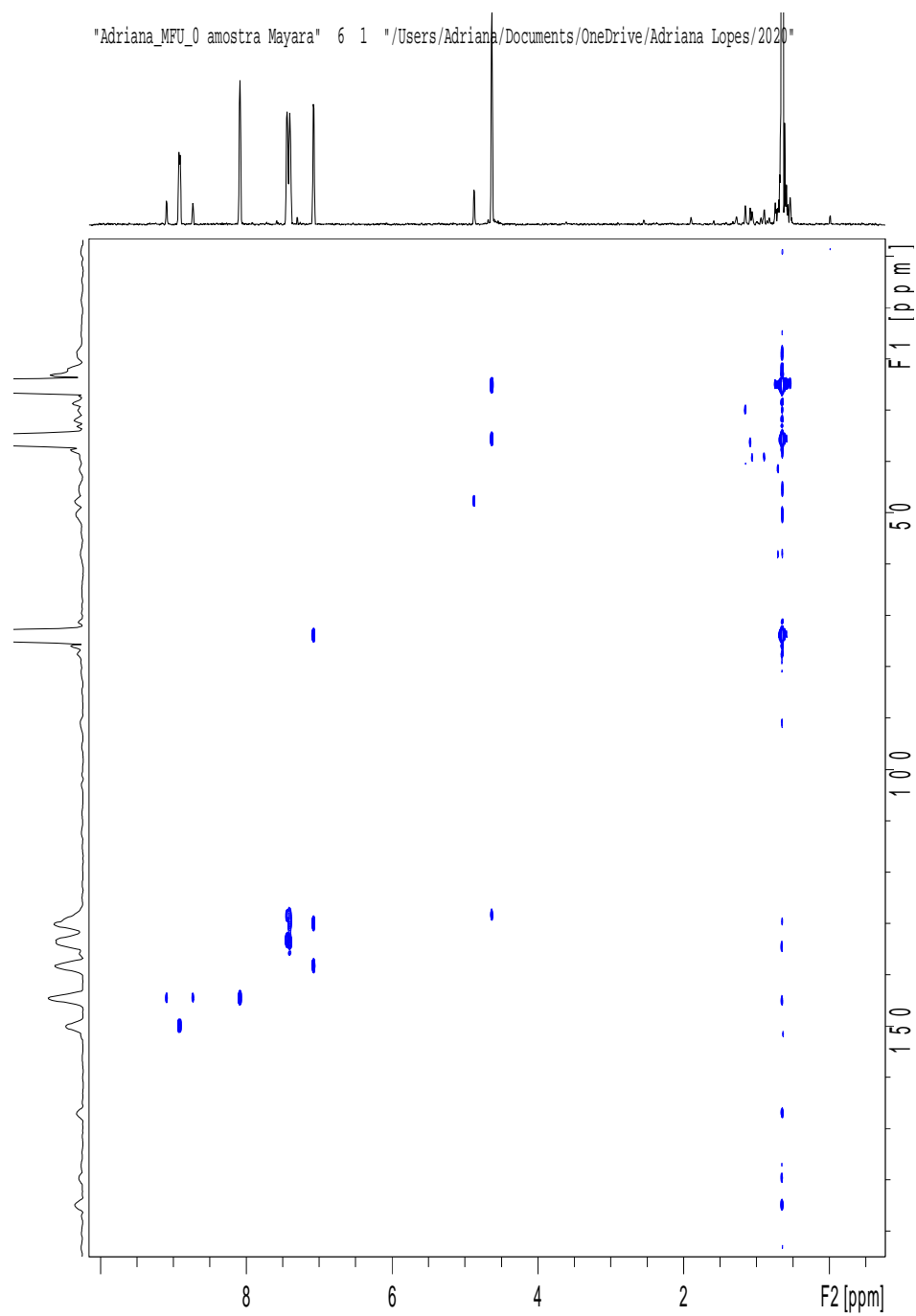


Figura 22 - Mapa de contorno de gHMBC do uniconazol (600 MHz, MeOD).



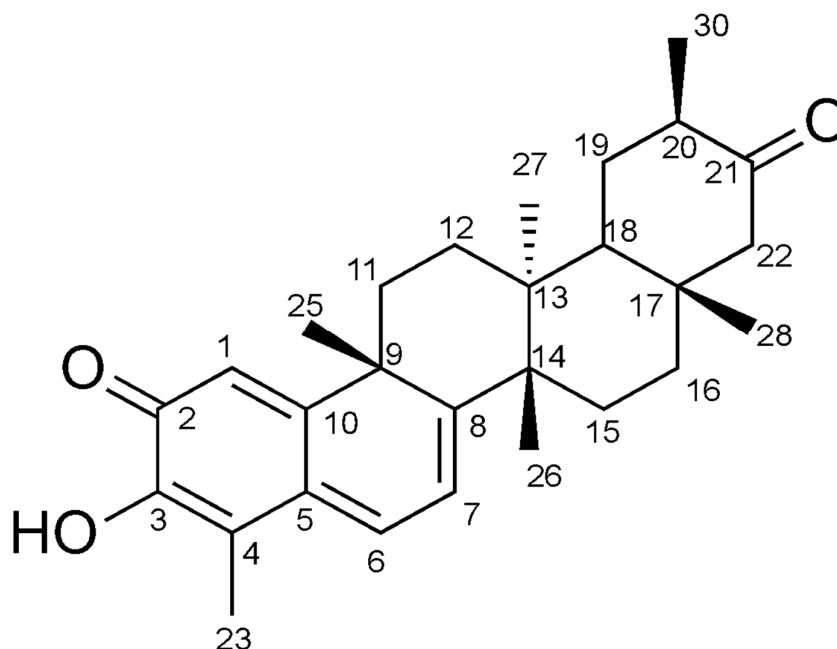
7.7 CONFIRMAÇÃO DA VIA DO MEVALONATO NA BIOSÍNTESE DA MAITENINA

7.7.1 Isolamento do Triterpeno Maitenina de *M. floribunda*

A identificação da substância maitenina (Figura 23) isolada de *M. floribunda* foi realizada por meio da análise dos espectros obtidos por RMN 1D, em comparação com os dados descritos na literatura (TAKAISHI et al., 1997).

Até o presente momento não há estudos fitoquímicos para a espécie *M. floribunda*, sendo este o primeiro relato sobre a ocorrência de maitenina nesta planta. Essa substância é da classe dos triterpeno quinonametídeos, os quais são denominados marcadores quimiotaxonômicos da família *Celastraceae*.

Figura 23 - Estrutura química da maitenina isolada de *Monteverdia floribunda*.



Fonte: Mayara Valdevite

7.7.2 Estudo da Rota Biossintética por Meio da Incorporação de 1-¹³C Acetato de Sódio e 2-¹³C Acetato de Sódio nas Raízes de *M. floribunda*

Para a determinação da via biossintética de formação da maitenina (Figura 23), foram realizados experimentos de incorporação com 1-¹³C acetato de sódio e 2-¹³C acetato de sódio.

Após 20 dias de cultivo das raízes enriquecidas com o 1-¹³C acetato de sódio, 2-¹³C acetato de sódio e sem o acetato de sódio (controle), os compostos de interesse foram purificados e apenas a maitenina (composto majoritário) apresentou massa suficiente para realização de análises por RMN de ¹³C. A análise do espectro de RMN de ¹³C de maitenina marcada com 1-¹³C acetato de sódio, maitenina marcada 2-¹³C acetato de sódio e controle indicaram os carbonos onde ocorreu a incorporação (Figura 24, 25 e 26) (Tabela 12).

De acordo com o espectro de RMN de ¹³C realizado na amostra enriquecida com 1-¹³C acetato de sódio (Figura 24), pode-se observar um aumento significativo na intensidade dos sinais C-2 (δ 178,4), C-4 (δ 117,2), C-6 (δ 133,7), C-8 (δ 168,8), C-10 (δ 164,7), C-11 (δ 33,7), C-12 (δ 30,0), C-14 (δ 44,7), C-16 (δ 35,5), C-17 (δ 38,2), C-20 (δ 41,9) e C-21 (δ 213,7), em um padrão correspondente a formação da maitenina enriquecida com 1-¹³C acetato de sódio. Na figura 24, podemos observar que além do aumento na intensidade visualizou-se uma multiplicidade dos sinais dos carbonos C-8, C-11, C-12, C-14, C-16, C-17, C-20 e C21. Estes sinais são chamados de satélites de acoplamento ¹³C-¹³C, e são um fenômeno que ocorre quando um ¹³C acopla mutuamente com um segundo ¹³C adjacente.

No espectro de RMN de ¹³C realizado na amostra enriquecida com 2-¹³C acetato de sódio (Figura 25), pode-se observar um aumento significativo na intensidade dos sinais C-1 (δ 118,8), C-3 (δ 146,1), C-5 (δ 127,7), C-7 (δ 118,1), C-9 (δ 42,7), C-13 (δ 40,6), C-15 (δ 28,4), C-18 (δ 43,5), C-19 (δ 32,1), C-22 (δ 52,6), C-23 (δ 10,3), C-25 (δ 39,0), C-26 (δ 21,6), C-27 (δ 19,7), C-28 (δ 32,5) e C-30 (δ 15,1), em um padrão correspondente a formação da maitenina enriquecida com 2-¹³C acetato de sódio. E também podemos observar a formação de satélites de acoplamento nos carbonos C-9, C-13, C-18, C-19, C-25 e C27 (Figura 25).

Quando a unidade isoprênica é formada utilizando como substrato o 1-¹³C acetato de sódio, o IPP terá a marcação nos carbonos 2 e 4 (Figura 27), e quando utilizado 2-¹³C acetato de sódio o IPP ficará marcado na posição 1, 3 e 5 (Figura 28). Sendo assim, pode-se afirmar que as unidades isoprênicas estão envolvidas na formação de maitenina que procedem da via do mevalonato, pois as unidades IPP apresentaram o padrão de marcação esperado.

Tabela 12 - Dados de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3 , 25°C) da Maitenina isolada das raízes *in vitro* de *Monteverdia floribunda*, após a incorporação de $1\text{-}^{13}\text{C}$ acetato de sódio e $2\text{-}^{13}\text{C}$ acetato de sódio(CDCl_3 , 25°C).

C	δ^a	δ^b	
		$1\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato	$2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato
C-1	119,8	119,8	119,8
C-2	178,4	178,4	178,4
C-3	146,1	146,1	146,1
C-4	117,1	117,2	117,2
C-5	127,8	127,7	127,7
C-6	133,5	133,7	133,7
C-7	118,1	118,1	118,1
C-8	168,6	168,8	168,8
C-9	42,7	42,7	42,7 (t)
C-10	164,7	164,7	164,7
C-11	33,8	33,7 (t)	33,7
C-12	30,0	30,0 (t)	30,0
C-13	40,6	40,6	40,6 (t)
C-14	44,7	44,7	44,7
C-15	28,4	28,4	28,4
C-16	35,5	35,5 (t)	35,5
C-17	38,2	38,2 (t)	38,2
C-18	43,6	43,5	43,5 (t)
C-19	32,1	32,1	32,1 (t)
C-20	41,9	41,9 (t)	41,9
C-21	213,7	213,7 (t)	213,7
C-22	52,5	52,6	52,6
C-23	10,3	10,3	10,3
C-25	39,1	39,0	39,0 (t)
C-26	21,6	21,6	21,6
C-27	19,7	19,7	19,7 (t)
C-28	32,6	32,5	32,5
C-30	15,1	15,1	15,1

^aGunatilaka et al., Magnetic Resonance in Chemistry, 27, 803-811, 1989.

^bdados experimentais

(t) triplete

Figura 26– Espectro de RMN de ^{13}C da maitenina isolada de raízes *in vitro* de *Monteverdia floribunda*.

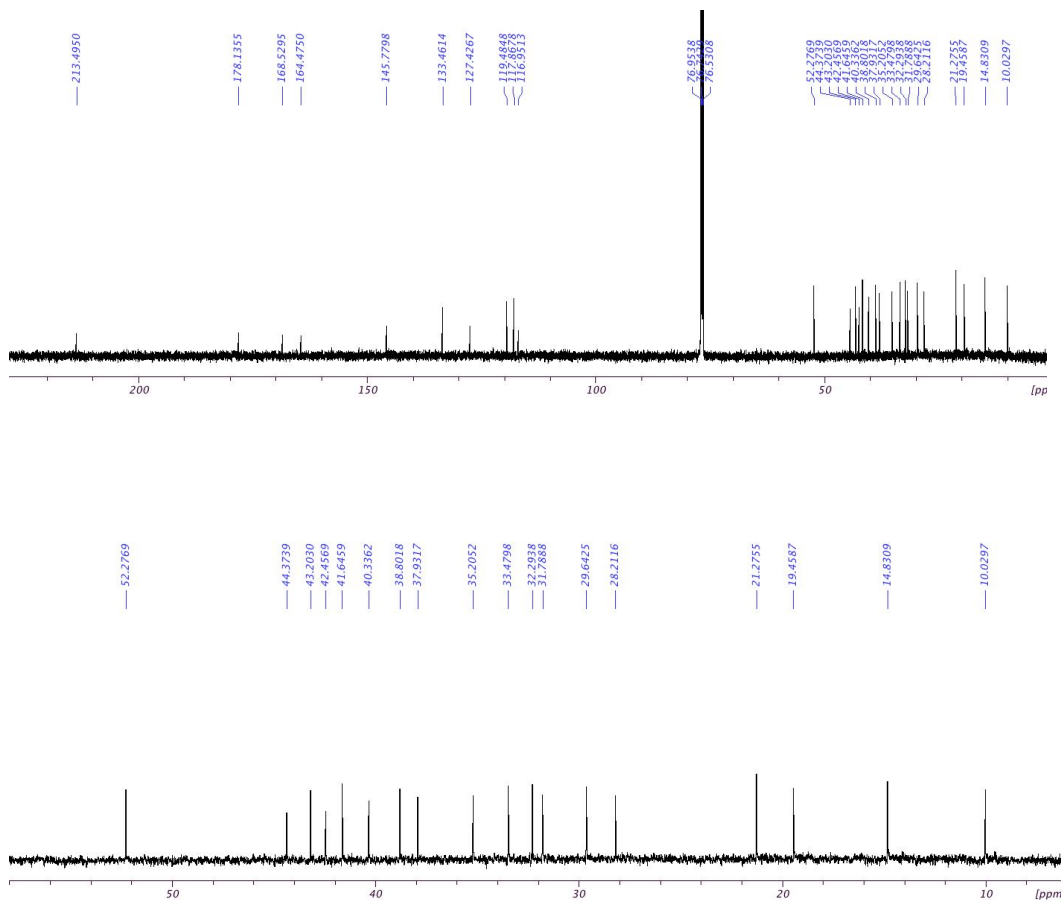


Figura 27– Via biossintética do triterpenóide maitenina procedente da via MVA após a metabolização de 1-¹³C acetato de sódio.

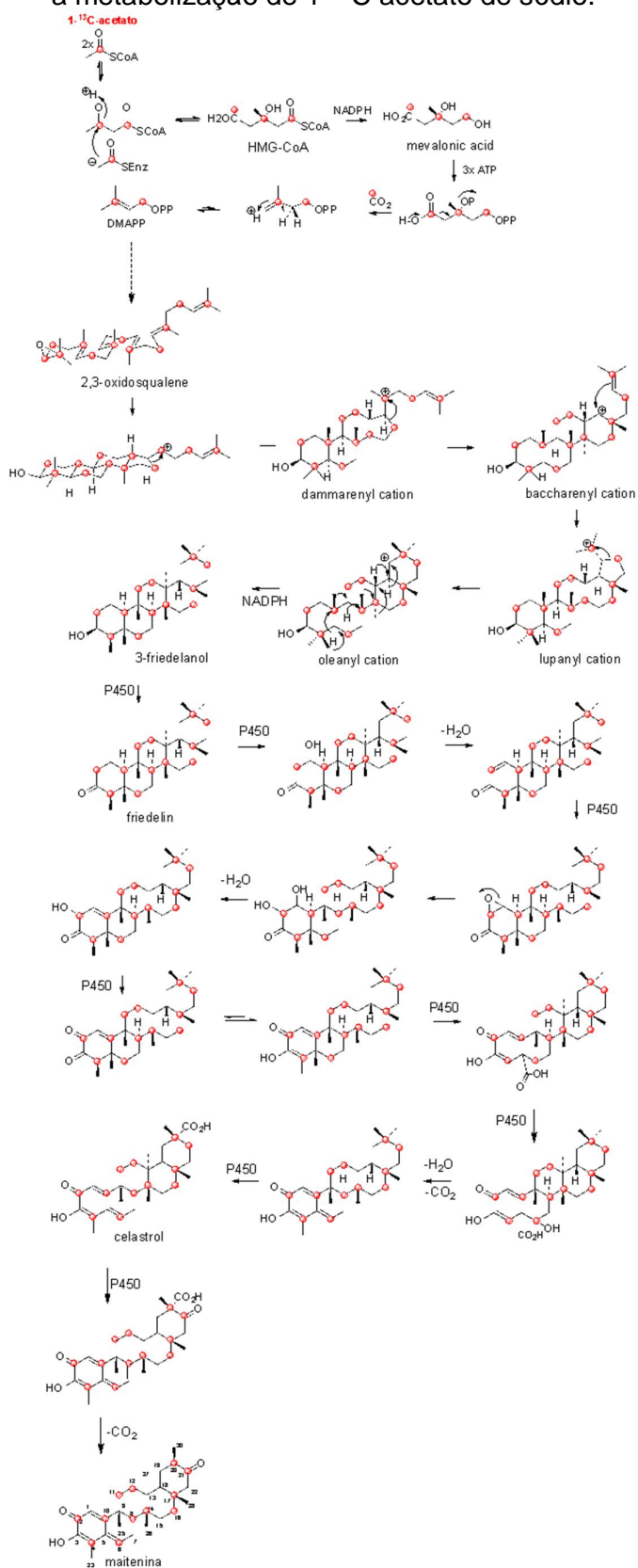
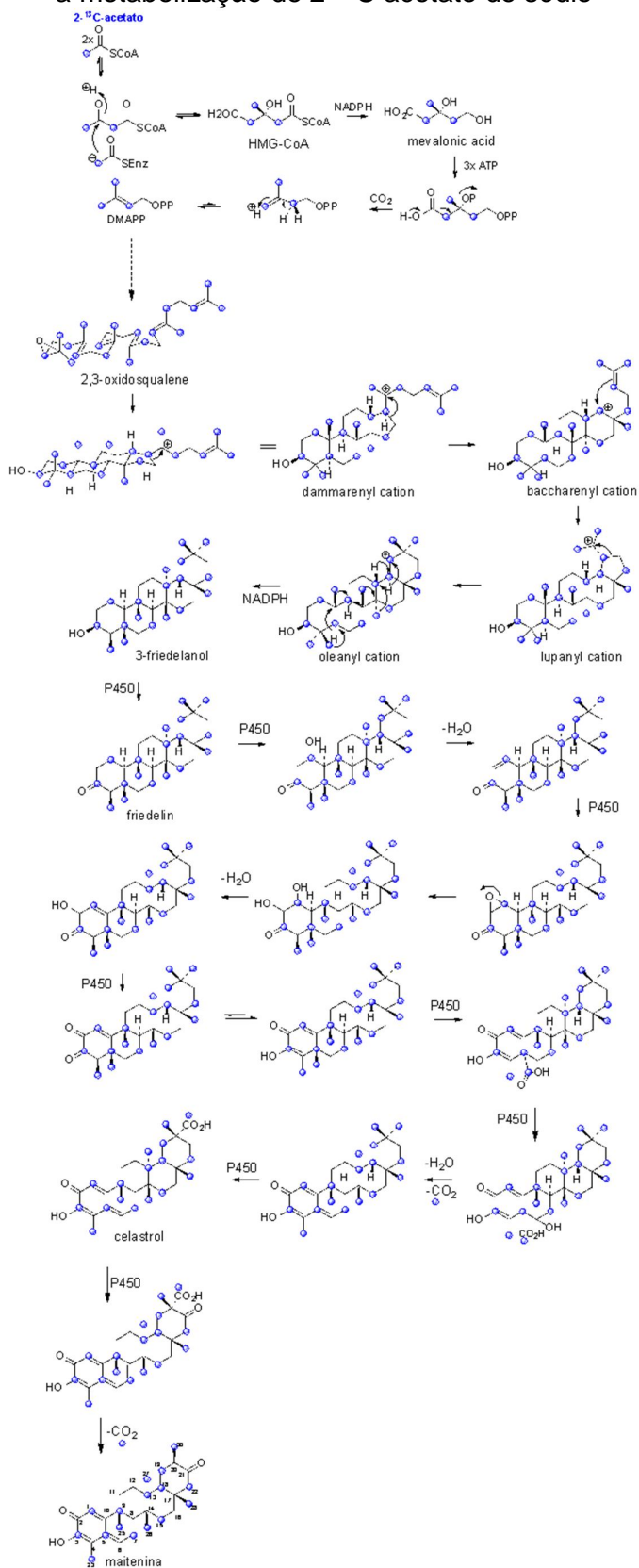


Figura 28 – Via biossintética do triterpenóide maitenina procedente da via MVA após a metabolização de 2-¹³C acetato de sódio



8 CONCLUSÃO

Raízes de *M. floribunda* foram produzidas *in vitro* com sucesso e biossintetizam maior teor de triterpenos quinonametídeos do que as raízes cultivadas *in situ*. Além das raízes produzirem esses compostos *in vitro*, elas também excretaram 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina e celastrol para o meio de cultura.

Raízes produzidas em biorreatores acumularam maior teor de triterpenos quinonametídeos que as cultivadas em erlenmeyers.

A espécie *Methylobacterium thiocyanatum* é um microrganismo simbiote de *M. floribunda* e apresentou efeito elicitador sobre a produção de 22 β -hidroxi-maitenina, maitenina e celastrol, em raízes cultivadas *in vitro*.

As substâncias terbinafina, ancymidol, giberelina, bem como a associação de giberelina + paclobutrazol aumentaram, nas Raízes de *M. floribunda*, o teor do TQs.

A rota biossintética de maitenina, em raízes de *M. floribunda*, foi confirmada como sendo a via do mevalonato

REFERÊNCIAS

- ADAM, K. et al. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 48, n. 6, p. 953-959, jul. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00992-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00992-8).
- AHMAD, I. et al. Uniconazole application strategies to improve lignin biosynthesis, lodging resistance and production of maize in semiarid regions. **Field Crops Research**, [s.l.], v. 222, p. 66-77, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2018.03.015>.
- ANDREOTE, F. D. et al. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 5, p. 419-426, 1 maio 2006. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/w05-142>.
- ALMEIDA, M. T.R. et al. Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 71, n. 14-15, p. 1741-1748, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.023>.
- ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from *Celastraceae*. In: RAHMAN, A-U (ED.) **Studies in natural products chemistry: bioactive natural products** (Part M). London: Elsevier, v.33. p. 239-307, 2006.
- ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 10, p. 4906-4914, out. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.10.4906-4914.2002>.
- ATLAS, Ronald M. **Handbook of microbiological media**. 4. ed. Boca Raton: Ed. Taylor & Francis Group, 2010.
- AWAD, V. et al. Microbial elicitation in root cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. for elevated glycyrrhizic acid production. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 54, p. 13-16, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.036>.
- BAETZ, U.; MARTINOIA, H. Root exudates: the hidden part of plant defense. : the hidden part of plant defense. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 90-98, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.006>.
- BAQUE, Md. A. et al. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 1255-1267, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.004>.
- BIRAL, L. et al. A new species of *Maytenus* (*Celastraceae*) from the Brazilian Atlantic Forest, with evidence of molecular phylogeny, and two new synonyms for *Maytenus*

floribunda. **Phytotaxa** 231, 053–062. 2015.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.231.1.5>

BIRAL, L. et al. Systematics of new world *Maytenus* (Celastraceae) and a new delimitation of the genus. **Systematic Botany** 42, 680-693. 2017.
<https://doi.org/10.1600/036364417X696456>

BORIDY, S. et al. Celastrol targets proteostasis and acts synergistically with a heat-shock protein 90 inhibitor to kill human glioblastoma cells. **Cell Death & Disease** 5, e1216, may. 2014. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.182>

BRASIL. (2009) **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/3487->>. Acesso em: 20 ago. 2014.

BRÜNING, R.; WAGNER, H. Übersicht über die celastraceen-inhaltsstoffe: chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. : Chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 17, n. 11, p. 1821-1858, jan. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)88719-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)88719-1).

BUFFA FILHO, W. et al. Indução de metabólito bioativo em cultura de células de *Cheiloclinium cognatum*. **Ecleticaquímica**, v. 27, p. 403-416, 2002b

BUFFA FILHO, W. et al. In vitro propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, [s.l.], v. 2004, n. 6, p. 137, 19 set. 2004. ARKAT USA, Inc.. <http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0005.617>.

CERVANTES-MARTINEZ, J et al. Detection of the effects of in Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, [s.l.], v. 166, n. 4, p. 889-892, abr. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.029>.

CHEN, M. et al. Celastrol Synergistically Enhances Temozolomide Cytotoxicity in Melanoma Cells. **Molecular Cancer Research**, [s.l.], v. 7, n. 12, p. 1946-1953, 24 nov. 2009. American Association for Cancer Research (AACR).
<http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-09-0243>.

COLLIN, H.A.. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 119-134, 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1013374417961>.

COOLBAUGH, R. C. et al. Studies on the Specificity and Site of Action of α -Cyclopropyl- α -[p-methoxyphenyl]-5-pyrimidine Methyl Alcohol (Ancymidol), a Plant Growth Regulator. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 62, n. 4, p. 571-576, 1 out. 1978. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.62.4.571>.

COPPEDE, J. S. Produção de triterpenosquinonametídeos em células de *Maytenus ilicifolia*: fonte potencial de medicamento anticâncer. 104f. **Tese** – UNAERP, Ribeirão Preto, 2013

- COPPEDE, J. S. et al. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, [s.l.], v. 118, n. 1, p. 33-43, 23 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0459-7>.
- CORSINO, J., et al. Quantitative determination of maitenin and 22 β -hidroxymaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 245-247, 1998.
- CORSINO, J. et al. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 55, n. 7, p. 741-748, dez. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00285-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00285-5).
- COSTA, P. M. et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 854-863, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2008.01.003>.
- CRAGG, G.M.; PEZZUTO, J. M.. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical Principles And Practice**, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 41-59, 17 dez. 2015. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000443404>.
- CUNICO, M. M. et al. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 69-73, dez. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2002000200003>.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 4, n. 6, p. 687-699, 18 nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3^o edição, John Wiley & Sons, ISBN: 978-0-470-74168-9, 2009.
- DIAS, D. et al A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 303-336, 16 abr. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo2020303>.
- DORONINA, N. V et al. *Methylobacterium suomiense* sp. nov. and *Methylobacterium lusitanum* sp. nov., aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacteria. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 3, p. 773-776, 1 maio 2002. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-3-773>.
- ELRAYESS, R. A. et al. Anticancer Natural Products: a review. : A Review. **Cancer Studies And Molecular Medicine – Open Journal**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 11-22, 29 out. 2019. Openventio Publishers. <http://dx.doi.org/10.17140/csmmo-5-127>.

FERREIRA DF. 2005. **SISVAR 5.1** - Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Download gratuito. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2015.

FLORES-SÁNCHEZ, I. J. et al. Biosynthesis of Sterols and Triterpenes in Cell Suspension Cultures of *Uncaria tomentosa*. **Plant And Cell Physiology**, [s.l.], v. 43, n. 12, p. 1502-1509, 15 dez. 2002. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcf181>.

FOX, B. W.. 2. Natural products in cancer treatment from bench to the clinic. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 85, n. 1, p. 22-25, jan. 1991. Oxford University Press (OUP).
[http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90140-t](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(91)90140-t).

FULTON, D. C. et al. Enzymological aspects of the redirection of terpenoid biosynthesis in elicitor-treated cultures of *Tabernaemontana divaricata*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 1183-1186, mar. 1994. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)94818-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)94818-0).

GANG, R. C. et al. Time and dosage effects of an endophytic fungal elicitor on the volatile oil production and physiology of *Atractylodes lancea* suspension cells. **Journal Of Medicinal Plants Research**, [s.l.], v. 6, n. 40, p. 5369-5376, 17 out. 2012. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/jmpr12.559>.

GOMES, J. P. M. Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica “*in vitro*” de produtos naturais. 86 f. **Dissertação** – UNESP, Araraquara, 2008.

GUNATILAKA, A. A. L. Triterpenoid Quinonemethides and Related Compounds (Celastroloids). **Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress In The Chemistry Of Organic Natural Products**, [s.l.], p. 1-123, 1996. Springer Vienna. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-9406-5_1.

HENRY, M. et al. Effect of gypsogenin 3,O-glucuronide pretreatment of *Gypsophila paniculata* and *Saponaria officinalis* cell suspension cultures on the activities of microsomal 2,3-oxidosqualene cycloartenol and amyirin cyclases. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 31, n. 11, p. 3855-3859, jan. 1992. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)97541-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)97541-1).

HERNANDES, C. et al. Compounds From *Celastraceae* Targeting Cancer Pathways and Their Potential Application in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a review. : A Review. **Current Genomics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 60-74, 14 dez. 2016. Bentham Science Publishers Ltd..
<http://dx.doi.org/10.2174/1389202917666160803160934>

HERNANDES, C. et al. Anticancer Activities of the Quinone-Methide Triterpenes Maytenin and 22- β -hydroxymaytenin Obtained from Cultivated *Maytenus ilicifolia* Roots Associated with Down-Regulation of miRNA-27a and miR-20a/miR-17-5p. **Molecules**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 760, 10 fev. 2020. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules25030760>.

HIRAI, N. et al. Biosynthesis of Abscisic Acid by the Non-mevalonate Pathway in Plants, and by the Mevalonate Pathway in Fungi. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 64, n. 7, p. 1448-1458, jan. 2000. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.64.1448>.

HOFMANNOVA, J. et al. A novel, cellulose synthesis inhibitory action of ancymidol impairs plant cell expansion. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], v. 59, n. 14, p. 3963-3974, 9 out. 2008. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern250>.

HOUSMAN, G. et al. Drug Resistance in Cancer: an overview. : An Overview. **Cancers**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 1769-1792, 5 set. 2014. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/cancers6031769>.

ILAN, A.; DOUGALL, D. K. The effect of growth retardants on anthocyanin production in carrot cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**. v. 11, p. 304-309. 1992.
<https://doi.org/10.1007/BF00235087>

ILAN, A.; DOUGALL, D. K.. Effects of gibberellic acid and uniconazole on the activities of some enzymes of anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures. **Journal Of Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 213-219, set. 1994. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00226039>.

INÁCIO, M.C. et al. Endophytic *Bacillus megaterium* and exogenous stimuli affect the quinonemethide triterpenes production in adventitious roots of *Peritassa campestris* (Celastraceae). **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, [s.l.], v. 131, n. 1, p. 15-26, 19 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-017-1257-9>.

INÁCIO, M.C. et al. Maytenin Plays a Special Role in the Regulation of the Endophytic *Bacillus megaterium* in *Peritassa campestris* Adventitious Roots. **Journal Of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 45, n. 9, p. 789-797, 17 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-019-01096-y>.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 7 jul. 2018.

JALEEL, C. Abdul et al. Paclobutrazol enhances photosynthesis and aïmalicine production in *Catharanthus roseus*. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 11, p. 1566-1570, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.006>.

JIANG, D.F. et al. Formation of blood resin in abiotic *Dracaena cochinchinensis* inoculated with *Fusarium* 9568D. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**. v. 14, n. 3, p. 477-478, 2003.

JIANG, X. et al. Environmental behavior of paclobutrazol in soil and its toxicity on potato and taro plants. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.l.], v. 26, n. 26, p. 27385-27395, 19 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-019-05947-9>.

JONES, A. M. P. et al. Elicitation of secondary metabolism in *Echinacea purpurea* L. by gibberellic acid and triazoles. **Engineering In Life Sciences**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 205-210, jun. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.200800104>.

JOURAND, P. et al. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 6, p. 2269-2273, 1 nov. 2004. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02902-0>.

KAPOOR, N. et al. Endophytes as a Source of High-Value, Bioactive Metabolites. **Reference Series In Phytochemistry**, [s.l.], p. 427-458, 2019. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-90484-9_9.

KIRBY, J. et al. Biosynthesis of Plant Isoprenoids: perspectives for microbial engineering. : Perspectives for Microbial Engineering. **Annual Review Of Plant Biology**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 335-355, jun. 2009. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091955>.

KUTNEY, J. P. et al. Cytotoxic diterpenes triptolide, triptodiolide, and cytotoxic triterpenes from tissue cultures of *Tripterygium wilfordii*. **Canadian Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 17, p. 2677-2683, 1 set. 1981. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/v81-385>.

KUÚNIAR, A. et al. Agricultural and Other Biotechnological Applications Resulting from Trophic Plant-Endophyte Interactions. **Agronomy**, [s.l.], v. 9, n. 12, p. 779, 20 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy9120779>.

LACAVA, P.t. et al. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 55-59, jul. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01543.x>.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C.. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 133-138, mar. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-001-0025-y>.

LI, Y; TAO, W.. Paclitaxel-producing fungal endophyte stimulates the accumulation of taxoids in suspension cultures of *Taxus cuspidate*. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 121, n. 1, p. 97-102, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.016>.

LIÃO, L.M. Triterpenosquinonametídeos de *Salaciacampestris* (Hippocrateaceae). São Carlos: **Dissertação** - Universidade Federal de São Carlos - 1994.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002.

LU, Z. et al. Celastrol, a novel HSP90 inhibitor, depletes Bcr–Abl and induces apoptosis in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T315I mutation. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 290, n. 2, p. 182-191, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.09.006>.

MADHAIYAN, M. et al. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Environmental And Experimental Botany**, [s.l.], v. 57, n. 1-2, p. 168-176, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.05.010>.

MADHAIYAN, M. et al. Plant Growth–Promoting Methylobacterium Induces Defense Responses in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Compared with Rot Pathogens. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 4, p. 270-276, 28 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-005-0452-9>.

MAGGINI, V. et al. Plant-endophytes interaction influences the secondary metabolism in *Echinacea purpurea* (L.) Moench: an *in vitro* model. **Scientific RePorts**. v.7, 16924 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17110-w>

MAGGINI, V. et al. Tissue specificity and differential effects on *in vitro* plant growth of single bacterial endophytes isolated from the roots, leaves and rhizospheric soil of *Echinacea purpurea*. **BMC Plant Biology**. v.19, 284 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1890-z>

MANO, H. et al. Endophytic Bacteria in the Rice Plant. **Microbes And Environments**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 109-117, 2008. Japanese Society of Microbial Ecology. <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.23.109>.

MANSOORI, B. et al. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: a brief review. : A Brief Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 339-348, 25 set. 2017. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2017.041>.

MANSOURI, H. et al. The response of terpenoids to exogenous gibberellic acid in *Cannabis sativa* L. at vegetative stage. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 1085-1091, 17 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-010-0636-1>.

MEENA, K.K. et al. Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 101, n. 4, p. 777-786, 27 dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-011-9692-9>.

MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K.. Natural products: an evolving role in future drug discovery. : An evolving role in future drug discovery. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 10, p. 4769-4807, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>.

MURTHY, H.N. et al. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. : strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, [s.l.], v. 118, n. 1, p. 1-16, 16 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>.

NCI – NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Whats Is Cancer?**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 7 jul. 2018.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 79, n. 3, p. 629-661, 7 fev. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 770-803, 12 mar. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

NGASSAPA, O. et al. Quinone-Methide Triterpenes and Salaspermic Acid from *Kokoona ochracea*. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 1-8, jan. 1994. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np50103a001>.

OMER, Z.S. et al. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 47, n. 3, p. 319-326, mar. 2004. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-6496\(04\)00003-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-6496(04)00003-0).

ORAMAS-ROYO, S.M. et al. Cytotoxic Triterpenoids from *Maytenus retusa*. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 73, n. 12, p. 2029-2034, 27 dez. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np100517u>.

PAZ, T.A. Aplicação da biotecnologia na obtenção de triterpenosquinonametídeos utilizando *Salacia campestris* (Cambess.) Walp. (*Celastraceae*) como modelo. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade estadual Paulista, Araraquara, 109f, 2011.

PAZ, T. A. et al. Production of the Quinone-Methide Triterpene Maytenin by In Vitro Adventitious Roots of *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C.Sm. (*Celastraceae*) and Rapid Detection and Identification by APCI-IT-MS/MS. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p. 1-7, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/485837>.

PAZ, T. A. **Contribuição dos estudos proteômicos de células de *Maytenus ilicifolia* Mart. (*Celastraceae*) para o entendimento da regulação do metabolismo secundário com foco nos triterpenos quinonametídeos.** 2016. 295 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

PERASSOLO, M. et al. Role of reactive oxygen species and proline cycle in anthraquinone accumulation in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures subjected to methyl jasmonate elicitation. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 7, p. 758-763, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.03.015>.

PINA, E. S. et al. Mevalonate-derived quinonemethide triterpenoid from *in vitro* roots of *Peritassa laevigata* and their localization in root tissue by MALDI imaging. **Scientific Reports**. 6:22627. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep22627>

PINA, E. S. et al. Improved production of quinone-methide triterpenoids by *Cheilochlinium cognatum* root cultures: possibilities for a non-destructive biotechnological process. : possibilities for a non-destructive biotechnological process. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, [s.l.], v. 128, n. 3, p. 705-714, 15 dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-016-1151-x>.

QIN, S. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 89, n. 3, p. 457-473, 13 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2923-6>.

RADEMACHER, W. et al. GROWTHRETARDANTS: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. : Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 501-531, jun. 2000. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.501>.

RAMIREZ-ESTRADA, K. et al. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 182, 3 fev. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21020182>.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500017>.

ROHMER, M. et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. : a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 295, n. 2, p. 517-524, 15 out. 1993. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2950517>.

ROHMER, M. et al. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 118, n. 11, p.

2564-2566, jan. 1996. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/ja9538344>.

SALAZAR, G. C. M. Análise da Constituição Química da Casca da Madeira e Folhas de *Maytenus Floribunda*, **Dissertação** de mestrado Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, pp. 93, 1993. Disponível em:
<http://zeus.qui.ufmg.br/~neplam/resumo7> Acesso em 20.05.2020.

SANTANA, C. F. et al. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, n. 2, p. 37-49, 1971.

SAVITHA, B. C. Et al. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 50-60, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.071>

SEO, W.Y. et al. Celastrol suppresses IFN-gamma-induced ICAM-1 expression and subsequent monocyte adhesiveness via the induction of heme oxygenase-1 in the HaCaT cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 398, n. 1, p. 140-145, jul. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.053>.

SEO, H. R. et al. Radio sensitization by celastrol is mediated by modification of antioxidant thiol molecules. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 193, n. 1, p. 34-42, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2011.04.009>.

SETZER, W. N. et al. Isolation and Frontier Molecular Orbital Investigation of Bioactive Quinone-Methide Triterpenoids from the Bark of *Salacia petenensis*. **Planta Medica**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 65-69, fev. 2001. Georg Thieme Verlag KG.
<http://dx.doi.org/10.1055/s-2001-10879>.

SHARMA, D.; AWASTHI M.D. Uptake of soil applied paclobutrazol in mango (*Mangifera indica* L.) and its persistence in fruit and soil. **Chemosphere**, [s.l.], v. 60, n. 2, p. 164-169, jul. 2005. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.069>.

SHIVE, J.B.; SISLER, H.D.. Effects of Ancymidol (a Growth Retardant) and Triarimol (a Fungicide) on the Growth, Sterols, and Gibberellins of *Phaseolus vulgaris* (L.). **Plant Physiology**, [s.l.], v. 57, n. 4, p. 640-644, 1 abr. 1976. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.57.4.640>.

SIMMONS, M. P. *Celastraceae*. In: Kubitzki, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, v. 6, p. 29-64, 2004.

SINGH, H. et al. In vitro conservation of pointed gourd (*Trichosanthes dioica*) germplasm through slow-growth shoot cultures: effect of flurprimidol and triiodobenzoic acid. : Effect of flurprimidol and triiodobenzoic acid. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 182, p. 41-46, jan. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.009>.

SINGH, M. et al. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. **3 Biotech.** v. 7, 315 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0942-z>

SMITH, A. C. et al. [Introductory Information]. **Brittonia**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 341, nov. 1940. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2307/2804624>.

SPIVEY, A. C. et al. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. : biological activity and synthesis. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 43-59, 13 dez. 2001. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b000678p>.

STEWART, Bernard W.; WILD, Christopher P., editors. **World CancerReport 2014**. Lyon: Agency for ResearchonCancer, 2014.

SU, P. et al. Characterization of eight terpenoids from tissue cultures of the Chinese herbal plant, *Tripterygium wilfordii*, by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, [s.l.], v. 28, n. 9, p. 1183-1192, 21 fev. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.3140>.

SUGIURA, M. et al. Discrimination of enantiomers by means of NMR spectroscopy using chiral liquid crystalline solution: application to triazole fungicides, uniconazole and diniconazole. : application to triazole fungicides, uniconazole and diniconazole. **Magnetic Resonance In Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 2, p. 121-126, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mrc.1731>.

SUNG, B. et al. Celastrol, a Triterpene, Enhances TRAIL-induced Apoptosis through the Down-regulation of Cell Survival Proteins and Up-regulation of Death Receptors. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 285, n. 15, p. 11498-11507, 12 fev. 2010. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m109.090209>.

SUTTLE, J. C. et al. Chemical inhibition of potato ABA-8'-hydroxylase activity alters in vitro and in vivo ABA metabolism and endogenous ABA levels but does not affect potato microtuber dormancy duration. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], v. 63, n. 15, p. 5717-5725, set. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers146>.

SY, A. et al. Methylo-trophic Methylobacterium Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 183, n. 1, p. 214-220, 1 jan. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.183.1.214-220.2001>.

SY, A. et al. Methylo-trophic Metabolism Is Advantageous for Methylobacterium extorquens during Colonization of Medicago truncatula under Competitive Conditions. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 11, p. 7245-7252, nov. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.11.7245-7252.2005>.

TAKAHASHI, K. et al. Development and Application of a High-Resolution Imaging Mass Spectrometer for the Study of Plant Tissues. **Plant And Cell Physiology**, [s.l.], v. 56, n. 7, p. 1329-1338, 10 jun. 2015. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcv083>.

TANG, K. et al. Design, synthesis and biological evaluation of C(6)-indole celastrol derivatives as potential antitumor agents. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 5, n. 25, p. 19620-19623, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC).
<http://dx.doi.org/10.1039/c4ra15414b>.

TANI, A. et al. *Methylobacterium oxalidis* sp. nov., isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 7, p. 1647-1652, 9 set. 2011. Microbiology Society.
<http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.033019-0>.

TOYAMA, H. et al. Construction of insertion and deletion *mx*a mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 166, n. 1, p. 1-7, set. 1998. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13175.x>.

VAN DIEN, S.J. et al. Reconstruction of C3 and C4 metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. **Microbiology**, [s.l.], v. 149, n. 3, p. 601-609, 1 mar. 2003. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.25955-0>.

VEERESHAM, C. et al. Production of Taxol and its Analogues from Cell Cultures of *Taxus wallichiana*. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 41, n. 6, p. 426-430, jan. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1076/phbi.41.6.426.17822>.

VELLOSA, J.C.R. et al. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 77, n. 3, p. 243-244, abr. 2006. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2006.02.007>.

VERGINER, M. et al. Monitoring the plant epiphyte *Methylobacterium extorquens* DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 136-145, 7 set. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00942.x>.

WANG, J.W. et al. The preparation of an elicitor from a fungal endophyte to enhance artemisinin production in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 829-834, 2006.

WEI, S. Methyl jasmonic acid induced expression pattern of terpenoid indole alkaloid pathway genes in *Catharanthus roseus* seedlings. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 61, n. 3, p. 243-251, 30 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10725-010-9468-7>.

WHEELER, D. L. et al. From pathogen to endophyte: an endophytic population of *verticillium dahliae* evolved from a sympatric pathogenic population. : an endophytic population of *Verticillium dahliae* evolved from a sympatric pathogenic

population. **New Phytologist**, [s.l.], v. 222, n. 1, p. 497-510, 5 jan. 2019. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/nph.15567>.

WRIGHT, G. D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. **Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 55-57, 19 dez. 2018. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13351>.

WOOD, A. P. et al. A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. **Archives Of Microbiology**, [s.l.], v. 169, n. 2, p. 148-158, 5 fev. 1998. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s002030050554>.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Whatsiscancer?**. Disponível em: <
<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 7 jul. 2018.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer: The problem**. Disponível em:
<<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Acesso em: 7 jul. 2018.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer: Diagnosis and Treatment**.
Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/treatment/en/>> Acesso em: 7 jul. 2018.

WU, C. et al. Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s.l.], v. 4, n. 8, p. 1277-1285, 1 ago. 2005. American Association for Cancer Research (AACR).
<http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-05-0027>.

YANG, H. et al. Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 103, n. 1, p. 234-244, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21399>.

YELANI, T. et al. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 24, n. 15, p. 1418-1425, 15 mar. 2010. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/14786410903052399>.

YUE, W. et al. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. : pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 215-232, 25 jun. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2014.923986>.

ZHANG, L. et al. Residue of Paclobutrazol and Its Regulatory Effects on the Secondary Metabolites of *Ophiopogon japonicus*. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 19, p. 3504, 27 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24193504>.

ZHANG, N.A. et al. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal Of Pineal Research**, [s.l.], v. 54, n. 1, p. 15-23, 3 jul. 2012. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079x.2012.01015.x>.

ZHAO, J. et al. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 283-333, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>.

Anexo I



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

Relatório Técnico

Identificação de Microrganismo

(OS 170029)

Apresentado a: RBio

Apresentado por: Coleção de Culturas Tropical
Fundação André Tosello

junho 2017



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

Campinas, 19 de junho de 2017

Ronaldo Biondo
Diretor Presidente / PhD em Biotecnologia
RBIO Empreendimentos Biotecnológicos e Participações Ltda.
R. São Salvador, n° 1665, apto. 302. Nardini
13.468-280
Americana – SP
E-mail: ronaldo@rbiotecnologia.com

Ref.: Relatório OS ID 170029/ Identificação de microrganismos

Prezado,
estamos enviando o relatório do serviço em referência.
Colocamo-nos à disposição para esclarecimentos.
Atenciosamente,

Milena Duarte Lançon
Milena Duarte Lançon
Coleção de Culturas – CCT
Fundação André Tosello - FAT
E-mail: milena@fat.org.br



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

Relatório Técnico Final

Serviço: Identificação de microrganismos por análise molecular

Relatório: 170029

Interessado: Ronaldo Biondo

Data de recebimento: 26/05/2017

Serviço No.	Descrição da Amostra
OS 170029	1- <i>Maytenus floribunda</i> (Mayara)
OS 170029	2- <i>Maytenus ilicifolia</i> (Juliana)

1. OBJETIVOS

Classificar taxonomicamente os micro-organismos das amostras através do acesso ao gene *barcode*.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo e extração de DNA

Os micro-organismos das amostras foram cultivados em placa de SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) para aferição de pureza e coloração de Gram, além de SDB (*Saboraud Dextrose Broth*) para amostras bacterianas, utilizado na extração de DNA, que foi obtido através de kit comercial High Pure PCR Template Kit (Roche), segundo informações do fabricante.

Após extração de DNA para ambos os casos, o material foi estocado a -20°C até o uso.

2.2 Manipulação do DNA

A amplificação do DNA alvo, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), se deu por meio dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (5' – AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3') e 1492R (5' – TACGGYTACCTTGTTACGACTT – 3') (WEISBURG *et al.*, 1991).

Após corrida eletroforética em gel de TBE-agarose 1,0% (p/v), o produto foi purificado através do EasyPure PCR Purification Kit (TransGen Biotech), segundo as informações do fabricante.

Os produtos purificados foram quantificados, alíquotados e acrescidos dos respectivos oligonucleotídeos para seqüenciamento, este último realizado na plataforma ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies).



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

2.3 Análises das sequências

A sequência consenso foi gerada (BioEdit) a partir das sequências obtidas pelos *primers* supracitados. A classificação taxonômica das amostras se baseou na comparação entre a sequência consenso e as depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) via MEGABLAST. A sequência única foi alinhada com as similares disponíveis no banco de dados e foi construída uma árvore de distância filogenética com auxílio do programa MEGA7.

3. RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas as características dos isolados.

Tabela 1. Características de colônia das amostras.

Cód. Sequência	Morfologia da colônia	Característica Celular
RBio / MF	Colônia rosa, opaca, cremosa, convexa, superfície lisa, margem inteira.	Bastonete gram positivo
RBio / MI	Colônia rosa escuro, brilhante, cremosa, convexa, superfície lisa, margem inteira.	Bastonete gram positivo

As fichas a seguir apresentam os dados referentes a cada isolado, indicando a classificação taxonômica, o autor, a sequência obtida e uma árvore de distância filogenética, construída a partir do alinhamento encontrado no site do NCBI, através da ferramenta BLAST.



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

Amostra RBio / MF (>99%)	
Classificação Taxonômica	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> (Wood et al. 1999) Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylobacteriaceae; Methylobacterium.
Sequência FASTA	>RBio / MF GAACGTGCCCTTCGGTTCGGAATAACTCAGGGAACTTGAGCTAATACCGGATACGCCCTTATGGG GAAAGGTTGACTGCCGAAGGATCGGCCGCGTCTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAACGGCCTACC AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAGGCCCA GACTCTACGGGAGGACGAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCC GCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTGTCGGGACGATAATGACGGTACCGG AAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTC GGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGCGGATTAAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTC AACCACAGAATTGCCTTCGATACTGGTGGCTTGAGACCGGAAGAGGACAGCGGAATCGCAGTG TAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCCGGTTC TGACGTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATGCCAGCGTTGGCTGCTTTGCAGTGCAGTGGCGCCGTAACGCATTAAGCATTCC GCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAACAGCGGTG GAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTACCATCCCTTGACATGGCATGTTACCTC GAGAGATCGGGATCCTCTTCGGAGGCGTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGACGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCATCATTAGTTG GGCACTTAGGGAGACTGCCGGTATAAGCCGCGAGGAAGGTGGATGACGTCAAGTCCCTAC GGCCCTACGGGATGGGCTACACAGTGTACAATGGCGGTGACAGTGGGACGCGAAACCCGCA GGTTGAGCAAATCCCAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTGCAACTCGGTGCATGAAGGC GGAATCGTAGTAATCGTGATCAGCACGCCAGCGTGAATACGTTCCGGGCCCTGTACACCCGC CCGTCACCCATGGGAGTTGGTTT
Árvore de distância filogenética	

Figura 1. Árvore de distância filogenética a partir do gene 16S rRNA. Construída com o auxílio do software MEGA 7.0 pelo método de Neighbor-Joining com parâmetro Tamura 3, Gamma Distribution e Bootstrap de 1000 réplicas.



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

Amostra RBio / MI (>99%)	
Classificação	<i>Methylobacterium dankookense</i> (Lee et al. 2009)
Taxonômica	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylobacteriaceae; Methylobacterium.
Sequência FASTA	<p>>RBio / MI</p> <p>CTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTACCCCTTGGTTCGGGACAACCTCTGGGAAAC TGGAGCTAATACCGGATACGCCCTTTTGGGAAAGTTTACTGCCGAAGGATCGGCCCGCGCTCTG ATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGTGGTCTGAGAGGATGAT CAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGA CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAGCTC TTTTATCCGGGACGATAATGACGGTACCGGAGGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCTAAAGGGCGCTAGGCGGGC TTTTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATGGCCTTCGATACTGGGACGCTTGA GTCTGGTAGAGTTGGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGAAGAACC GGTGGCGAAGGGCGCAACTGGACGACTGACGCTGAGGCGCAAGGCGGTGGGGAGCAAAA CAGGATTAGATACCCGGTAGTCCAGCTGTAACGATGAATGCTAGTGTGGGGTGCATGCATC TCAATAGCGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAA GGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAAC CTTACCATCCTTTGACATGGCGTGTACTGGGAGAGATCCAGGTCTCTTCGGAGGGCGGCACAC AGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGTGAGTGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCAGTCTCAGTTGCCATCATTAGTTGGCACTCTGGGAGACTGCCGGTGATAAGCCCGGA GGAAGGTGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGATGGGCTACACACGCTGCTACAATG GCGGTGACAGTGGGACGCGAGACCGGAGTTGAGCAAATCCCAAAAGCGCTCAGTTCGGAT TGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTGGAAATCGTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT GAATACGTTCCGGGCCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTCTTACCGACGGGC C</p>
Árvore de distância filogenética	

Figura 2. Árvore de distância filogenética a partir do gene 16S rRNA. Construída com o auxílio do software MEGA 7.0 pelo método de Neighbor-Joining com parâmetro Tamura 3, Gamma Distribution e Bootstrap de 1000 réplicas.



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

4. HISTÓRICO

Methylobacterium thiocyanatum: Comumente encontrado em solo, superfície foliar ou outras partes de vegetais. Pode usar o tiocianato como sua única fonte de nitrogênio enquanto cresce heterotróficamente em açúcares ou ácidos orgânicos, formiato como fonte de carbono e energia ou pode crescer metilotróficamente em metanol (WOOD et al., 1998).

Methylobacterium dankookense: Contém as características esperadas para o gênero em relação às necessidades e capacidades de seu metabolismo. A cepa tipo foi isolada de água filtrada na Coreia (LFE et al., 2009).

5. REFERÊNCIAS

KUMAR, S., STECHER G., TAMURA, K. *Mega7: Molecular Evolutionary Genetcs Analysis version 7.0 for bigger datasets*. Molecular Biology and Evolution (submitted). 2015.

Lee, SW., Oh, HW., Lee, KH. et al. J Microbiol. (2009) 47: 716.

NCBI. *National Center of Biotechnology Information*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., LANE, D.J. *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. Journal of Bacteriology. 173 (2). p.697–703. 1991.

WOOD, A. P., KELLY, D. P., MCDONALD, I. R., JORDAN, S. L., MORGAN, T. D., KHAN, S., MURRELL, J. C., BORODINA, E. *A novel pink-pigmented facultative methylotroph, Methylobacterium thiocyanatum sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources*. Arch Microbiol. v.169. p.148–158. 1998.

Observações:

Os resultados têm significação restrita e se aplicam somente à amostra recebida para análise. As culturas serão mantidas em nosso laboratório pelo período de um mês a partir desta data. Após este período elas serão descartadas.

Data: 19/06/17	Emitido por: Me. Milena Duarte Lançoni Coleção de Culturas Tropical - CCT Fundação André Tosello – FAT
--------------------------	--

Anexo II

Figura All 1: Curva de calibração do padrão 22 β -hidroxi-maitenina para quantificação do analito em extrato diclorometano de raízes adventícias de *Monteverdia floribunda*.

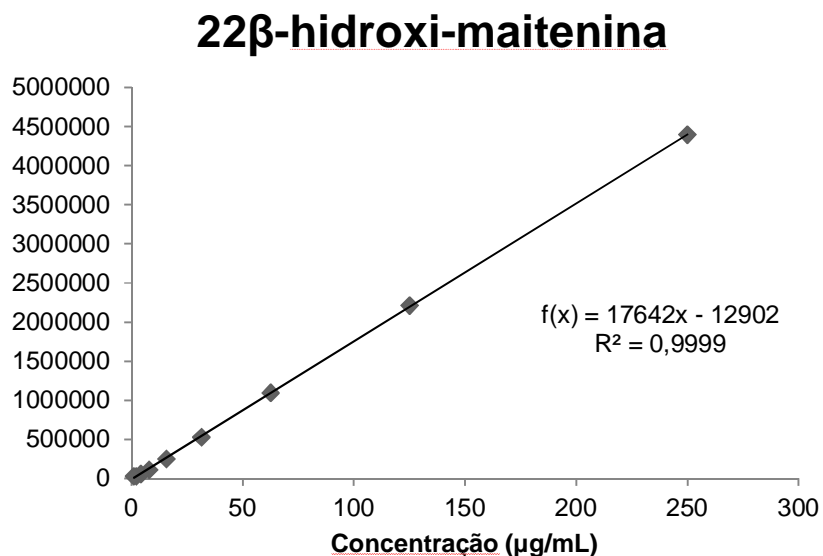


Figura All 2: Curva de calibração do padrão maitenina para quantificação do analito em extrato diclorometano de raízes adventícias de *Monteverdia floribunda*.

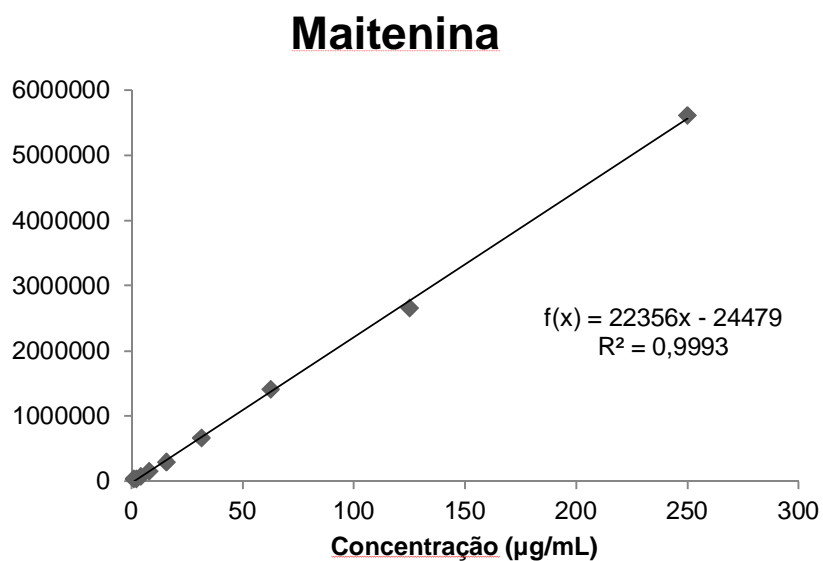


Figura All 3: Curva de calibração do padrão celastrol para quantificação do analito em extrato diclorometano de raízes adventícias de *Monteverdia floribunda*.

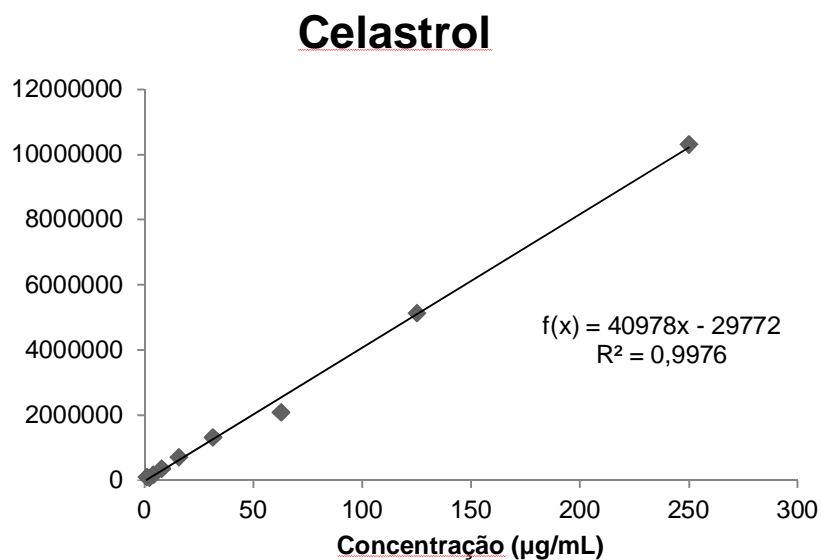
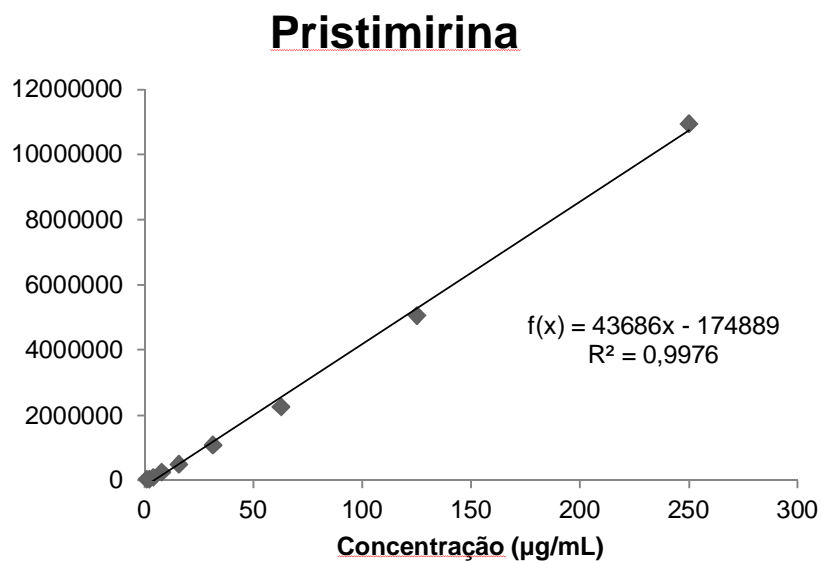
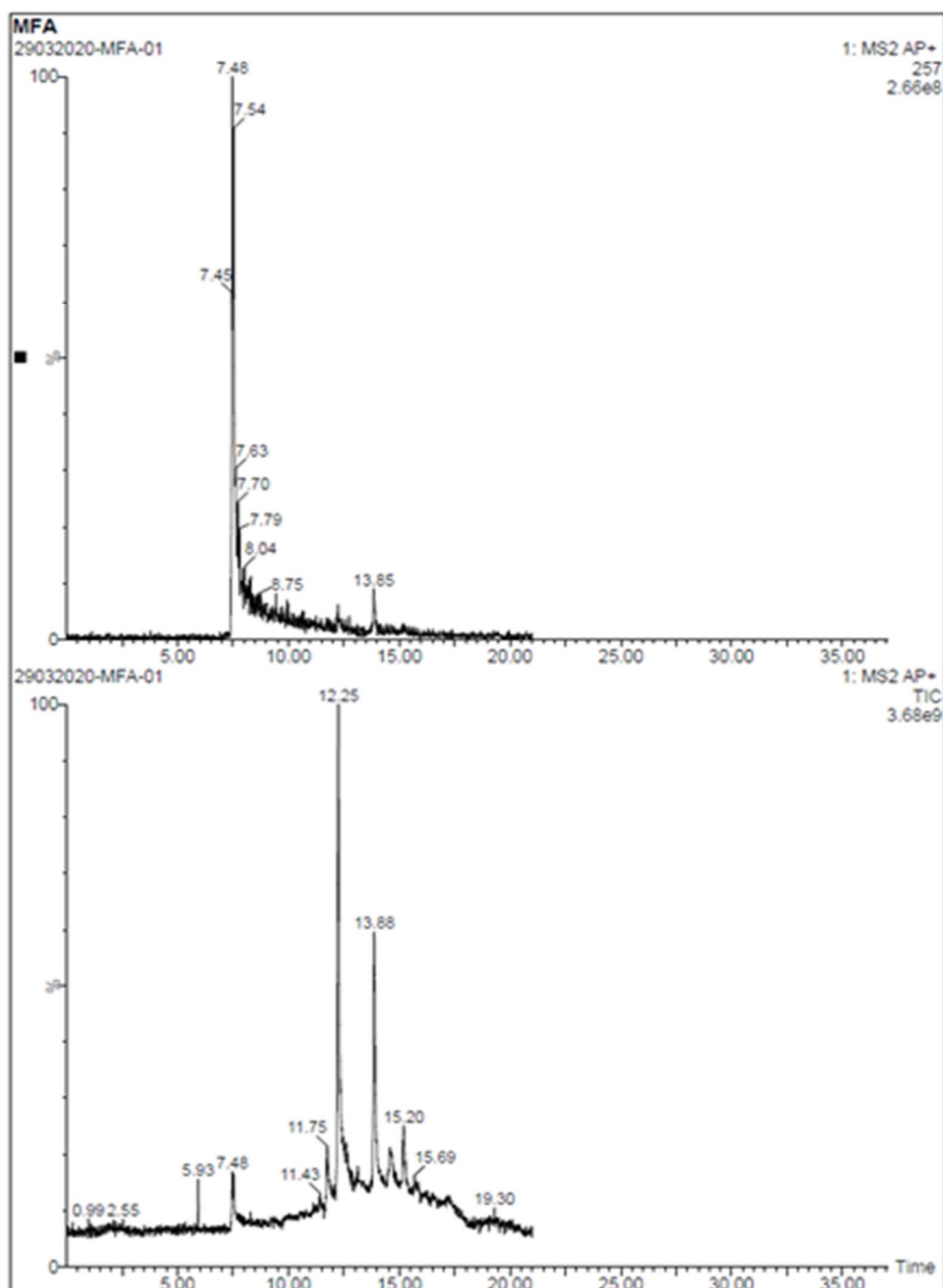


Figura All 4: Curva de calibração do padrão pristimirina para quantificação do analito em extrato diclorometano de raízes adventícias de *Monteverdia floribunda*.

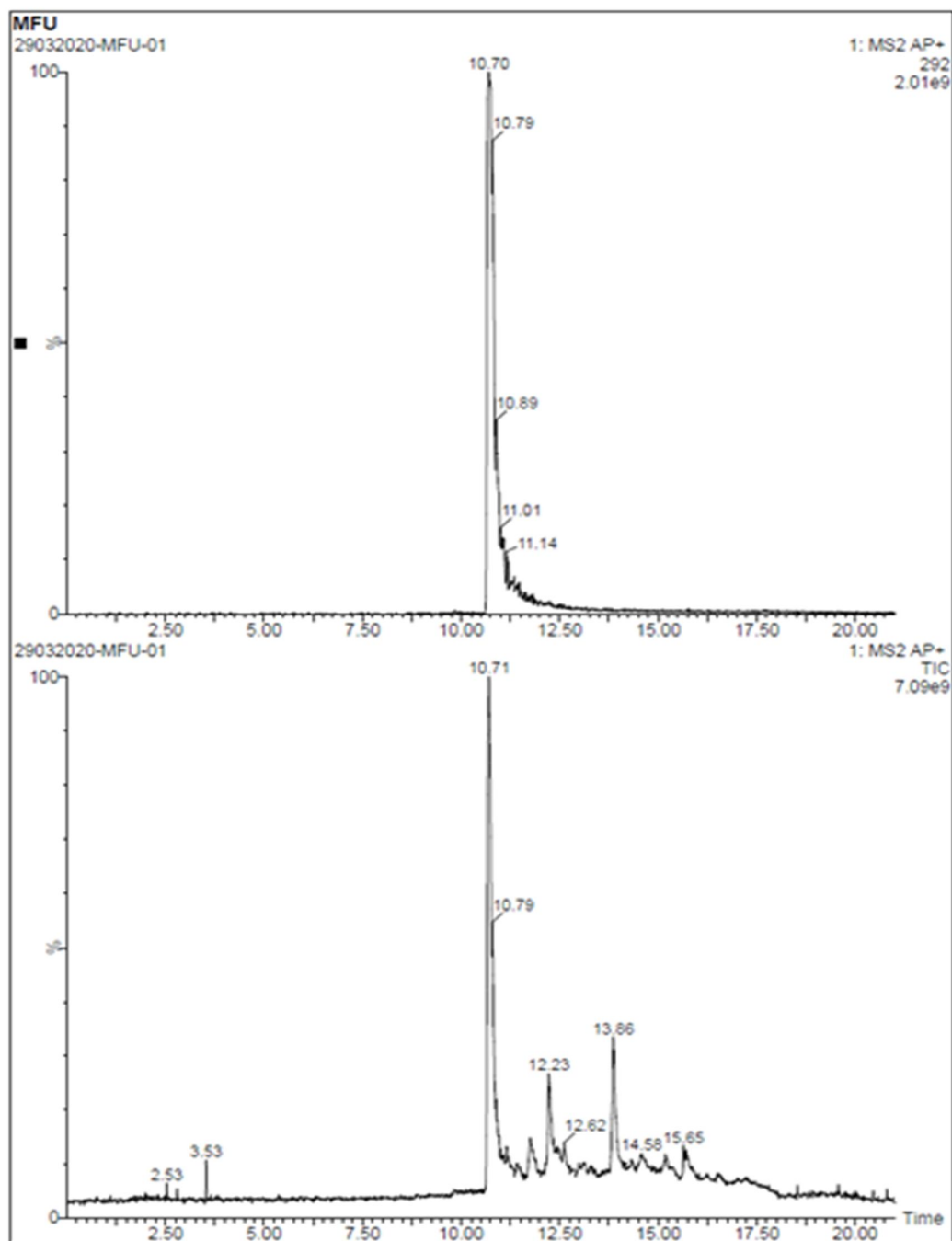


Anexo III

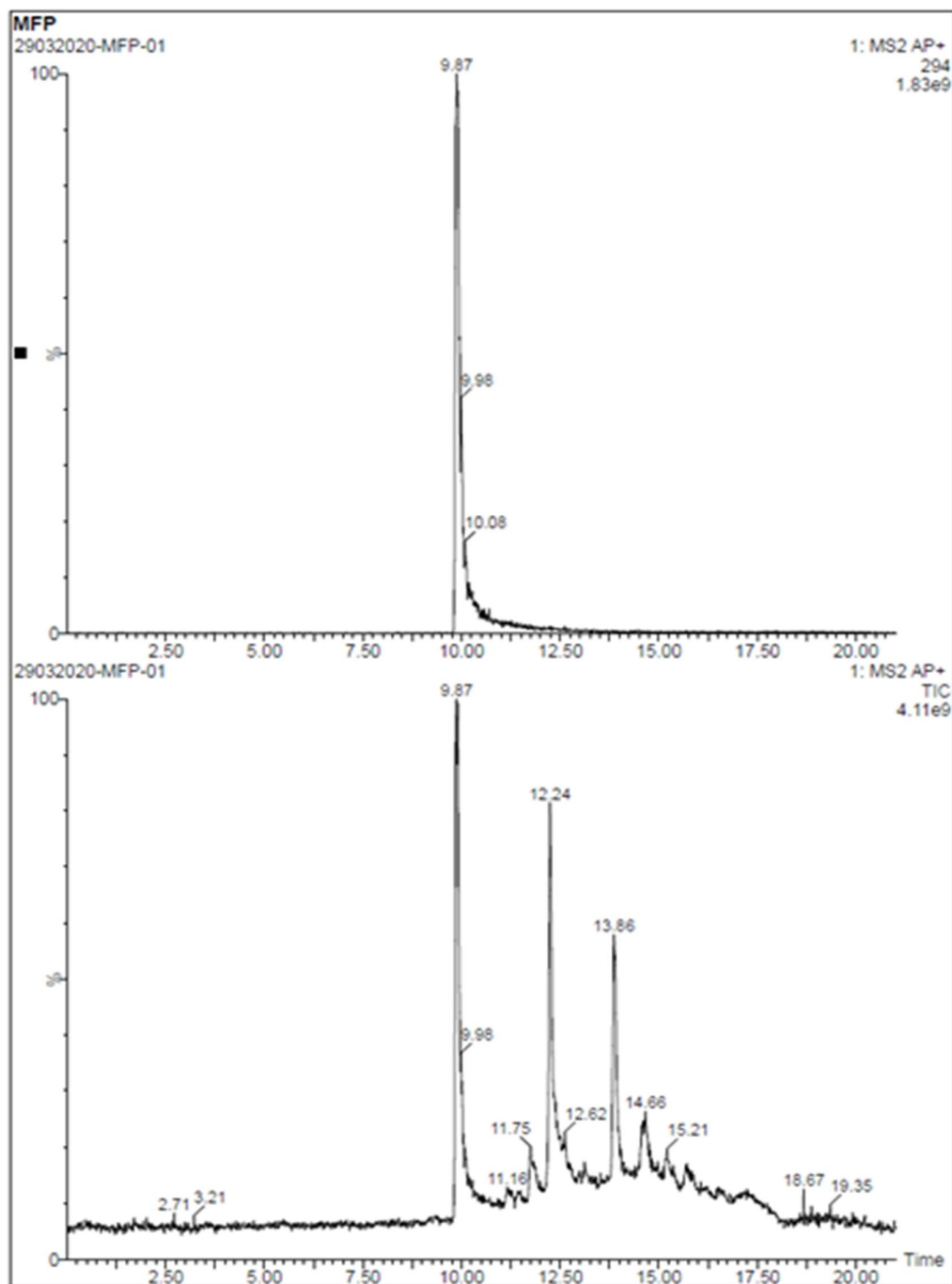
(Ancymidol) A fórmula molecular de (Figura 15-B TR:7,50 min) foi determinada como $C_{15}H_{16}N_2O_2$ baseada nos espectros de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo. A molécula protonada $[M + H]^+$ apresentou $m/z = 256,30$.



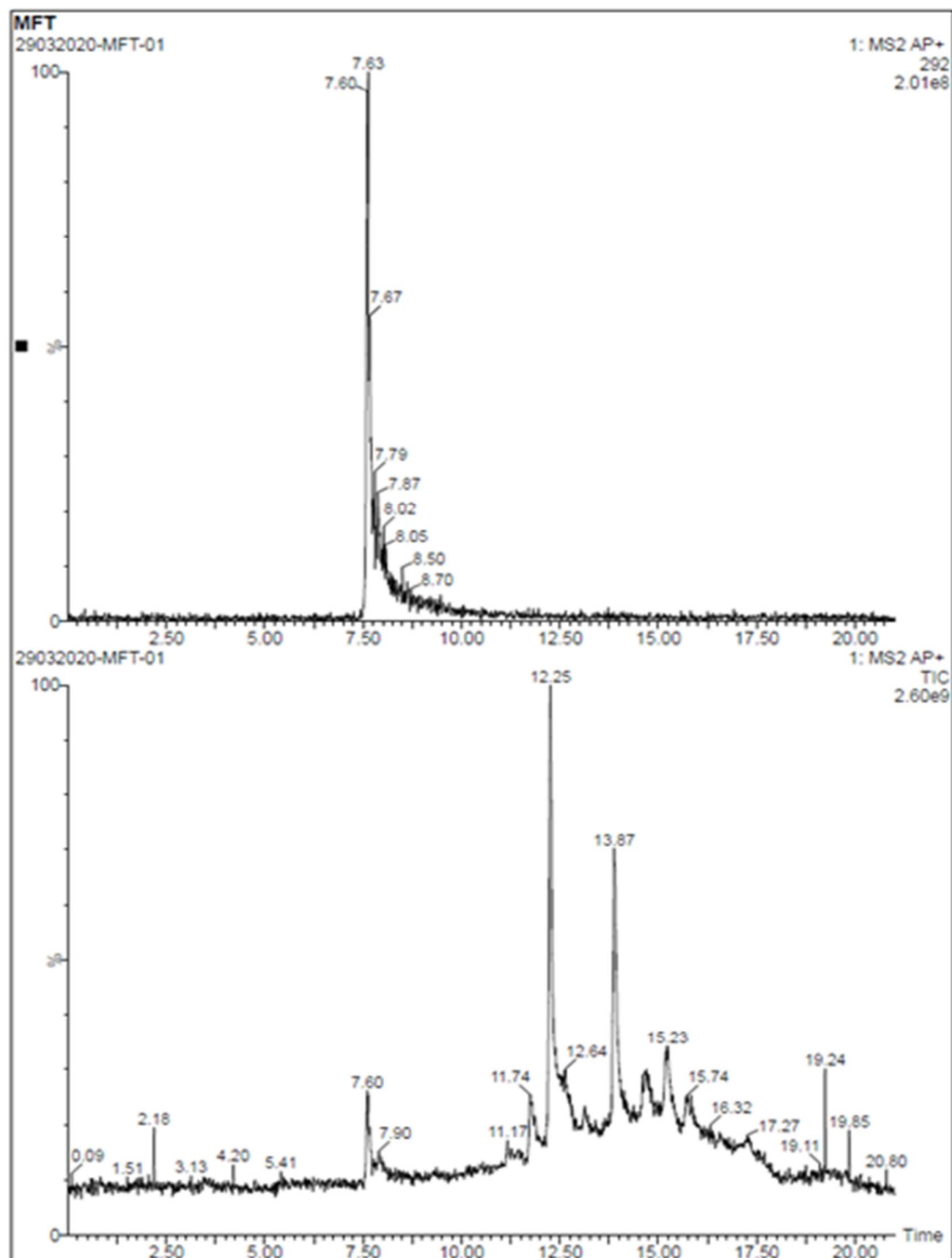
(Uniconazol) A fórmula molecular de (Figura 15-C TR:10,71 min) foi determinada como $C_{15}H_{18}ClN_3O$ baseada nos espectros de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo. A molécula protonada $[M + H]^+$ apresentou $m/z = 291,78$.



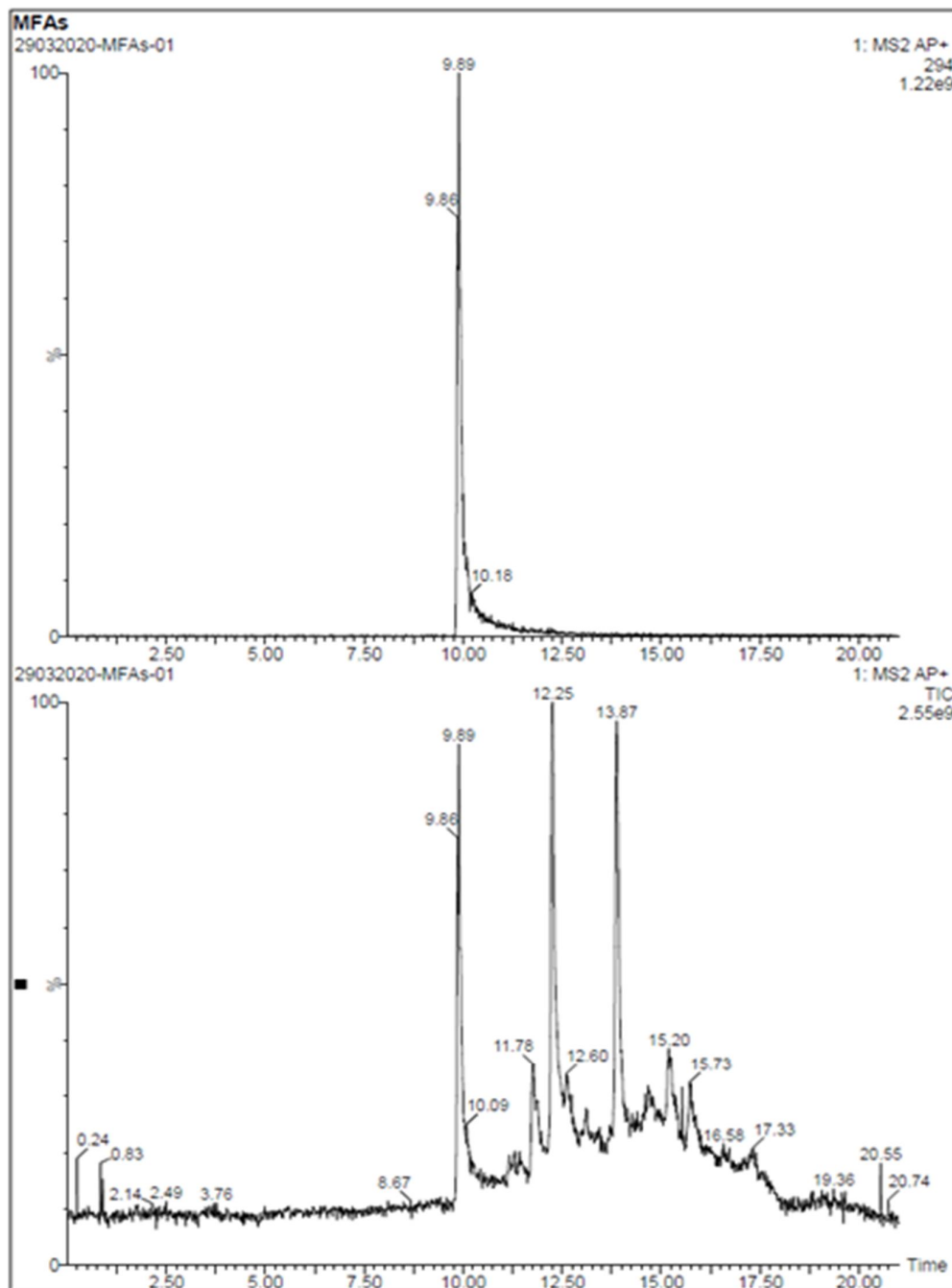
(Paclobutrazol) A fórmula molecular de (Figura 15-D TR:9,87 min) foi determinada como $C_{15}H_{20}ClN_3O$ baseada nos espectros de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo. A molécula protonada $[M + H]^+$ apresentou $m/z = 293,79$.



(Terbinafina) A fórmula molecular de (Figura 15-E TR:10,71 min) foi determinada como $C_{21}H_{25}N - HCl$ baseada nos espectros de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo. A molécula protonada $[M + H]^+$ apresentou $m/z = 291,43$.



(Paclobutrazol em associação com Giberelina) A fórmula molecular de (Figura 15-F TR:9,89 min) foi determinada como $C_{15}H_{20}ClN_3O$ baseada nos espectros de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo. A molécula protonada $[M + H]^+$ apresentou $m/z = 293,79$.



(Giberelina em associação com Paclobutrazol) A fórmula molecular de (Figura 15-G TR:0,85 min) foi determinada como C₁₉H₂₂O₆ baseada nos espectros de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo. A molécula protonada [M + H]⁺ apresentou m/z = 346.37 e aduto de m/z 75.

