



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Letícia Aranha Netto

Emprego da cultura de tecidos e células vegetais como modelo experimental aplicado ao estudo da via de biossíntese de cumarina e de ácido clorogênico em *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* (Asteraceae)

Campinas/SP

2018

Leticia Aranha Netto

Emprego da cultura de tecidos e células vegetais como modelo experimental aplicado ao estudo da via de biossíntese de cumarina e de ácido clorogênico em *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* (Asteraceae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Biologia Vegetal

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA LETÍCIA
ARANHA NETTO E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCOS JOSÉ SALVADOR

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador

Campinas/SP

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 131125/2016-8; CAPES
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2849-8686>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

Ar14e Aranha Netto, Leticia, 1991-
Emprego da cultura de tecidos e células vegetais como modelo experimental aplicado ao estudo da via de biossíntese de cumarina e de ácido clorogênico em *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* (Asteraceae) / Leticia Aranha Netto. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Marcos José Salvador.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Guaco. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. 3. Células vegetais - Cultura e meios de cultura. 4. Cumarinas. 5. Ácido clorogênico. I. Salvador, Marcos José, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Plant tissue and cell cultures as experimental models for studies of coumarin and chlorogenic acid biosynthesis in *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* (Asteraceae)

Palavras-chave em inglês:

Guaco

Plant tissue culture

Plant cell culture

Coumarins

Chlorogenic acid

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Marcos José Salvador [Orientador]

Maria Éli da Alves Stefanello

Marília de Moraes Castro

Data de defesa: 25-05-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 25 de maio de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos José Salvador

Profa. Dra. Maria Élica Alves Stefanello

Profa. Dra. Marília de Moraes Castro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedicatória

**Aos meus pais,
À minha irmã Natália,
Que nunca desistiram de mim.**

Agradecimentos

Aos meus pais e minha irmã por todo o amor e à toda minha família pelo apoio integral durante essa fase e durante toda a minha vida.

Ao meu orientador, Professor Doutor Marcos José Salvador, que desde o começo acreditou que eu conseguiria realizar esse trabalho. Muito obrigada pela confiança e por todos os ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

À Dra. Nathália Luíza Andreazza que teve tanta paciência e dedicação para me ensinar durante a Iniciação Científica e o Mestrado.

À Professora Doutora Alexandra C.H.F. Sawaya e ao Mestre Alexandre Augusto Borghi pela realização das análises no UHPLC-MS.

A todo o nosso grupo de pesquisa que sempre estava lá para me ajudar e aconselhar durante a realização dessa pesquisa, além de tornar mais divertidos os dias no laboratório.

À aluna de Iniciação Científica, Júlia Forato, que contribuiu muito para a realização desse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Biologia Vegetal-IB-UNICAMP pelos ensinamentos e aos funcionários pelo apoio técnico.

Aos senhores membros da banca de qualificação e examinadora, pelo aceite e indispensáveis contribuições para este trabalho.

A todos os amigos dentro e fora da Unicamp, que me proporcionaram momentos de diversão e leveza durante as dificuldades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX) da UNICAMP, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade de formação e aperfeiçoamento profissional.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

Mikania glomerata Spreng e *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker., popularmente conhecidas como guaco, são usadas para o tratamento de doenças do sistema respiratório por seu efeito broncodilatador, ação atribuída à cumarina. Devido a semelhanças morfoanatômicas, as duas espécies são usadas indistintamente pela população, porém trabalhos documentados em literatura mostram diferenças entre seus perfis químicos, ocorrendo a prevalência de acúmulo de cumarina em *M. laevigata* e de ácido clorogênico em *M. glomerata*, levantando a questão se ambas podem ser usadas como insumo para o fitoterápico. Existe, dessa forma, a necessidade de se entender melhor os processos biossintéticos e metabólicos referentes a estas substâncias nestas duas espécies do gênero *Mikania*. Culturas de células e tecidos vegetais apresentam um grande potencial para produção de metabólitos secundários *in vitro*, devido à rápida proliferação celular e pelo alto controle e fácil manipulação das condições de cultivo, tornando-as ideais para estudos de regulação e produção de um metabólito de interesse. Este estudo visa investigar o emprego da cultura de tecidos e células vegetais como modelo biológico aplicado ao estudo da via de biossíntese de cumarina e de ácido clorogênico em *M. glomerata* e *M. laevigata*. Após o estabelecimento da cultura de calos e de suspensões celulares a partir da lâmina foliar de folhas jovens, foram realizados tratamentos em que as suspensões foram inoculadas com diferentes metabólitos da via de biossíntese de cumarina e ácido clorogênico. Os extratos hidroalcoólicos de calos e suspensões foram avaliados quanto ao perfil químico utilizando UHPLC-MS. O perfil químico obtido dos calos logo após o estabelecimento das culturas mostrou que as células produziram baixas concentrações ou não produziram as substâncias estudadas. Contudo, após nova avaliação, dois anos depois do estabelecimento, os calos passaram a sintetizar tanto cumarina quanto ácido clorogênico. A curva de crescimento e os tratamentos das células com ácido clorogênico e cumarina sugerem a existência de uma modulação positiva em termos de metabolismo entre a síntese de ácido clorogênico e de cumarina, em *M. glomerata*, enquanto em *M. laevigata* os mesmos tratamentos parecem ter um efeito negativo. Os tratamentos com fornecimento de cumarina nas duas espécies também levaram a síntese de um intermediário da via da biossíntese de cumarina, o diidromelilotosídeo. A fenilalanina exógena não alterou a via de biossíntese da cumarina, mas diminuiu a concentração de ácidos clorogênicos, provavelmente desviando a rota para a produção de outras substâncias dessa via. A adição de ácido *o*-cumárico levou a síntese de dois precursores glicosilados da via da síntese de cumarina, o melilotosídeo e o diidromelilotosídeo. Foi observado também aumento da concentração de cumarina nos primeiros cinco dias, em *M. glomerata*, mas não em *M. laevigata*. Já os efeitos de ácido *p*-cumárico parecem ser dose-dependente, modulando a via de síntese de ácido clorogênico de maneira positiva ou negativa dependendo da concentração aplicada. Os dados, de maneira geral, sugerem o potencial da cultura de tecidos e células para *M. glomerata* como modelo para estudo de biossíntese de cumarina e ácido clorogênico, contudo a instabilidade quanto ao crescimento das culturas celulares e diferenças no perfil químico dos extratos hidroalcoólicos de culturas células de *M. laevigata* faz com seja necessária a continuidade das investigações para confirmar seu uso como modelo de estudos.

Abstract

Mikania glomerata Spreng and *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, popularly known as guaco, are used for the treatment of respiratory system diseases due to its bronchodilator effect, which is attributed to coumarin. Due to morpho-anatomical resemblance, both are used interchangeably by the population, however, research documented in the literature show differences between the chemical profiles of both species, with a prevalence of coumarin accumulation in *M. laevigata* and chlorogenic acid in *M. glomerata*, raising the question whether both can be used as a source for medicine. Therefore, there is the need to better understand the biosynthetic and metabolic processes related to these substances in these two species of the genus *Mikania*. Plant tissue and cell cultures have great potential to produce secondary metabolites *in vitro* due to rapid cell proliferation and due to high control and easy manipulation of the culture conditions, which makes them ideal for regulatory and biosynthesis studies of a metabolite of interest. This study aims to investigate the use of plant tissue and cell cultures as biological models applied to the study of coumarin and chlorogenic acid biosynthesis in *M. glomerata* and *M. laevigata*. After the establishment of callus culture and cell suspensions, treatments were performed in which suspensions were treated with different metabolites belonging to the biosynthesis pathway of coumarin and chlorogenic acid. The hydroalcoholic extracts of callus and suspensions were evaluated by their chemical profile using UHPLC-MS. The calli chemical profiles just after the establishment of the cultures showed that the cells of both plants in semi-solid medium produced low concentrations or did not produce the studied substances. However, after another evaluation, two years later, the callus began to synthesize both coumarin and chlorogenic acids. The growth curve and cells' treatments with chlorogenic acid and coumarin suggest the existence of a positive modulation in terms of metabolism between the synthesis of chlorogenic acid and coumarin in *M. glomerata*. On the other hand, in *M. laevigata*, the same treatments seem to have a negative on the modulation between the two metabolites. The treatments with coumarin feeding with both species also led to the synthesis of glucoside intermediates of coumarin biosynthesis pathway, melilotoside and dihydromelilotoside. Exogenous phenylalanine did not alter the coumarin biosynthesis, but decreased the concentration of chlorogenic acids, probably diverting the route to the production of other substances by this pathway. The feeding of *o*-coumaric acid led to synthesis of two coumarin precursors, melilotoside and dihydromelilotoside. It was also observed an increase in the concentration of coumarin during the first five days of treatment, in *M. glomerata*, but not in *M. laevigata*. The effects of *p*-coumaric acid application appear to be dose-dependent, modulating the chlorogenic acid synthesis pathway positively or negatively depending on the concentration applied to medium. The data, in general, suggest the potential of *M. glomerata* tissues and cell cultures as models for the study of biosynthesis of coumarin and chlorogenic acid. However, the instability of cell cultures and in the chemical profile of hydroalcoholic extracts of *M. laevigata* cells still requires further investigations to confirm its use as model of studies.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Fotografias de folhas de *Mikania glomerata* (A) e *Mikania laevigata* (B). Fonte adaptada de Melo, 2013. 20
- Figura 2.** Estruturas de dois ácidos clorogênicos: ácido 5-cafeoilquínico, PM = 354 (A) e ácido 3.5-dicafeoilquínico, PM = 516 (B) 21
- Figura 3.** Estrutura da cumarina simples (1,2-benzopirona), PM = 146..... 22
- Figura 4.** Via de biossíntese dos fenilpropanóides (primeiras etapas). Fonte adaptada: Escamilla-Trevino et al., 2014..... 24
- Figura 5.** Cultura de calos de *Mikania glomerata* (A). Formação de raízes nas culturas (B). Suspensões celulares de *Mikania glomerata* (C)..... 35
- Figura 6.** Cultura de calos de *Mikania laevigata* (A). Suspensões celulares de *Mikania laevigata* (B)..... 35
- Figura 7.** Cromatograma UHPLC-MS no modo negativo (A) e no modo positivo (B) do extrato dos calos com 20 dias de subcultivo de *Mikania glomerata*..... 37
- Figura 8.** Cromatograma UHPLC-MS no modo negativo (A) e no modo positivo (B) do extrato dos calos com 30 dias de subcultivo de *Mikania laevigata*..... 37
- Figura 9.** Quantificação de cumarina, m/z 147 (A), ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (B), ácido dicafeoilquínico m/z 515 (C) em calos de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*, coletados após 15, 30 e 60 dias de subcultivo. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre espécies, dentro do mesmo tempo de coleta (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes períodos de coleta em uma mesma espécie (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão)..... 39
- Figura 10.** Curvas de crescimento de suspensões celulares de *Mikania glomerata* (A) e *Mikania laevigata* (B). Valores da massa seca em gramas. Média de três repetições (\pm desvio padrão). 40
- Figura 11.** Quantificação de cumarina, m/z 147 (A), ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (B) e ácido dicafeoilquínico m/z 515 (C) em suspensões celulares de *Mikania glomerata* ao longo de 60 dias, com coleta a cada 5 dias. Média de três repetições (\pm desvio padrão). 42
- Figura 12.** Quantificação de cumarina, m/z 147 (A), ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (B), ácido dicafeoilquínico m/z 515 (C) em suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias. C1, C2, C3, C4 e C5 correspondem às concentrações de ácido clorogênico iguais a 31; 170,5; 310; 1705 e 3100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão). 45
- Figura 13.** Quantificação de cumarina, m/z 147 (A), ácido 5-cafeoilquínico m/z 353 (B), e ácido dicafeoilquínico, m/z 515 (C) nas suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de cumarina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de cumarina iguais a: 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão). 47

Figura 14. Cromatograma UHPLC-MS no modo negativo de extratos de suspensões celulares de *Mikania glomerata*, do grupo controle (A) e de células tratadas com 100 µg de cumarina por grama de massa fresca, tratamento C3 (B) e cromatograma selecionado para o íon m/z 327 (C). 48

Figura 15. Espectro de massas, modo negativo, com os fragmentos obtidos por LC-MS/MS da substância de m/z 327 encontrado em células de *Mikania glomerata* tratadas com 100µg de cumarina por grama de massa fresca, por cinco dias..... 48

Figura 16. Quantificação da substância de m/z 327 e tempo de retenção 2,57 min em suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de cumarina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de cumarina iguais a 10 µg.g⁻¹ massa fresca, 20 µg.g⁻¹ massa fresca e 100 µg.g⁻¹ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (± desvio padrão). 49

Figura 17. Quantificação de cumarina, m/z 147 (A) e ácido dicafeoilquínico, m/z 515 (B) nas suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de fenilalanina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de fenilalanina iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (± desvio padrão). 50

Figura 18. Quantificação de cumarina, m/z 147 em suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *o*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (± desvio padrão). 51

Figura 19. Cromatograma UHPLC-MS no modo negativo de extratos de suspensões celulares de *Mikania glomerata*, do grupo controle (A) e de células tratadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico, C3 (B) e cromatogramas selecionados para os íons m/z 325 (C) e m/z 327 (D). 53

Figura 20. Espectro de massas, modo negativo, com os fragmentos obtidos por LC-MS/MS da substância de m/z 325 encontrado em células de *Mikania glomerata* tratadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico por cinco dias. 53

Figura 21. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (A) e ácido dicafeoilquínico, m/z 515 (B) em suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *p*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *p*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (± desvio padrão). 55

Figura 22. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353, em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias (µg.g⁻¹ de massa celular seca). C1, C2, C3, C4 e C5 correspondem às concentrações de ácido clorogênico iguais a 31; 170,5; 310; 1705 e 3100 µg.g⁻¹ célula fresca, respectivamente. Letras distintas indicam

diferenças estatísticas entre os tratamentos (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão)..... 56

Figura 23. Quantificação de ácido dicafeoilquínico, m/z 515, em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa celular seca). C1, C2, C3, C4 e C5 correspondem às concentrações de ácido clorogênico iguais a 31; 170,5; 310; 1705 e 3100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ célula fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão)..... 57

Figura 24. Quantificação de cumarina m/z 147 e ácido dicafeoilquínico m/z 515 em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com diferentes concentrações de cumarina por 5 e 10 dias ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa celular seca). C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de cumarina iguais a: 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão)..... 59

Figura 25. Cromatogramas UHPLC-MS no modo negativo de extratos de suspensões celulares de *Mikania laevigata*, do grupo controle (A) e de células tratadas com 100 μg de cumarina por grama de massa fresca, tratamento C3 (B) e cromatograma selecionado para o íon m/z 327 (C)..... 60

Figura 26. Espectro de massas, modo negativo, com os fragmentos obtidos por LC-MS/MS da substância de m/z 327 encontrado em células de *Mikania laevigata* tratadas com 100 μg de cumarina por grama de massa fresca, por cinco dias. 60

Figura 27. Quantificação da substância de m/z 327 e tempo de retenção 2,6 min nas suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de cumarina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de cumarina iguais a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão)..... 61

Figura 28. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (A) e ácido dicafeoilquínico, m/z 515 (B) nas suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de fenilalanina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de fenilalanina iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão)..... 62

Figura 29. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (A) e ácido dicafeoilquínico, m/z 515 (B) em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *o*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão)..... 64

- Figura 30.** Cromatogramas UHPLC-MS no modo negativo de extratos de suspensões celulares de *Mikania laevigata*, do grupo controle (A) de células tratadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico, tratamento C3 (B) e cromatogramas selecionados para os íons *m/z* 325 (C) e *m/z* 327 (D). 65
- Figura 31.** Espectro de massas, modo negativo, com os fragmentos obtidos por LC-MS/MS da substância de *m/z* 327 encontrado em células de *Mikania laevigata* tratadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico, por cinco dias. 66
- Figura 32.** Quantificação da substância de *m/z* 325 (A) e *m/z* 327 (B), com tempo de retenção 2,8 min nas suspensões de celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *o*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão). 67
- Figura 33.** Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, *m/z* 353 (A) e ácido dicafeoilquínico, *m/z* 515 (B) em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *p*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *p*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão). 68
- Figura 34.** Curva de crescimento típica de uma cultura de células vegetais em suspensão, mostrando as principais fases de crescimento (A) e curva de crescimento de células em suspensão de *Cinchona robusta* (B). Fonte: Blom et al. 1992. 73
- Figura 35.** Estrutura do Diidromelilotosideo (PM = 328) e dos possíveis fragmentos obtidos por MS/MS. Fonte adaptada de Yang et al. 2007 78
- Figura 36.** Estrutura do Melilotosideo (PM = 326) e dos possíveis fragmentos obtidos por MS/MS. Fonte adaptada: Yang et al. 2007 81

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Diferentes combinações de concentração de ácido diclorofenoxiacético e 6-benzilaminopurina empregadas para indução de calos em ambas espécies de guaco. 30
- Tabela 2.** Gradiente otimizado para análise por UHPLC-MS. Fase móvel A- água purificada (Milli-Q) com 0,1 % de ácido fórmico e fase móvel B- acetonitrila..... 32
- Tabela 3.** Tempo de Retenção e massa molecular dos íons de compostos da via dos fenilpropanóides para estudo do perfil químico de amostras de *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*..... 33

Lista de Anexos

- Anexo 1.** Curva analítica obtida pela análise de soluções de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de cumarina (A) e ácido clorogênico (B). UA= unidade arbitraria. 96
- Anexo 2.** Curva analítica obtida pela análise de soluções de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de cumarina (A) e ácido clorogênico (B). UA= unidade arbitraria. 97
- Anexo 3.** Curva analítica obtida pela análise de soluções de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de ácido *o*-cumárico. UA= unidade arbitraria. 98

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
4CL	4-coumarato Coenzima A ligase
5CQA	5-cafeoilquínico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
AOPP	ácido α -amino 8-oxi-fenilpropiónico
BAP	6-benzilaminopurina
C2H	Cinamato 2-hidroxilase
C3H	p-Coumaroyl ester 3-hydroxylase
C3'H	p-coumaroylshikimate-3-hydroxylase
C4H	Cinamato 4-hidroxilase
CAT	Cloranfenicol acetiltransferase
CGA	Chlorogenic acid (<i>Ácido clorogênico</i>)
CHS	Chalcona sintase
CQA	Caffeoyl quinic Acid (<i>Ácido cafeoilquínico</i>)
diCQA	Dicaffeoylquinic acid (<i>Ácido dicafeoilquínico</i>)
ESI	Electrospray Ionisation (<i>Ionização por electrospray</i>)
EtOH	Etanol
HAE	Extratos hidroalcoólicos
HPLC	High-performance liquid chromatography (<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>)
HCT	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate hydroxycinnamoyl transferase
HQT	Hydroxycinnamoyl CoA quinate transferase
MG	<i>Mikania glomerata</i>
ML	<i>Mikania laevigata</i>
MS	Meio Murashige e Skoog
MS	Mass Spectrometry (<i>Espectrometria de Massas</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial

<i>m/z</i>	Razão massa/carga
PAL	Phenylalanine ammonium lyase (<i>Fenilalanina amônia-liase</i>)
PM	Peso Molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
TQD	Triplo-quadrupolar
triCQA	Tricaffeoylquinic acid (<i>Ácido tricafeoilquínico</i>)
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography (<i>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência</i>)
UV	Ultra-violeta

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas	13
Lista de Anexos.....	14
Abreviaturas	15
1. Introdução.....	18
1.1. Fitoterápicos e o Guaco.....	18
1.2. Ácido Clorogênico e Cumarina	20
1.3. Via de biossíntese dos fenilpropanóides.....	22
1.4. Cultura de Tecidos vegetais	24
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. Material e Métodos.....	28
3.1. Cultura de tecidos e células.....	28
3.2. Curvas de Crescimento das células em suspensão.....	31
3.3. Tratamentos.....	31
3.4. Identificação e quantificação das substâncias da via biossintética	32
3.5. Análise Estatística	33
4. Resultados.....	34
4.1. Estabelecimento das culturas de tecidos e células vegetais	34
4.2. Identificação e quantificação das substâncias da via biossintética em calos de <i>Mikania</i> ...	36
4.3. Curvas de Crescimento das suspensões celulares.....	39
4.3. Tratamentos com células de <i>Mikania glomerata</i>	42
4.4. Tratamentos com células de <i>Mikania laevigata</i>	55
5. Discussão.....	69
5.1. Considerações sobre cultura de calos de <i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i>	69
5.2. Considerações sobre as suspensões celulares de <i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i>	72
5.3. Tratamentos.....	75
6. Conclusão	85
10. Referências Bibliográficas.....	86
Anexos	96

1. Introdução

1.1. Fitoterápicos e o Guaco

Desde tempos remotos a humanidade tem utilizado espécies vegetais para os mais diversos fins, como fonte de alimentos, matéria prima para construção de habitação, elaboração de meios de transporte, vestuário, utensílios domésticos, insumos para a saúde e como fonte de fármacos e medicamentos. Esse conhecimento popular de espécies vegetais é uma fonte inestimável de informações para o desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção e planejamento de fármacos, além de possibilitar sua aplicação como fitoterápicos, cosméticos, alimentos nutracêuticos e agroquímicos (Benko-Iseppon & Crovella, 2011).

O mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano, sendo que no Brasil estima-se que o comércio deles seja de 5% em relação ao mercado total de medicamentos, com movimento de US\$ 400 milhões (Pinto et al., 2002). Portanto, a fitoterapia pode atender várias demandas da saúde da população, desde que abranja as exigências de controle de qualidade na produção e processamento das plantas, garantindo a eficácia e segurança aos usuários (Tomazzoni et al., 2006). Se este controle não for realizado efetivamente, alterações na composição química, eficácia, pureza e autenticidade da matéria-prima vegetal podem desenvolver fitoterápicos de má qualidade. (Carvalho et al., 2008; Silveira et al., 2008).

No Brasil, duas espécies do gênero *Mikania* (família Asteraceae), são facilmente encontradas e muito utilizadas na medicina popular na forma de xaropes para tratamento de afecções das vias aéreas, devido ao seu efeito broncodilatador e anti-inflamatório (Silva et al., 2008), sendo elas a *Mikania glomerata* Spreng., oficializada na Farmacopéia Brasileira 1.^a edição desde 1929 (Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1929, Brandão et al., 2008) e *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (Gasparetto et al., 2010), incluída somente no sexto fascículo da Farmacopéia Brasileira 4.^a edição (Farmacopéia Brasileira, 2005; Bolina et al., 2009). As duas ocorrem principalmente na Floresta Atlântica do Brasil, crescendo desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, podendo, também, ser encontradas na Bahia, Paraguai e noroeste da Argentina (Lima et al., 2003a).

Os efeitos broncodilatadores de *M. glomerata* foram reportados por Moura et al. (2002), cujo trabalho mostrou que os extratos aquoso e hidroalcoólico (HAE) inibiram significativamente contrações induzidas por histamina em traqueias isoladas de porquinhos da Índia e HAE também induziu um relaxamento dependente da concentração nos tubos

brônquicos humanos pré-tratados com K^+ (IC₅₀ 0,34 (0,26-0,22 mg.mg⁻¹)). Em estudos de avaliação do HAE de *M. laevigata* para o tratamento de doenças respiratórias, verificou-se que o extrato induziu o relaxamento de epitélio traqueal de ratos, pré-contraído com acetilcolina (Graça et al., 2007; Gasparetto et al., 2010). Estes dados amparam a indicação de que *M. glomerata* e *M. laevigata* podem ser usados para tratar doenças respiratórias broncoconstritantes.

Além do tradicional efeito broncodilatador, extratos de *Mikania glomerata* também apresentaram resultados positivos em estudos de atividade anti-inflamatória (Oliveira et al. 1985; Freitas et al. 2008), antimicrobiana (Pessini et al., 2003; Duarte et al., 2004), antioxidante (Freitas et al. 2008), antiofídica (Pereira et al., 1994) e inibição de mobilidade intestinal (Salgado et al. 2005), enquanto extratos de *M. laevigata* apresentaram propriedades antiulcerogênica (Bighetti et al., 2005), anti-inflamatória (Freitas et al. 2008), antimicrobiana (Yatsuda et al. 2005) e antioxidante (Okuyama et al. 2011).

Em virtude das suas propriedades terapêuticas, o xarope e a solução oral de *M. glomerata* foram incluídos no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da Portaria N°. 3.237 de 24 de dezembro de 2007 (Ministério da Saúde, 2007). Na Instrução Normativa 5 de 11 de dezembro de 2008, publicada pela ANVISA, 36 plantas medicinais tiveram seu registro simplificado, inclusive a *M. glomerata*, facilitando assim a sua produção industrial (ANVISA, 2008). Além disso, de todas as plantas com medicamentos fitoterápicos licenciados pela ANVISA *M. glomerata* apresenta o maior número de produtos, somando 25 licenças (Carvalho et al. 2018). Atualmente, *M. glomerata* também se encontra incluída na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, assim pacientes podem ter acesso a este fitoterápico através do serviço de saúde pública brasileiro, gratuitamente. Dessa forma, os medicamentos fitoterápicos a base de guaco vem sendo utilizados em larga escala na rede de saúde pública e pela população em geral.

As propriedades terapêuticas do guaco são atribuídas à substância cumarina, porém trabalhos mostram altas concentrações de ácido clorogênico que também apresenta atividades terapêuticas importantes. Ambos são substâncias derivadas da via biossintética dos fenilpropanóides (Vogt, 2010). Estudos fitoquímicos também observaram nessas plantas a presença de ácido *o*-cumárico, diidroocumarina, ácidos e ésteres diterpênicos, triterpenos, ácidos, aldeídos e ésteres orgânicos, saponinas, taninos e esteroides (Veneziani et al., 1999; Yatsuda et al., 2005; Ferreira e Oliveira, 2010; Gasparetto, et al. 2013). Apesar

de ambas as espécies conterem estas classes de metabolitos, a identidade química de cada constituinte dentro da classe pode variar consideravelmente.

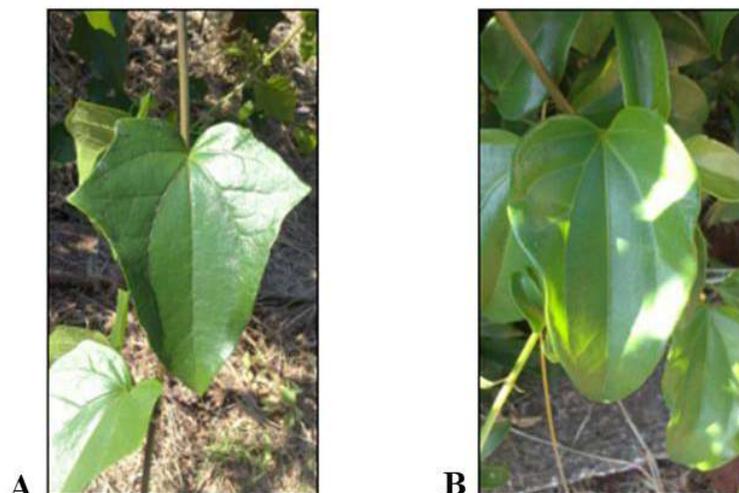


Figura 1. Fotografias de folhas de *Mikania glomerata* (A) e *Mikania laevigata* (B). Fonte adaptada de Melo, 2013.

As espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* por compartilharem o mesmo habitat e apresentarem morfoanatomia muito semelhante (figura 1) são frequentemente comercializadas indistintamente. Contudo, espécies pertencentes a um mesmo gênero podem apresentar diferenças significativas na constituição química (Bolina et al., 2009) e, conseqüentemente, propriedades biológicas distintas.

1.2. Ácido Clorogênico e Cumarina

Ácido clorogênico

O termo "ácidos clorogênicos" (CGA) engloba um grande grupo de compostos que ocorrem naturalmente (Figura 2), contabilizando mais de 400 CGAs relatados em mais de 400 gêneros, compreendendo cerca de 44 ordens botânicas. Em sua maioria são substâncias comumente ingeridas na dieta em alimentos como por exemplo, café (*Coffea arabica*), alcachofra (*Cynara scolymus*), cerejas (*Prunus avium*), mirtilos (*Vaccinium spp.*), berinjela (*Solanum melongena*), maçã (*Malus pumila*), orégano (*Origanum vulgare*), hortelã (*Mentha spicata*), chicória (*Cichorium intybus*) e sementes de girassol (*Helianthus annuus*). O chá de erva-mate feito a partir da infusão de folhas secas de *Ilex paraguariensis* contém também quantidades substanciais de CGAs (Clifford et al. 2017).

O membro mais comum e estudado desse grupo de substâncias é o ácido 5-cafeoilquínico (5CQA), também conhecido somente por ácido clorogênico e é encontrado nas famílias

Asteraceae e Lamiaceae e em abundância no café (Rubiaceae). É produzido através de uma reação de esterificação entre o grupo carboxila do ácido caféico e o grupo 5-hidroxila do ácido quínico (Naveed et al., 2018).

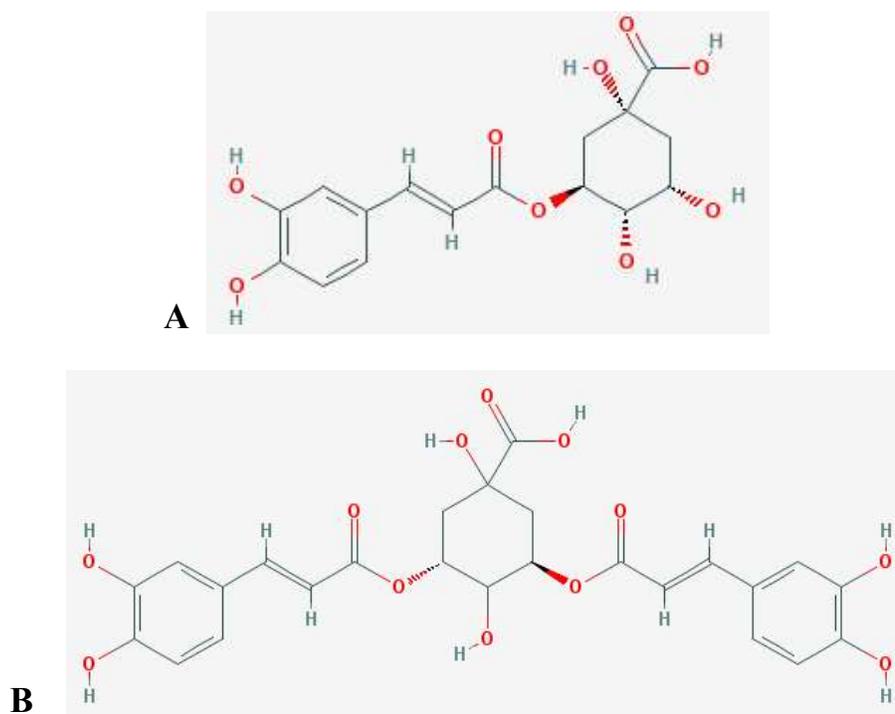


Figura 2. Estruturas de dois ácidos clorogênicos: ácido 5-cafeoilquínico, PM = 354 (A) e ácido 3,5-dicafeoilquínico, PM = 516 (B)

Nas plantas, estudos sugerem que 5CQA é produzido como uma reserva de ácido cinâmico para a biossíntese de lignina, como metabólitos de defesa contra patógeno e proteção contra estresse oxidativo e luz UV (Mhlongo et al. 2016; Clifford et al. 2017; Clé et al. 2008, Moglia et al. 2008). Já seus benefícios para a saúde foram estudados principalmente em trabalhos relacionados ao consumo de café. Foram descritos seus efeitos em reduzir várias doenças crônicas e degenerativas, como câncer, distúrbios cardiovasculares, diabetes, obesidade e doença de Parkinson (Naveed et al. 2018). Outros ácidos clorogênicos, como o ácido dicafeoilquínico (diCQA) e tricafeoilquínico (triCQA) possuem propriedades terapêuticas similares ao do 5CQA, assim como outros benefícios, como inibição do HIV (Tamura et al. 2006), redução de glicose no sangue de ratos diabéticos (Islam 2006) e inibição de hepatotoxinas (Choi et al. 2005). Existem relativamente poucas informações sobre os mecanismos de ação dos ácidos clorogênicos, no entanto suas propriedades terapêuticas são frequentemente relacionadas aos seus poderosos efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores.

Cumarina

As cumarinas compreendem uma classe muito grande de substâncias fenólicas, constituídos de benzeno fundido a anéis de α -pirona. Estas substâncias estão presentes em quantidades notáveis em plantas, embora sua presença também tenha sido detectada em fungos e bactérias (Hoult & Payá, 1996). As cumarinas estão amplamente distribuídas nas plantas, tanto na forma livre como em glicosídeos, e são comumente encontradas em famílias como Apiaceae, Asteraceae e Rutaceae (Dewick, 1997)

Em *M. glomerata* e *M. laevigata* a cumarina simples (1,2-benzopirona) (Figura 3), ocorre em maior concentração no ápice de folhas jovens e sua presença caracteriza o odor aromático agradável lembrando baunilha nestas plantas (Bourgaud et al. 2006). É considerada o principal marcador químico dessas espécies (Gasparetto et al. 2013; ANVISA, 2008) e o principal responsável por sua atividade broncodilatadora, atuando através do relaxamento do tecido muscular liso (Rufatto et al. 2012). Os efeitos anti-inflamatórios do extrato hidroalcoólico de *M. glomerata* e a solução de cumarina simples foram submetidos a comparação em testes *in vivo* (edema de pata) por Leite e colaboradores (1993). Os resultados mostraram efeito anti-inflamatório tanto para o extrato quanto para a solução de cumarina isolada.

Diversas outras atividades terapêuticas atribuídas à cumarina já foram descritas, tais como imunossupressora, hipolipidêmico, relaxante vascular, anticoagulante, hipotensora, espasmolítica, antioxidante, antifúngica, inibição da replicação do vírus HIV-1, entre outros (Pereira et al., 1994; Hoult & Payá, 1996; Vlietinck et al., 1998; Tajik et al., 2017).

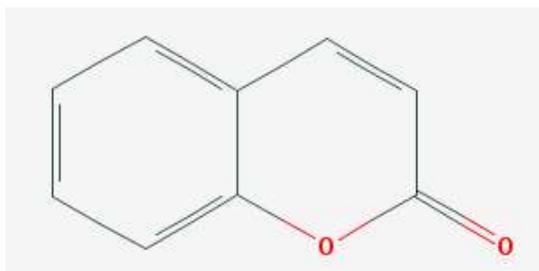


Figura 3. Estrutura da cumarina simples (1,2-benzopirona), PM = 146.

1.3. Via de biossíntese dos fenilpropanóides

Os fenilpropanóides são um grupo diversificado de moléculas derivadas do esqueleto carbônico da fenilalanina (em algumas espécies, também da tirosina) e estão envolvidos

em funções de defesa, suporte estrutural e condução de água (Vogt, 2010). Especificamente a via dos fenilpropanóides (Figura 4) é indispensável para as plantas devido ao seu papel na produção de monolignóis (Boerjan et al., 2003) que atuam como “blocos de construção” da lignina, a qual confere um suporte estrutural, integridade vascular e resistência a patógenos. Além da lignina, outras moléculas do metabolismo secundário são biossintetizadas a partir da via dos fenilpropanóides, tais como o ácido caféico, flavonóides, cumarinas e taninos, que podem contribuir para adaptação das plantas ao ambiente em que se desenvolvem.

A enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) possui um importante papel, fazendo a conexão entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário, tendo-se sugerido que a regulação do fluxo geral da via dos fenilpropanóides é modulada pela velocidade de reação dessa enzima (Singh et al., 2009). A primeira reação para a produção desses fenilpropanóides é a desaminação do aminoácido fenilalanina por essa enzima, gerando o ácido trans-cinâmico. Esse ácido é então para-hidroxilado pela enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H) para produzir o ácido *p*-cumárico, que é ativado pela enzima 4-coumarato-CoA ligase (4CL), resultando no *p*-coumaroil-CoA (Schilmiller et al., 2009). Este representa um ponto de ramificação muito importante dentro da via de biossíntese dos fenilpropanóides, pois é substrato para três enzimas: chalcona sintase (CHS), que catalisa a formação do esqueleto dos flavonóides e as enzimas hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT) e hydroxycinnamoyl CoA: quinato hidroxicincoyl transferase (HQT), que estão envolvidas na biossíntese de ácido clorogênico e unidades formadoras da lignina (Vogt, 2010).

A conversão de *p*-coumaroil-CoA em 5CQA envolve as enzimas HQT e citocromo P450 oxidase *p*-coumaroyl-3-hidroxilase (C3H). A reação catalisada por HQT produz ácido 5-O-*p*-coumaroilquinico (5-*p*CoQA), a partir de *p*-coumaroil-CoA, que então sofre hidroxilação mediada por C3H para produzir 5CQA. Em uma via alternativa, *p*-coumaroil CoA é convertido a ácido 5-O-*p*-coumaroil chiquimico pela enzima HCT, que posteriormente é hidroxilado pela enzima *p*-coumaroylshikimate-3-hydroxylase (C3'H), gerando cafeoil chiquimato, cuja conversão à cafeoil-CoA é realizado por uma enzima HCT atuando na direção reversa. A transformação final de cafeoilCoA em 5CQA provavelmente envolve uma enzima HQT (Clifford et al.2017).

A biossíntese de diCQA e triCQA é pouco conhecida, embora tenha sido relatada a síntese *in vitro* de diCQAs a partir de 5CQA e Coenzima A, mediada por uma enzima HCT

recombinante, clonada a partir de café (Lallemand et al. 2012). No tomate (*Solanum lycopersicum*), também foi observada a conversão de 5CQA em diCQAs *in vitro* pela enzima HQT. Foi proposto que a enzima HQT tenha um duplo papel, catalisando duas reações em diferentes compartimentos subcelulares: no citoplasma atuando como uma quinato transferase, enquanto no vacúolo favorecendo a atividade de clorogenato: clorogenato transferase (acil-quinato: acil-quinato transferase), produzindo diCQA (Moglia, et al. 2014).

A biossíntese da cumarina ocorre pela via do ácido *o*-cumárico (Gestetner & Conn, 1974). Neste caso, após a formação do ácido *trans*-cinâmico, pela PAL, ele é então orto-hidroxilado pela ação da enzima cinamato 2-hidroxilase (C2H) para produzir o ácido *o*-cumárico. Em seguida este ácido é glicosilado e passa por uma isomerização *cis-trans* da ligação dupla da cadeia lateral, assumindo forma *Z* (Kosuge & Conn, 1961). Nesta etapa é transformado em cumarinato (ácido cumarínico) por uma β -glicosidase (Kleinhofs et al., 1967; Poulton et al., 1980) e a formação da cumarina se dá por lactonização espontânea (Dewick, 1997).

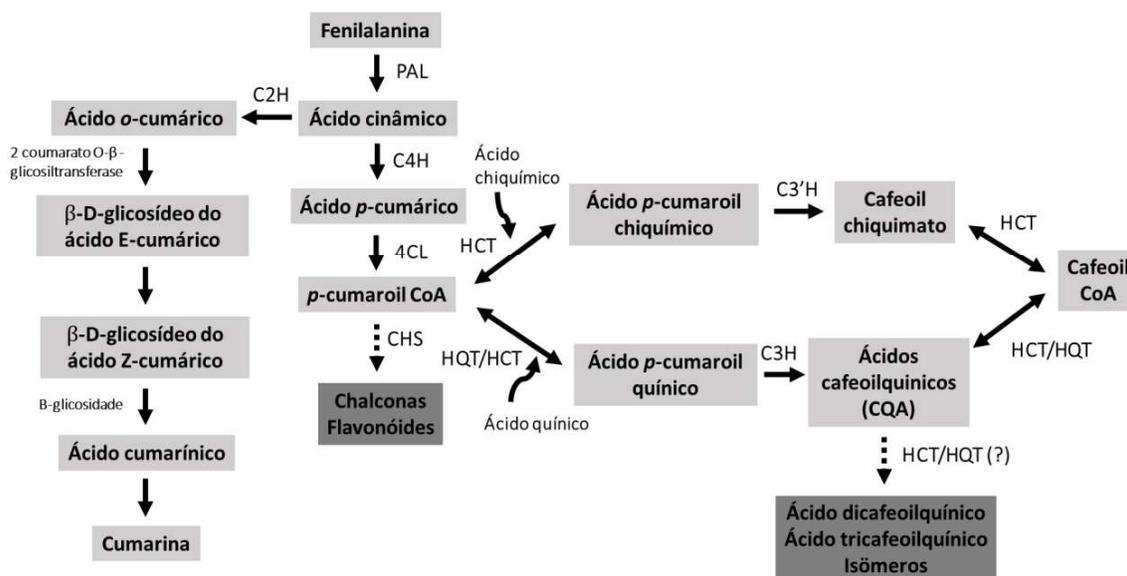


Figura 4. Via de biossíntese dos fenilpropanóides (primeiras etapas). Fonte adaptada: Escamilla-Trevino et al., 2014.

1.4. Cultura de Tecidos vegetais

O cultivo de tecidos vegetais se iniciou nos anos 30, porém a técnica realmente só tomou impulso nos anos 70 (Carvalho, 1999), quando começou a ser utilizada principalmente na área de melhoramento genético e para micropropagação. Trata-se de uma forma de

reprodução assexuada, fundamentada na totipotência das células vegetais, em que se utilizam explantes da espécie vegetal os quais, por meio de divisões celulares induzidas por hormônios vegetais e fitorreguladores, produzem grande quantidade de indivíduos, genética e fenotipicamente idênticos (Haberlandt apud Krikorian e Berquam, 1969). Pode ser conduzida pela proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta, e por embriogênese somática. A embriogênese somática permite a formação de embriões somáticos pela via direta e indireta (Williams & Maheswaran, 1986). A via indireta é constituída de duas fases, primeiro ocorre a formação da calogênese seguida do desenvolvimento de embriões somáticos a partir do calo. Na via direta, os embriões somáticos são formados em uma única fase, porém sem calos (Williams & Maheswaran, 1986; von Arnold et al., 2002).

Para a maioria das espécies, em geral, o controle da calogênese está associado ao balanço entre os reguladores de crescimento de planta auxinas e citocininas (Jimenez, 2005). Dentre as auxinas, a mais frequentemente utilizada é o ácido diclorofênoxicético (2,4 D) e, em relação às citocininas, a mais empregada é o 6-benzilaminopurina (BAP). Porém, não existe uma concentração ideal destes reguladores de planta para induzir a formação de calo, esta pode variar conforme a espécie, o tipo de explante, a idade do tecido, entre outros fatores.

Além das áreas de melhoramento e micropropagação, a cultura de tecidos é também uma ferramenta extremamente útil para estudar mudanças no metabolismo secundário, uma vez que fornece um ambiente totalmente controlado com relação a fatores químicos e físicos. As informações obtidas a partir de estudos básicos com este tipo de modelo biológico também permitem a manipulação de sistemas enzimáticos e rotas biossintéticas visando uma produção mais eficiente de metabólitos de interesse (Ramachandra e Ravishankar, 2002; Oksman-Caldentey e Inzé, 2004).

Apesar do custo maior de manutenção, as culturas de células e tecidos vegetais apresentam certas vantagens em relação ao cultivo de plantas no campo e em casas de vegetação, cuja produção depende de certos fatores, como clima, suscetibilidade a agentes patogênicos, má adaptação para crescer em monoculturas densas, requisitos específicos de fertilizantes e agroquímicos, logística e questões regulatórias para a implantação no campo de plantas geneticamente modificadas. As culturas de células têm um potencial ilimitado de crescimento e regeneração de plantas. Além disso, as células vegetais são biologicamente totipotentes, assim cada célula é potencialmente capaz de produzir uma gama de

substâncias químicas encontradas na planta mãe, criando uma fonte contínua de produtos naturais (Thorpe, 2007 e Matsuura et al. 2017). As condições de crescimento, como temperatura, pH, qualidade e quantidade de luz, fitohormônios, aeração, agitação, imobilização, bem como a composição do meio, são estritamente controladas, mas podem ser manipuladas para otimizar a produção dos metabolitos desejados (Fischer et al. 2015).

Além das alterações na composição nutritiva do meio de cultura e das condições de cultivo, diversas estratégias também podem ser adotadas para aumentar a produção dos metabolitos de interesse, como por exemplo, pelo uso de técnicas de elicitação, imobilização e permeabilização das culturas (Pavlov et al. 2005; Ochoa-Villarreal et al. 2016). Um "elicitador" pode ser definido como uma substância que inicia ou melhora a biossíntese de compostos específicos quando introduzido em pequenas concentrações. Os elicitores podem ser classificados com base em sua "natureza" como abióticos (choque osmótico, íons de metais pesados, sais inorgânicos, jasmonato, ácido salicílico, óxido nítrico, alterações de temperatura ou radiação UV e visível) ou bióticos (inoculação de bactérias, fungos) e com base em sua "origem" como exógenos ou endógenos (Ramirez-Estrada et al. 2016). A estimulação da produção de taxol por culturas de suspensão de células de *Taxus* é um exemplo de sucesso do uso de elicitação (Mirjalili e Linden, 1996)

Este tipo de modelo tem se mostrado bastante promissor para pesquisas de produção de metabolitos secundários *in vitro*, visto que permite uma rápida proliferação celular, possibilitando a realização de estudos sobre regulação e modulação de vias metabólicas e até de rotas de biossíntese de determinado metabolito secundário, sob condições controladas. A adição de um metabolito precursor às culturas celulares também é uma técnica útil para tal propósito, embora haja sempre o risco de ativar uma inibição por feedback em algum outro lugar da via (Bolwell et al. 1986).

1.5. Estudos com *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*

Estudos químicos e biológicos vem sendo realizados com ambas as espécies englobando diferentes abordagens, como descrição morfoanatômica, avaliação da estabilidade de extratos hidroalcoólicos, controle de qualidade de fitoterápico, avaliação da composição química sazonal e variações nas condições de cultivo. Em estudos de composição química e estabilidade dos extratos com estas espécies verificou-se a presença frequente de cumarina e ácido clorogênico em amostras destas plantas, com acúmulo majoritário de cumarina em *M. laevigata* e do ácido clorogênico em *M. glomerata* (esta, em alguns

tratamentos, apresentou baixíssimas concentrações de cumarina), sugerindo-se estas duas substâncias como marcadores químicos (Melo, 2013).

Em estudos quanto ao perfil químico frente à variação das condições de cultivo (indução de dano mecânico e luminosidade) e de sazonalidade, concluiu-se que a diferença entre as duas espécies de guaco é muito maior que a diferença entre tratamentos, sugerindo-se, portanto que a variação na composição química delas pode ser reflexo de diferenças intrínsecas na via de biossíntese dos fenilpropanóides, em particular cumarina para *M. laevigata* e ácido clorogênico para *M. glomerata* (Almeida et al. 2017). Além disso, em discrepância com o que se encontra amplamente divulgado na literatura, a presença de cumarina em *M. glomerata* foi muita baixa, quando não, inexistente e se a atividade farmacológica do guaco é atribuída a esta substância, o uso desta espécie como fonte para fabricação de fitoterápico seria ineficaz. Ainda, mesmo que o efeito terapêutico observado para o guaco seja resultado do sinergismo das moléculas biossintetizadas pela planta, como a composição entre elas é distinta, uma delas seria mais adequada para uso.

Pesquisas bibliográficas mostram que estudos químicos com extratos de *M. laevigata* e *M. glomerata* são abundantes (Gasparetto et al, 2010; Rufatto et al, 2012), mas não existem muitos trabalhos que comparem as rotas biossintéticas desses metabólitos secundários nestas plantas medicinais. Como as diferenças químicas entre as espécies pode ser resultado de diferenças intrínsecas, compreender as diferenças na modulação da via biossintética dos fenilpropanóides entre as espécies poderá auxiliar a determinar a mais adequada para ser empregada como insumo em produtos usados como recurso terapêutico e medicamento fitoterápico e assim garantir maior qualidade, eficácia e segurança aos produtos derivados de *Mikania*.

Portanto, com o estudo proposto busca-se uma abordagem multidisciplinar, propondo-se investigar a cultura de tecido e células de duas espécies de *Mikania* como modelo biológico para estudo da rota de biossíntese dos fenilpropanóides, especificamente da cumarina e ácido clorogênico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo geral investigar o emprego da cultura de células e de tecidos vegetais como modelo biológico aplicado ao estudo da via de biossíntese de cumarina e de ácido clorogênico em *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*.

2.2. Objetivos Específicos

I- Estabelecer culturas de calos e suspensões celulares de *M. glomerata* e *M. laevigata* e investigar seu uso como modelo biológico.

II- Verificar a resposta da adição de diferentes componentes da via de biossíntese dos fenilpropanóides (cumarina, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, fenilalanina) às suspensões celulares através de análise da composição química dos extratos brutos em EtOH 70%, empregando-se UHPLC-MS.

3. Material e Métodos

3.1. Cultura de tecidos e células

3.1.1. Material Vegetal

O material vegetal foi coletado de plantas de *M. glomerata* e *M. laevigata* mantidas em casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp (latitude – 22.818 439; longitude – 47.064 721). Estes exemplares são provenientes de mudas do campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp – CPQBA – Unicamp (Paulínia – SP) cujas exsiccatas foram depositadas no Herbário UEC da Universidade Estadual de Campinas sob registro nº 102046 para a *M. laevigata* e nº 102047 para a *M. glomerata*.

Para evitar que variações genéticas entre indivíduos da mesma espécie interferisse nos resultados, todas as mudas de cada espécie foram obtidas por estaqueamento a partir das matrizes descritas acima. Tanto a parte semilenhosa como a parte apical dos ramos foram utilizadas para confecção das estacas. As estruturas foram cortadas na porção superior e extremidade inferior em forma de bisel (Lima et al., 2003a; b) de tal forma que todas as estacas possuísem aproximadamente 12 cm de comprimento, dois nós e pelo menos duas folhas inteiras por estaca (Lima et al., 2003b; Boeger, Alquini e Negrelle, 2004). Em seguida foram colocadas em caixas com vermiculita de granulação média e mantidas em casa de vegetação com irrigação periódica por nebulização (3 vezes ao dia por 10 minutos) e 50% de luminosidade.

Após o período de enraizamento, as estacas foram avaliadas quanto ao seu desenvolvimento, selecionando-se as mais saudáveis e com características padronizadas para o plantio nos vasos. Foram utilizados vasos de 1,0 litro, contendo uma mistura de terra comum e substrato orgânico (MO) 50:50%. Para o tratamento de solo foram utilizados diferentes substratos minerais tais como cálcio, manganês, potássio, ferro, zinco, cobre e fósforo. Antes da coleta de material vegetal (folhas) todas as mudas permaneceram nos vasos com terra por 20 dias na mesma estufa com nebulização, para sua completa recuperação de eventuais danos sofridos durante o transplante.

3.1.2. Assepsia e preparo dos explantes

Os explantes para indução de calos foram obtidos a partir do limbo de folhas do 3º e 4º pares de *M. glomerata* e *M. laevigata*. Após a coleta, as folhas foram lavadas com água corrente e tratadas com Benlate a 1% (fungicida-antisséptico, Sigma) por 40 minutos. Em seguida, esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, sob agitação, por 60 minutos, seguido de três lavagens em água destilada. Os explantes foram cortados em quadrados de aproximadamente 0,5 cm², descartando-se a nervura central e margens da folha, e colocados com a face abaxial voltada para baixo em frascos de vidro contendo meio de cultura semi-sólido.

3.1.3. Meio de cultura

O preparo dos meios de cultura em todos os experimentos consistiu na dissolução dos sais básicos MS (Murashige e Skoog, 1962) em água destilada e deionizada. O meio foi suplementado com 30 g.L⁻¹ sacarose (Aldrich), e os reguladores de crescimento de plantas 4,52 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D Sigma) e 26 µM de 6-benzilaminopurina (BAP, Sigma). O pH foi ajustado para 5,8, adicionou-se Phytigel a 0,3 % (Sigma) e o meio foi autoclavado a 121°C, a 1,3 atm, por 15 minutos.

Testes com diferentes concentrações de reguladores de crescimento foram realizados para selecionar a melhor condição para a indução de calos de ambas espécies (Tabela 1). As concentrações dos reguladores variaram de 0,5 a 3 mg.L⁻¹ de meio de cultura. Os critérios para a escolha do meio foram: baixo crescimento radicular; indução rápida dos calos e friabilidade.

Tabela 1. Diferentes combinações de concentração de ácido diclorofenoxiacético e 6-benzilaminopurina empregadas para indução de calos em ambas espécies de guaco.

Concentração dos Reguladores de Crescimento							
Combinação	2,4 D (mg.L ⁻¹)				BAP (mg.L ⁻¹)		
	0,5	1	2	3	1	2	3
A		X			X		
B		X				X	
C		X					X
D			X		X		
E			X			X	
F			X				X
G				X	X		
H				X		X	
I				X			X
J	X				X		
K	X					X	
L	X						X

3.1.4. Manutenção das culturas

Os calos foram mantidos no escuro em câmara fechada a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e sub-cultivados em meio novo a cada 30 dias, quando os calos já haviam crescido a ponto de cobrir toda a superfície do meio de cultura. A partir de 45 dias, caso não fosse feito o subcultivo das culturas, os calos apresentavam sinais de oxidação, com uma coloração escura.

Como a contaminação é um problema recorrente em trabalhos realizados com cultura de tecidos, todas as etapas de manipulação das culturas, como indução de novos calos, subcultivo de calos e suspensões celulares e montagem de ensaios, foram realizados em um fluxo laminar, a fim de se manter as células em condições estéreis.

3.1.5. Suspensão celular

Calos friáveis obtidos por embriogênese somática indireta de lâminas foliares jovens foram utilizados para a realização da suspensão celular. As células foram inoculadas em 50 ml de meio MS líquido, o mesmo meio utilizado para a indução de calos, sem adição de Phytigel e com uma concentração de sacarose de 50 g.L^{-1} . Estas foram mantidas em erlenmeyers de 125 ml e mantidos em um shaker a 120rpm, no escuro a 25°C .

As suspensões celulares foram multiplicadas através de subcultivos a cada 15 dias para *M. glomerata* e 20 dias para *M. laevigata*. Os agregados que se formavam eram descartados, sendo selecionados apenas agregados pequenos de células e com coloração clara.

3.2. Curvas de Crescimento das células em suspensão

Os ensaios para a realização da curva de crescimento foram montados em erlenmeyers de 125ml, com uma quantidade inicial de 1 g de massa fresca de células em 30 ml de meio de cultura MS líquido. As amostras foram coletadas em triplicata (cada frasco de suspensão celular correspondendo a uma repetição) a cada cinco dias até o 60º dia. O crescimento foi medido através da determinação da massa seca das células, e posteriormente foi feita análise do perfil químico dos extratos hidroalcoólicos dessas células por UHPLC-MS.

3.3. Tratamentos

As células em suspensão de cada espécie de *Mikania* foram divididas em cinco grupos de tratamentos. Em cada tratamento foi adicionado ao meio de cultura uma das cinco substâncias da via de biossíntese de fenilpropanóides: cumarina, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico e fenilalanina. As cinco substâncias foram solubilizadas em água deionizada. Dentro de cada tratamento, as suspensões celulares foram ainda divididas em sub-grupos, com adição de diferentes concentrações do analito. Além disso, as coletas ocorreram em dois tempos distintos, após cinco e dez dias de tratamento. O grupo controle consistiu em suspensões celulares em que não foi adicionado nenhuma das substâncias da via biossintética estudada.

O ensaio foi montado em frascos de 125 ml contendo 3g de células em 30 ml de meio MS líquido, que foram mantidos no escuro, em shaker a 120rpm. Para cada tratamento foram selecionadas células de mesma linhagem e que tivessem sido subcultivadas no mínimo cinco vezes, para aumento de biomassa e para que pudessem se habituar ao meio, antes da montagem do experimento. Os tratamentos foram montados de forma que cada sub-grupo, incluindo o grupo controle, fosse realizado em triplicata (cada frasco de suspensão celular correspondendo a uma repetição).

Pela análise do perfil químico UHPLC-MS de calos de *M. glomerata* e *M. laevigata* com 20 dias de subcultivo, procedeu-se a determinação das concentrações endógenas das cinco substâncias adicionadas ao meio de cultura e definição da dose aplicada às suspensões celulares.

3.4. Identificação e quantificação das substâncias da via biossintética

Calos e células das suspensões foram coletados e mantidos em freezer a -80°C . O meio líquido das suspensões celulares também foi coletado e congelado para futuras análises. O material congelado foi seco em liofilizador, e após medição da massa seca, foram submetidas a extração conforme descrito por Celeghini, Vilegas e Lanças (2001), com modificações. Foram feitas três extrações em etanol 70% (3ml de solvente para cada 100 mg de massa celular seca) no ultrassom por 30 minutos. Cada extração foi analisada separadamente por UHPLC-MS para verificar o número de extrações necessárias para retirada total dos metabólitos das células. As análises dos cromatogramas mostraram que três extrações foram necessárias para esgotar o material. As amostras foram então concentradas em SpeedVac, solubilizadas em 1 ml de etanol 70% e filtradas para análise.

A análise para identificação e quantificação dos produtos da via de biossíntese foi feita através de UHPLC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, empregando metodologia descrita por Melo (2013) para identificação das substâncias separadas.

As condições cromatográficas, incluindo os solventes, sistema de eluição gradiente, volume de extrato injetado, temperatura de coluna e os parâmetros do espectrômetro de massas utilizados foram realizados de acordo com Melo (2013). Assim, alíquotas de $4\ \mu\text{L}$ de cada amostra foram injetadas em Cromatógrafo UPLC® Acquity da Waters provido de uma coluna C18BEH Acquity Waters ($1,7\ \mu\text{m} \times 2,1\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$) acondicionada em forno à 30°C . A eluição por gradiente, com fluxo de $200\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$, utilizando como fase móvel A- água purificada (Milli-Q) com 0,1 % de ácido fórmico e como fase móvel B- acetonitrila (grau cromatográfico), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Gradiente otimizado para análise por UHPLC-MS. Fase móvel A- água purificada (Milli-Q) com 0,1 % de ácido fórmico e fase móvel B- acetonitrila

Tempo (min)	% fase móvel A	% fase móvel B
Inicial	90	10
4,00	75	25
8,00	0	100
8,50	0	100
8,51	90	10
10,00	90	10

Foi utilizado um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar (TQD-Acquity da Waters), com ionização por eletrospray (ESI) realizando varredura em modo positivo e modo negativo nas seguintes condições: capilar de ± 3000 V, cone de ± 35 V, extrator de 1,0 V, temperatura da fonte de 150°C e temperatura de dessolvatação de 300°C.

Os cromatogramas em modo positivo e negativo foram analisados para detectar diferenças na composição química de cada espécie de *Mikania* (Tabela 3). Para determinar a concentração de cumarina, ácido clorogênico (sinonímia de ácido 5-cafeoilquínico), ácido *p*-cumárico e ácido *o*-cumárico nas amostras foram feitas curvas de calibração utilizando-se soluções metanólicas com diferentes concentrações de cada metabólito (anexos). Devido à falta de uma solução padrão do ácido dicafeoilquínico, a sua quantificação foi realizada utilizando a mesma curva de calibração para o ácido 5-cafeoilquínico.

Tabela 3. Tempo de Retenção e massa molecular dos íons de compostos da via dos fenilpropanóides para estudo do perfil químico de amostras de *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*.

	Tempo de Retenção (min)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
<i>Cumarina</i>	5,02	147	-
<i>Ácido 5-cafeoilquínico</i>	1,90	-	353
<i>Ácidos dicafeoilquínicos</i>	4,2 e 4,6	-	515
<i>Ácido p-cumárico</i>	3,27	-	163
<i>Ácido o-cumárico</i>	4,69	-	163

3.5. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média de 3 repetições (\pm desvio padrão). Diferenças estatísticas entre controle e tratamentos foram determinados via *one-way* ANOVA seguidos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Já comparações entre tempos de coleta (cinco e dez dias), dentro de um mesmo tratamento foram feitas via teste *t*.

As análises assim com a representação gráfica dos resultados foram feitas no programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 7.00, San Diego, CA).

4. Resultados

4.1. Estabelecimento das culturas de tecidos e células vegetais

Iniciou-se o estabelecimento de cultura de calos e de células em suspensão de ambas as espécies a fim de utilizá-las como modelo biológico para estudo da biossíntese de fenilpropanóides em guaco. Dentre as combinações de reguladores de crescimento de plantas (Tabela 1), a que resultou na formação de calos friáveis foi a combinação L para as duas espécies de *Mikania* estudadas (Figuras 5 e 6). Concentrações de auxina superiores às de citocinina levaram ao desenvolvimento de raízes nas duas espécies, como exemplificado na Figura 5B, para *M. glomerata*. Já concentrações de citocinina muito maiores que 3 mg.L^{-1} de meio de cultura, levaram ao desenvolvimento de massas celulares não friáveis. Foi estabelecido, portanto, que as melhores condições para a indução de calos para essas duas espécies de *Mikania* são $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e 3 mg.L^{-1} de BAP.

Quando o calo atingia tamanho superior a 3 cm de diâmetro e era friável, procedia-se com a sua transferência para o meio de cultura líquido para obtenção das culturas celulares. As células foram inoculadas em 50 ml de meio MS líquido com os mesmos suplementos, porém foi observado que o fato de aumentar a concentração de sacarose no meio para 50 g.L^{-1} favoreceu o crescimento das suspensões celulares. As culturas foram mantidas em um shaker a 120rpm, no escuro a 25°C e subcultivadas a cada 15 dias para *M. glomerata* e 20 dias para *M. laevigata* (Figuras 5C e 6B, respectivamente).

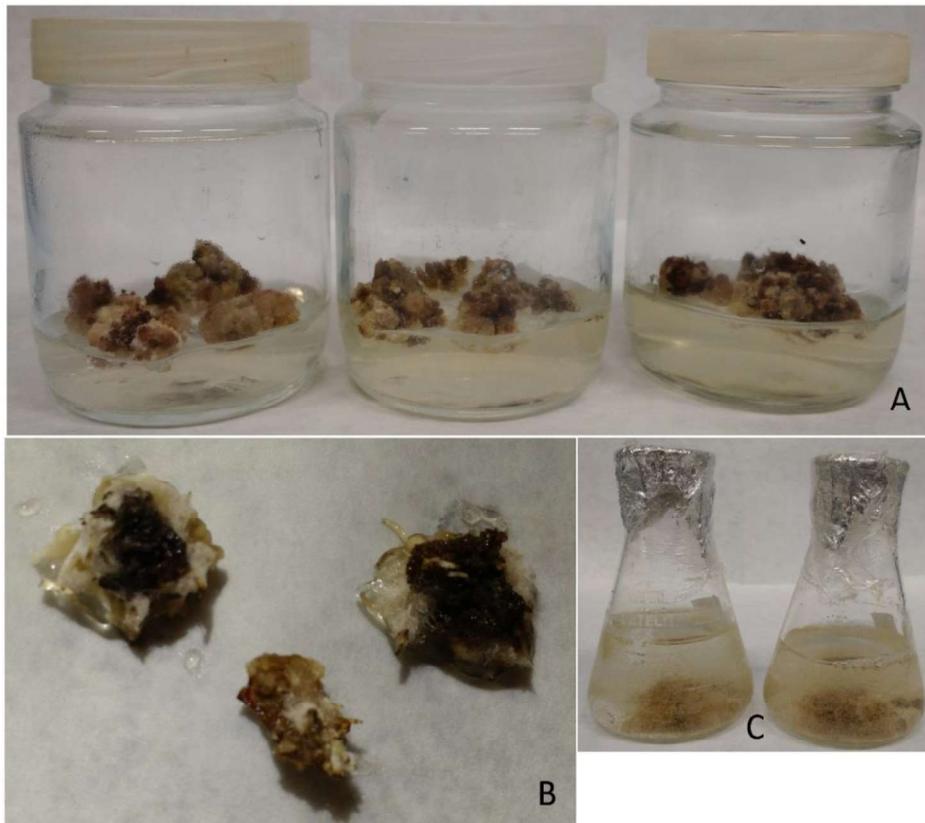


Figura 5. Cultura de calos de *Mikania glomerata* (A). Formação de raízes nas culturas (B). Suspensões celulares de *Mikania glomerata* (C).

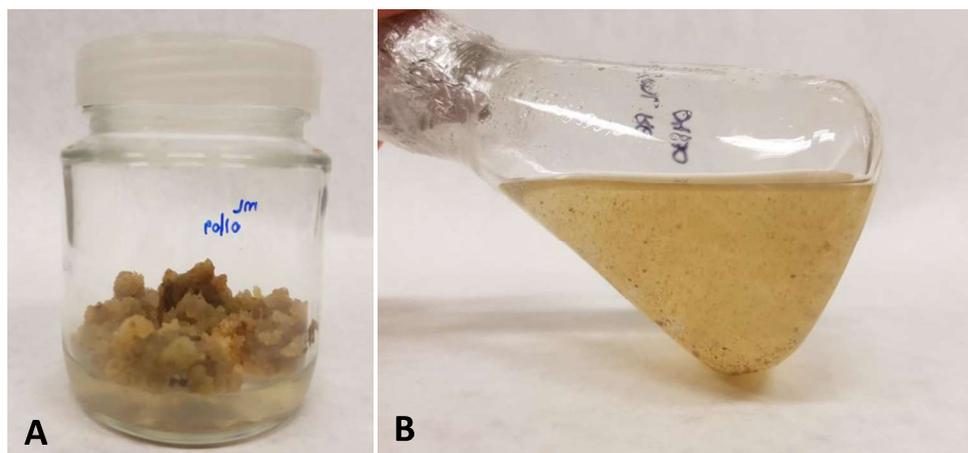


Figura 6. Cultura de calos de *Mikania laevigata* (A). Suspensões celulares de *Mikania laevigata* (B).

4.2. Identificação e quantificação das substâncias da via biossintética em calos de *Mikania*

A análise para identificação e quantificação dos produtos da via de biossíntese foi feita empregando a UHPLC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, segundo metodologia descrita por Melo e Sawaya (2015) para identificação dos analitos. A determinação das concentrações endógenas das substâncias da via de biossíntese de fenilpropanóides (cumarina, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico e ácido *o*-cumárico) foi feita a partir das equações das retas obtidas por progressão linear para a curva de calibração de cada uma das substâncias analisadas (Anexos). Para isso foram inicialmente analisados calos de *M. glomerata* e *M. laevigata* com 20 dias de subcultivo e com cerca de quatro meses de manutenção a partir do estabelecimento das culturas.

A análise dos cromatogramas dos extratos de calos com 20 dias de subcultivo não detectou a presença de cumarina em ambas as espécies (quantidade encontrada estava abaixo do limite mínimo de detecção do método) e a presença de ácido 5-cafeoilquínico foi detectada somente em *M. glomerata*. Também não foi possível detectar ácido *o*-cumárico e *p*-cumárico nas amostras de nenhuma das duas espécies. Na Figura 7 observa-se os cromatogramas de uma das amostras de *M. glomerata*, nos quais é possível notar a presença do pico para o ácido clorogênico no tempo de retenção 1,81 min (Figura 7A, análise em modo negativo) e ausência para a cumarina (Figura 7B, análise em modo positivo). Neste momento, também foi detectada a presença de ácido dicafeoilquínico em células de calo de *M. glomerata*.

A quantificação de ácido 5-cafeoilquínico foi feita a partir de uma curva de calibração $y = 43425x + 497893$ ($R^2 = 0,9955$) onde “y” representa a área dos picos e “x” a concentração de ácido 5-cafeoilquínico ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). A concentração calculada para ácido 5-cafeoilquínico nos calos de *M. glomerata* foi de $31,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca.

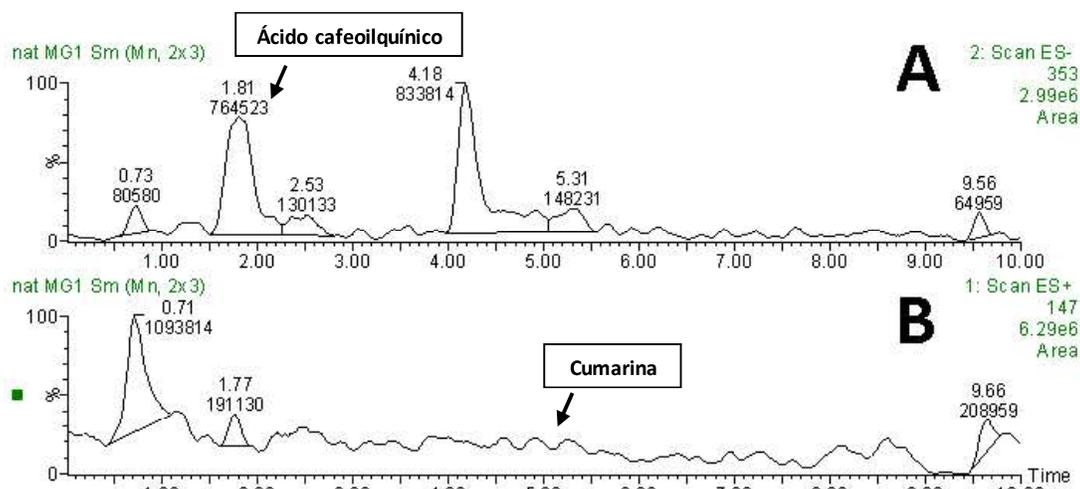


Figura 7. Cromatograma UHPLC-MS no modo negativo (A) e no modo positivo (B) do extrato dos calos com 20 dias de subcultivo de *Mikania glomerata*.

Decorridos cerca de dois anos de manutenção das culturas de calos de *M. laevigata* e *M. glomerata*, com subcultivo a cada 30 dias, foi realizada novamente a extração e análise do perfil químico de calos desta espécie, com 15, 30 e 60 dias de subcultivo. Dessa vez, ácido 5-cafeoilquínico, ácido dicafeoilquínico e cumarina foram encontrados em amostras das duas espécies. Na Figura 8 observa-se os cromatogramas de uma das amostras de calos de *M. laevigata* com 30 dias de subcultivo, nos quais nota-se a presença do pico para o ácido 5-cafeoilquínico no tempo de retenção 1,90 min (A, análise em modo negativo) e o pico para a cumarina no tempo 5,09 min (B, análise em modo positivo).

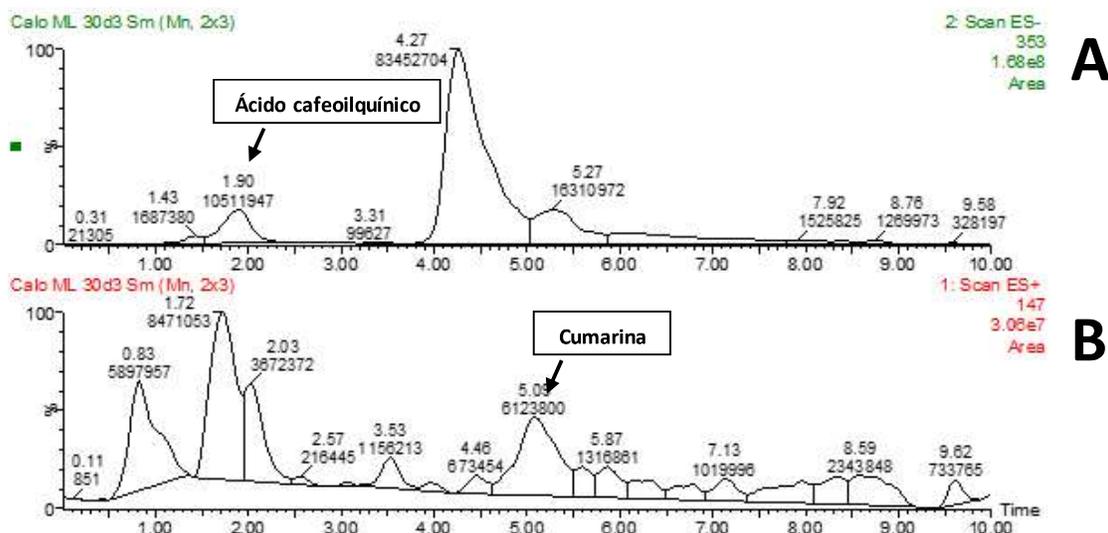
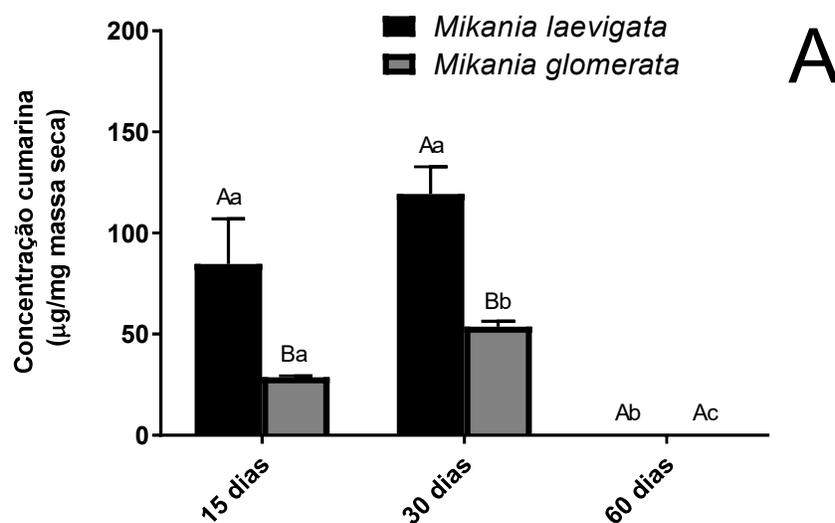


Figura 8. Cromatograma UHPLC-MS no modo negativo (A) e no modo positivo (B) do extrato dos calos com 30 dias de subcultivo de *Mikania laevigata*.

As concentrações das substâncias foram calculadas a partir da curva de calibração: $y=7E-07x+4,0877$; $R^2 = 0,9937$ para cumarina e $y = 3E-05x + 3,7642$; $R^2 = 0,987$, para os ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico (Anexos). Comparando-se o acúmulo de cumarina nos extratos de calos de *M. laevigata* e *M. glomerata* (Figura 9A), nota-se que os valores de cumarina em *M. laevigata* são maiores do que os encontrados em *M. glomerata*, o que é condizente com o encontrado nas plantas de origem dos explantes. Em relação aos tempos de coleta, há um pequeno aumento na concentração dessa substância entre amostras de *M. glomerata* após 15 e 30 dias de subcultivo, já em *M. laevigata* não há uma diferença significativa entre as amostras desse período. Após 60 dias observa-se um decréscimo total da concentração de cumarina nas duas espécies, não sendo detectada em nenhuma das amostras.

Os resultados para o ácido 5-cafeoilquínico (Figura 9B), mostram que a concentração após 15 dias de subcultivo é semelhante entre as duas espécies. Contudo, após 30 dias as espécies apresentam comportamentos distintos. Enquanto *M. laevigata* apresenta uma concentração constante da substância ao longo do tempo, as amostras de 30 e 60 dias de *M. glomerata* apresentam concentrações significativamente maiores do que em 15 dias. O mesmo comportamento é observado na quantificação do ácido dicafeoilquínico (Figura 9C). Em *M. laevigata* as concentrações desse ácido permaneceram estáveis ao longo do tempo, enquanto em calos *M. glomerata*, as concentrações de ácido dicafeoilquínico aumentaram gradativamente ao longo dos três períodos estudados.



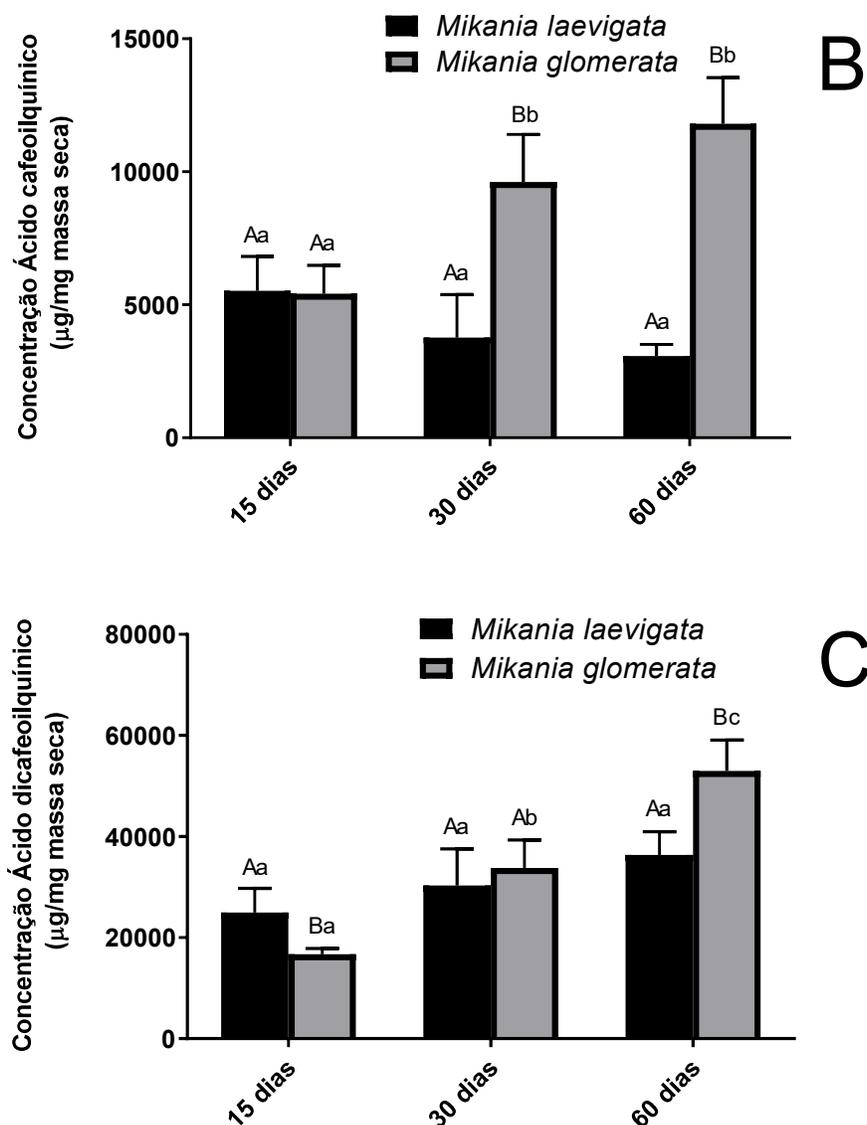


Figura 9. Quantificação de cumarina, m/z 147 (A), ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (B), ácido dicafeoilquínico m/z 515 (C) em calos de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*, coletados após 15, 30 e 60 dias de subcultivo. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre espécies, dentro do mesmo tempo de coleta (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes períodos de coleta em uma mesma espécie (one way ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

4.3. Curvas de Crescimento das suspensões celulares

Curvas de crescimento de suspensões celulares apresentam uma fase de adaptação, uma fase exponencial e uma fase estacionária. Nas curvas de crescimento obtidas de suspensões celulares de guaco foram observadas as duas primeiras fases, contudo não se identifica uma

fase estacionária (Figura 10). Os picos máximos de biomassa ocorrem no 15º dia em *Mikania glomerata* e no 25º dia em *Mikania laevigata*. Após esse crescimento, nota-se um comportamento oscilatório da biomassa celular das suspensões celulares, principalmente em células de *M. glomerata* (Figura 10A), revelando picos de massa a cada 10 dias, aproximadamente. Já a curva de *M. laevigata* apresenta somente dois picos, um no 25º e outro no 35º (Figura 10B).

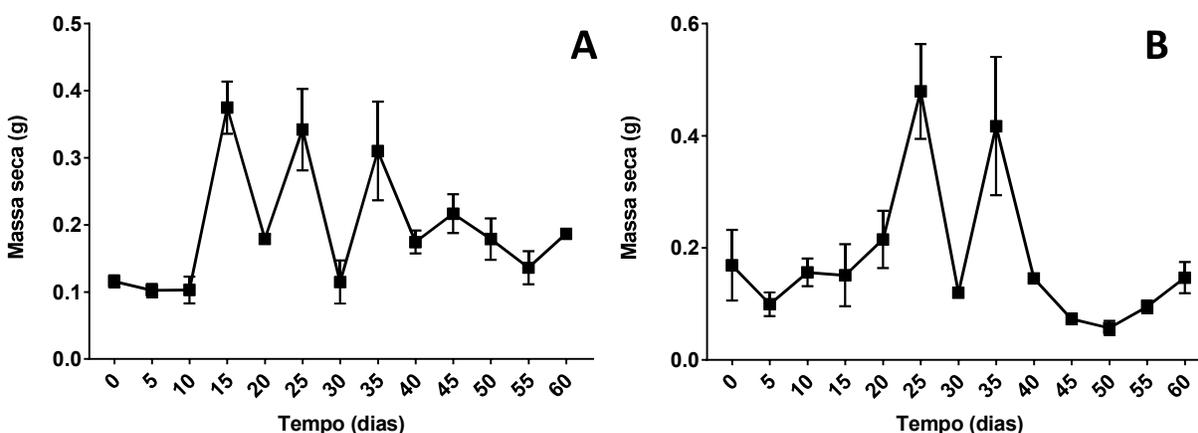


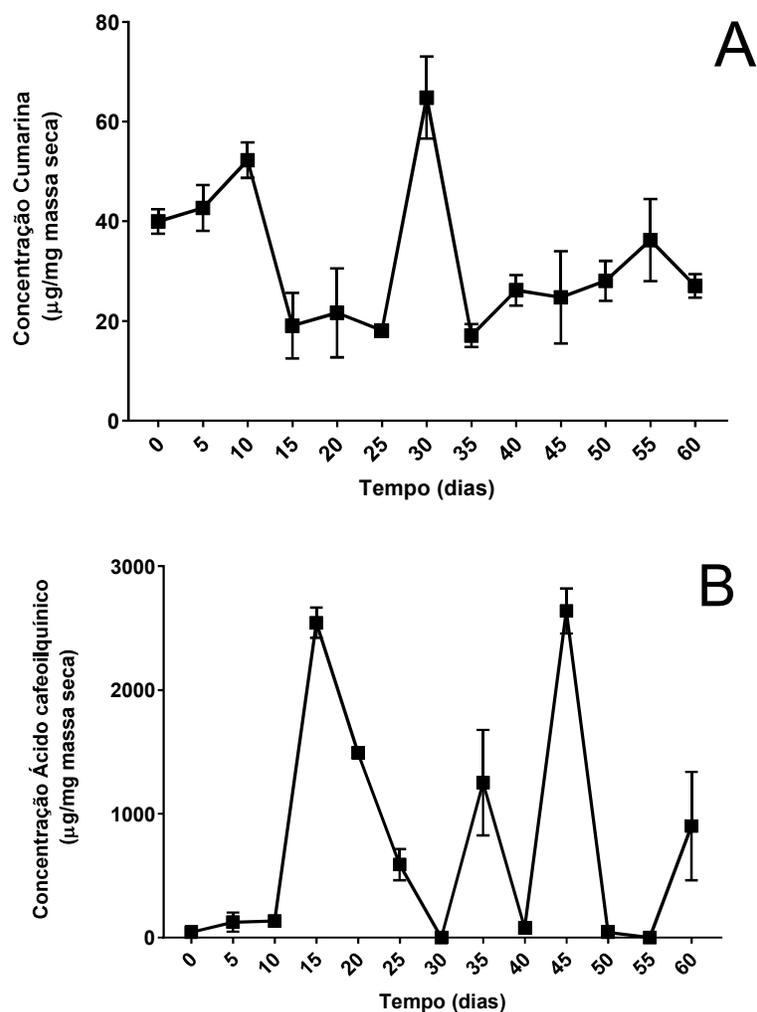
Figura 10. Curvas de crescimento de suspensões celulares de *Mikania glomerata* (A) e *Mikania laevigata* (B). Valores da massa seca em gramas. Média de três repetições (\pm desvio padrão).

Além de fornecer informações sobre o crescimento em biomassa das suspensões celulares, esse ensaio também permitiu a análise de perfil químico das células de *Mikania glomerata* ao longo de 60 dias (Figura 11). O cálculo da quantificação dos compostos principais da curva de crescimento de *M. glomerata* por UHPLC-MS foi realizado utilizando as equações $y=7E-07x+4,0877$ ($R^2 = 0,9937$) para cumarina e $y = 3E-05x+3,7642$ ($R^2 = 0,987$) para ácido clorogênico (Anexos).

Observa-se que a concentração inicial de cumarina em *M. glomerata* (Figura 11A) nas células já é alta no dia zero, com uma média de $39,98 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca. Esse número cresce até um pico em 10 dias de cultivo, para em seguida decrescer e se manter em aproximadamente $20 \mu\text{g.g}^{-1}$ entre 15 e 25 dias. A cumarina tem sua máxima concentração em 30 dias, com uma concentração de $64,84 \mu\text{g.g}^{-1}$. Depois de cair novamente, os níveis de cumarina parecem se estabilizar entre $20 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $35 \mu\text{g.g}^{-1}$ até o fim do período estudado de 60 dias.

Os gráficos para os dois ácidos clorogênicos investigados são muito semelhantes (Figura 11 B-C), com uma concentração inicial baixa dos dois compostos pelos primeiros 10 dias. As concentrações crescem a partir de 15 dias e passam a formar picos a cada dez dias, em que os níveis desses metabólitos descem a níveis baixíssimos e depois voltam a aumentar. É interessante notar que todos os picos de concentração coincidem com picos de biomassa na curva de crescimento (Figura 10) O valor máximo para o ácido 5-cafeoilquínico foi encontrado em células com 45 dias de cultivo, uma média de $2,64 \text{ mg.g}^{-1}$ de massa seca, e para o ácido dicafeoilquínico o máximo ocorreu após 15 dias, com uma média de $8,52 \text{ mg.g}^{-1}$ de massa seca.

Não foram detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS em amostras de *M. glomerata*.



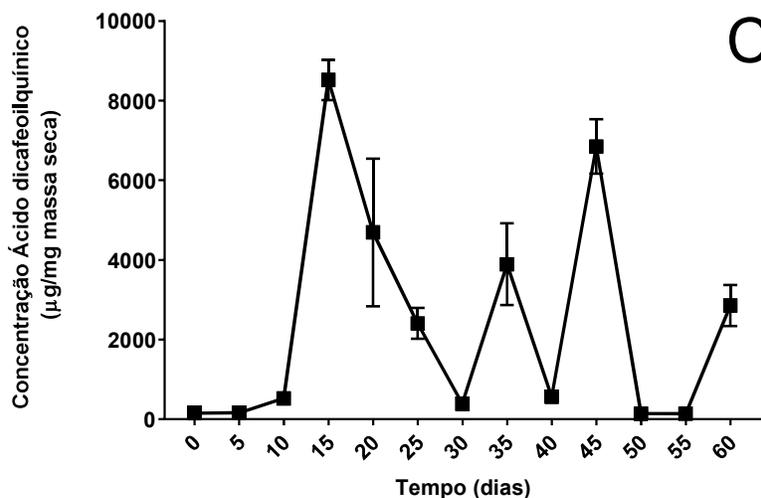


Figura 11. Quantificação de cumarina, m/z 147 (A), ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (B) e ácido dicafeoilquínico m/z 515 (C) em suspensões celulares de *Mikania glomerata* ao longo de 60 dias, com coleta a cada 5 dias. Média de três repetições (\pm desvio padrão).

A análise do perfil químico da curva de crescimento de *M. laevigata*, infelizmente, não identificou cumarina ou ácido clorogênico durante o intervalo de tempo investigado. Não foram igualmente detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras dessa espécie.

4.3. Tratamentos com células de *Mikania glomerata*

4.3.1. Ensaio Ácido Clorogênico

O ensaio com inoculação de ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) em culturas de células de *M. glomerata* foi o primeiro a ser realizado. Como determinado no item 4.2 que as células de calo de *M. glomerata* apresentaram uma concentração endógena de $31 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca, foi decidido realizar os tratamentos com cinco concentrações diferentes de ácido clorogênico: C1 = $31 \mu\text{g.g}^{-1}$, C2 = $170,5 \mu\text{g.g}^{-1}$, C3 = $310 \mu\text{g.g}^{-1}$, C4 = $1705 \mu\text{g.g}^{-1}$ e C5 = $3100 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca de células (Figura 12). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de ácido clorogênico.

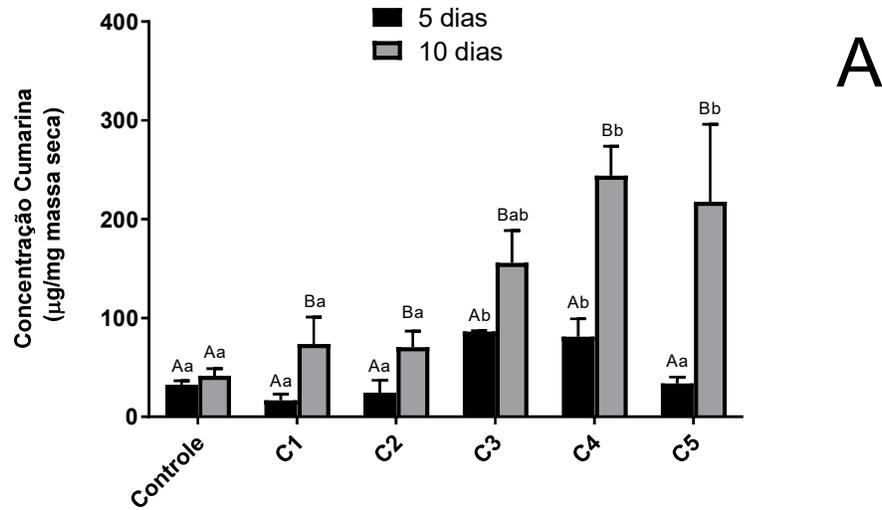
As análises por UHPLC-MS mostraram que no controle, em células coletadas após cinco dias e dez dias de cultivo, apresentaram uma concentração endógena de cumarina, $26,81$ e $41,39 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca de células, respectivamente (Figura 12A). Em relação aos tratamentos, os resultados mostram uma concentração estável de cumarina em células com cinco dias nos dois primeiros tratamentos, comparando-se com as amostras controle. O teor

de cumarina aumenta um pouco nos tratamentos C3 e C4, porém voltam aos valores basais no último tratamento. Já para células com 10 dias, as concentrações de cumarina também se mostraram estáveis até o tratamento C2 e a partir de C3 houve um aumento gradual na concentração dessa substância. Em média, foi verificado cerca de $217,50 \mu\text{g cumarina.g}^{-1}$ massa seca em células com a inoculação máxima de ácido clorogênico (C5) após 10 dias de tratamento, um valor 5,2 vezes maior do que a concentração do controle.

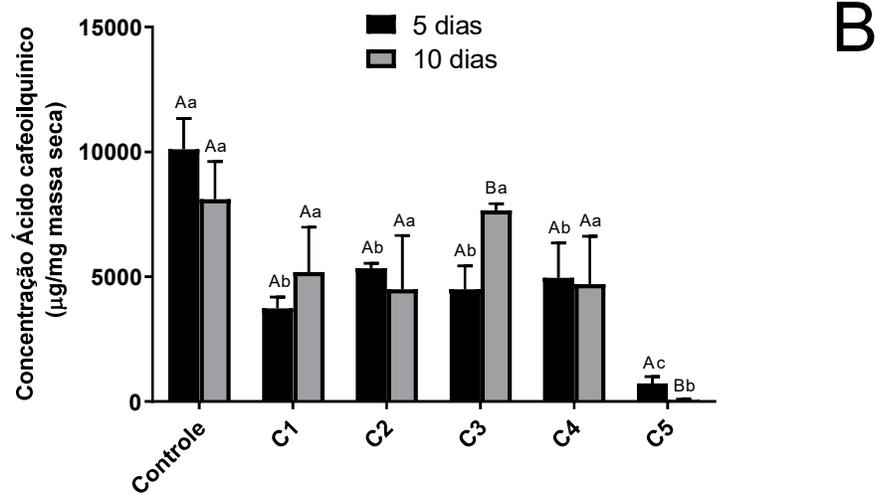
Nos resultados para o ácido 5-cafeoilquínico verificou-se, após cinco dias de ensaio, uma diminuição significativa nos níveis desse metabólito em todos os tratamentos, quando comparado ao controle, contudo houve uma queda particularmente expressiva da concentração endógena dessa substância no último tratamento, C5 (Figura 12B). Em dez dias de tratamento, a diminuição significativa do ácido 5-cafeoilquínico só foi observada quando as suspensões foram expostas a concentrações extremamente altas do próprio ácido clorogênico, no tratamento C5.

Já para o ácido dicafeoilquínico, observa-se dois comportamentos distintos entre os diferentes períodos de coleta (Figura 12C). Em 5 dias, observa-se uma concentração basal alta do analito no controle e sua diminuição nos tratamentos, principalmente no último tratamento (C5). Já em 10 dias de tratamento, a concentração no controle é 4 vezes menor do que o encontrado no controle com 5 dias. Assim, é possível observar um efeito positivo no teor de ácido dicafeoilquínico em células do tratamento C3. Contudo, o efeito volta a ser negativo em células tratadas com altas doses de ácido clorogênico, como pode ser notado no tratamento C5, em que a concentração de ácido dicafeoilquínico chega próximo a zero.

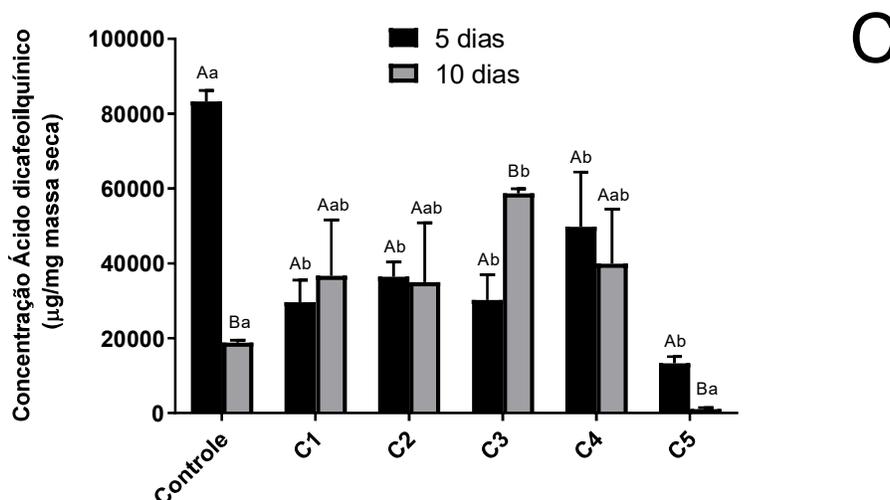
Não foram detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 12. Quantificação de cumarina, m/z 147 (A), ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (B), ácido dicafeoilquínico m/z 515 (C) em suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias. C1, C2, C3, C4 e C5 correspondem às concentrações de ácido clorogênico iguais a 31; 170,5; 310; 1705 e 3100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

4.3.2. Ensaio Cumarina

Para o ensaio com cumarina em suspensões celulares de *M. glomerata* foram realizados tratamentos utilizando três concentrações de cumarina adicionado ao meio de cultura: C1 = 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, C2 = 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca e C3 = 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca (Figura 13). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de cumarina.

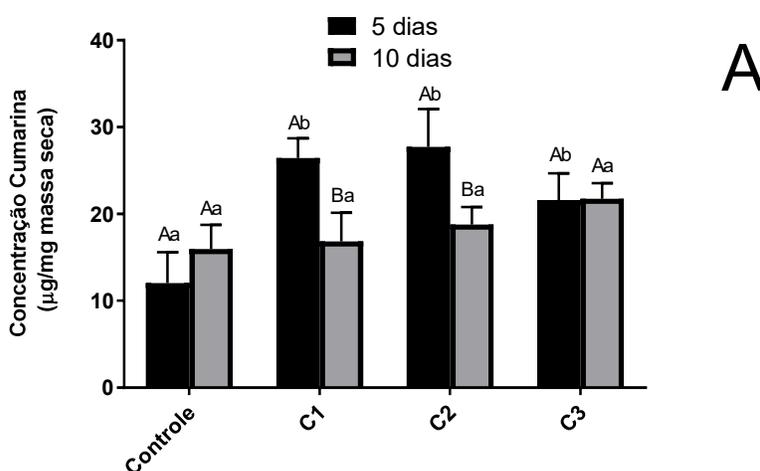
Os resultados indicam que os tratamentos com cumarina aumentaram significativamente a concentração endógena da substância em suspensões com cinco dias, em relação ao controle. O mesmo não ocorreu com as células em suspensão coletadas após dez dias de experimento, pois a concentração de cumarina se manteve constante entre o grupo controle e os grupos tratados (Figura 13A).

Já a concentração de ácido 5-cafeoilquínico (Figura 13B) destas células em um primeiro momento aumentou, como visto para as células coletadas em cinco dias dos tratamentos C1 e C2, em relação ao controle. Porém, essas concentrações voltam aos níveis basais no

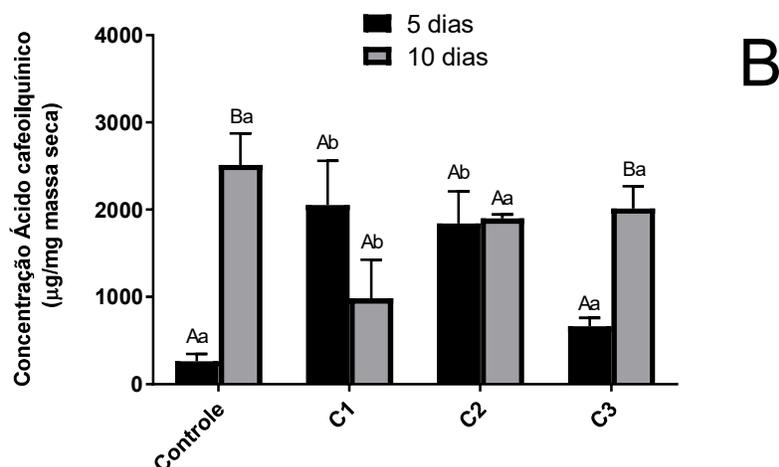
último grupo tratado, C3. Para as células de 10 dias de tratamento a produção basal desse ácido clorogênico no controle já era bastante alta, em comparação com o controle de cinco dias, e os tratamentos com cumarina parecem afetar negativamente a concentração de ácido 5-cafeoilquínico no tratamento C1, porém novamente retornam aos níveis do controle nos tratamentos C2 e C3.

De maneira semelhante ao observado com os níveis de ácido 5-cafeoilquínico nos primeiros cinco dias, os tratamentos com adição de cumarina aumentam bastante o teor endógeno de ácido dicafeoilquínico (Figura 13C) no tratamento C1, porém esse aumento não é tão expressivo nos tratamentos C2 e C3, apesar dos valores do composto serem maiores que no controle. Para as células com dez dias a produção basal do metabólito no controle também já era bastante alta, comparado aos valores encontrados no controle de cinco dias. Somente o tratamento com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cumarina parece afetar de maneira negativa os níveis de ácido dicafeoilquínico, que voltam aos níveis normais nos tratamentos C2 e C3.

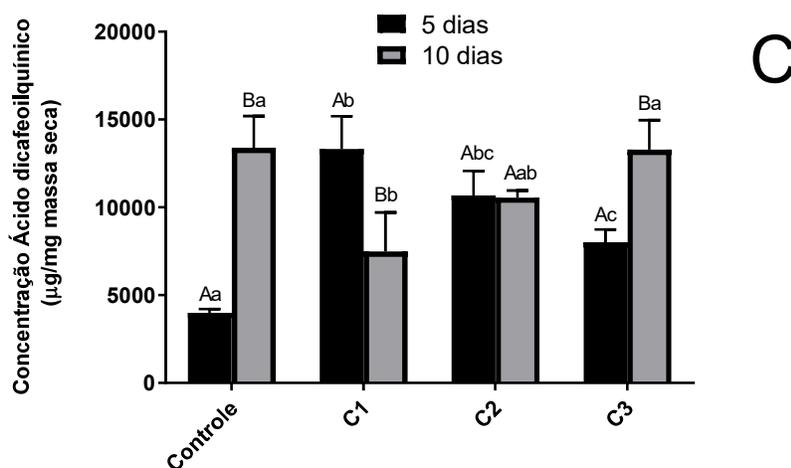
Não foram detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de cumarina por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de cumarina por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de cumarina por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 13. Quantificação de cumarina, m/z 147 (A), ácido 5-cafeoilquínico m/z 353 (B), e ácido dicafeoilquínico, m/z 515 (C) nas suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de cumarina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de cumarina iguais a: $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca e $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (one way ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

Além dos analitos principais da via de biossíntese em estudo, notou-se a partir do primeiro tratamento com adição de cumarina o aparecimento de um pico no tempo de retenção 2,87 min, que não havia sido observado no controle (figura 14). O componente majoritário encontrado no espectro de massas apresentava uma m/z 327. A fim de tentar identificar esta

substância desconhecida foi realizado um LC-MS/MS. Os principais fragmentos identificados apresentavam m/z 121 m/z 147 e m/z 165 (Figura 15) e, por comparação com os resultados reportados por Yang et al. (2007), sugere-se que esse metabólito seja o diidromelilotosídeo.

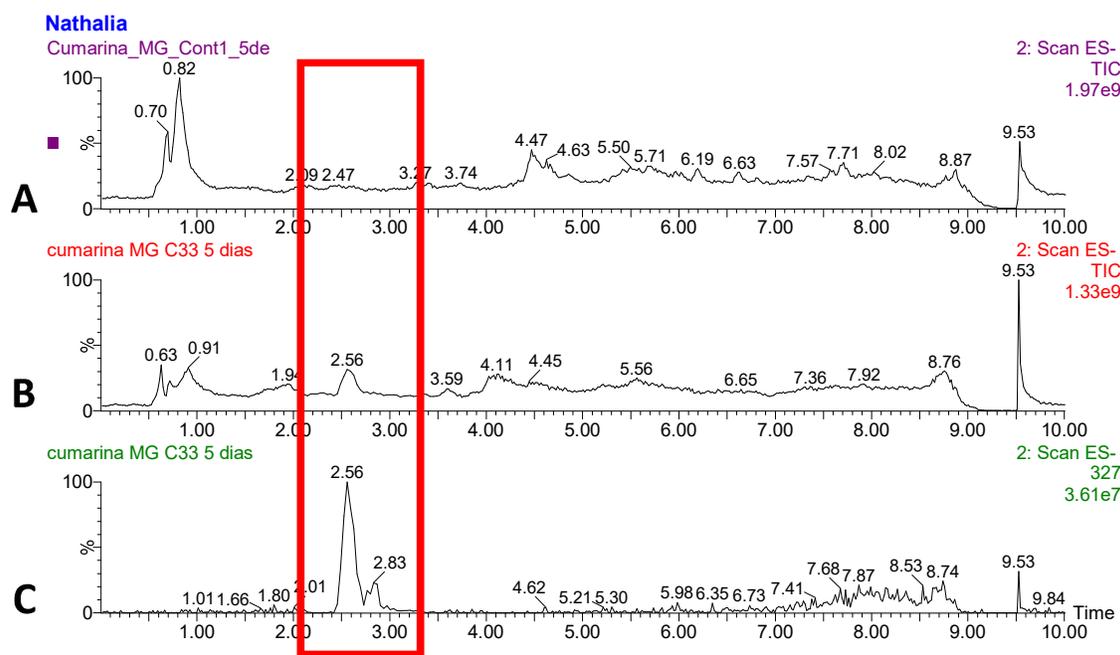


Figura 14. Cromatograma UHPLC-MS no modo negativo de extratos de suspensões celulares de *Mikania glomerata*, do grupo controle (A) e de células tratadas com 100 µg de cumarina por grama de massa fresca, tratamento C3 (B) e cromatograma selecionado para o íon m/z 327 (C).

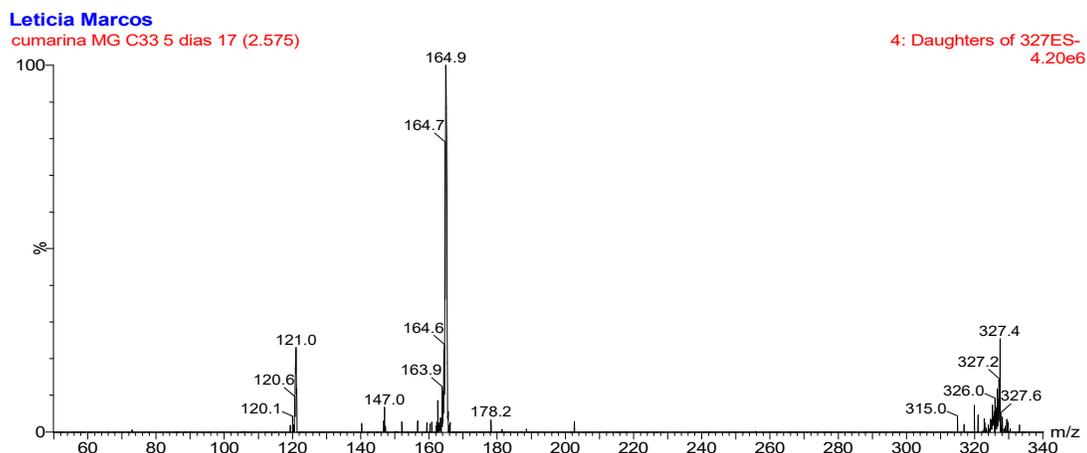


Figura 15. Espectro de massas, modo negativo, com os fragmentos obtidos por LC-MS/MS da substância de m/z 327 encontrado em células de *Mikania glomerata* tratadas com 100 µg de cumarina por grama de massa fresca.

A substância foi quantificada indiretamente, utilizando-se uma curva de calibração para o ácido *o*-cumárico como padrão ($y=8E-06x-0,7016$; $R^2 = 0,9977$) (Anexos). Os resultados mostraram que há um aumento expressivo dos níveis desse metabólito nas suspensões celulares de *M. glomerata* sob concentrações crescentes de cumarina no meio de cultura, tanto em cinco quanto em dez dias de tratamento (Figura 16).

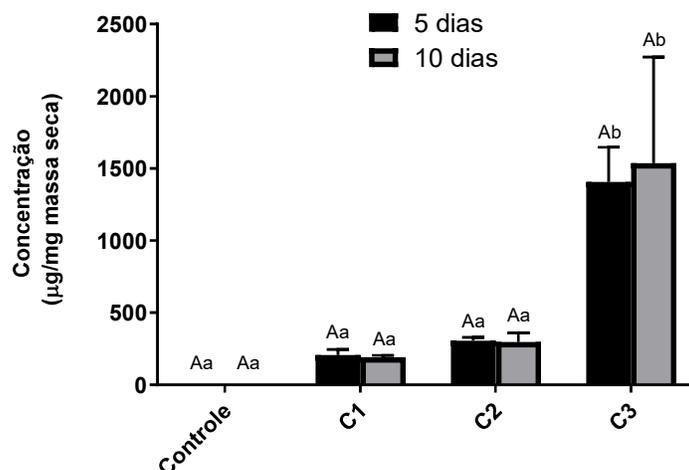


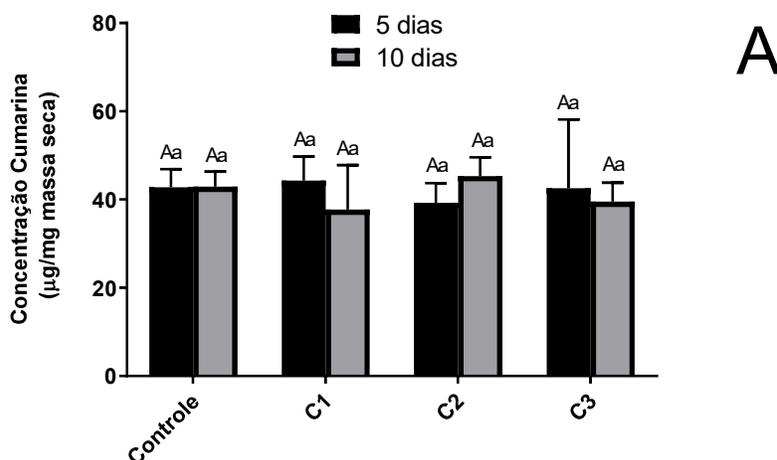
Figura 16. Quantificação da substância de m/z 327 e tempo de retenção 2,57 min em suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de cumarina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de cumarina iguais a $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca e $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

4.3.3. Ensaio Fenilalanina

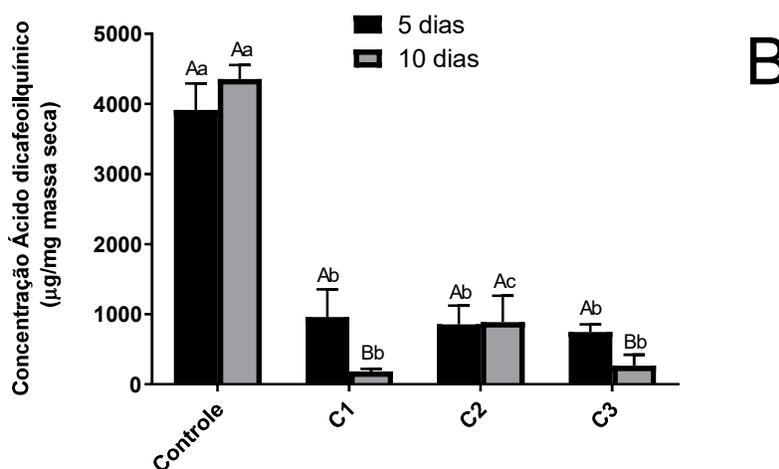
Como não foi possível quantificar a concentração endógena deste metabólito foram estabelecidas três concentrações arbitrárias para a montagem do experimento de 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM (Tratamentos C1, C2 e C3, respectivamente). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de fenilalanina.

Apesar de ser o precursor de toda a via dos fenilpropanóides, a adição de fenilalanina não alterou de maneira significativa os níveis de cumarina em nenhum dos tratamentos em comparação com o grupo controle (Figura 17A). Já as concentrações de ácido dicafeoilquínico diminuíram consideravelmente em todos os tratamentos com relação aos valores encontrados nos grupos controle, tanto em cinco quanto em dez dias de experimento (Figura 17B). O ácido 5-cafeoilquínico foi detectado em todos os tratamentos e no controle, mas não pode ser quantificado.

Não foram detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de fenilalanina por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de fenilalanina por 5 e 10 dias de cultivo

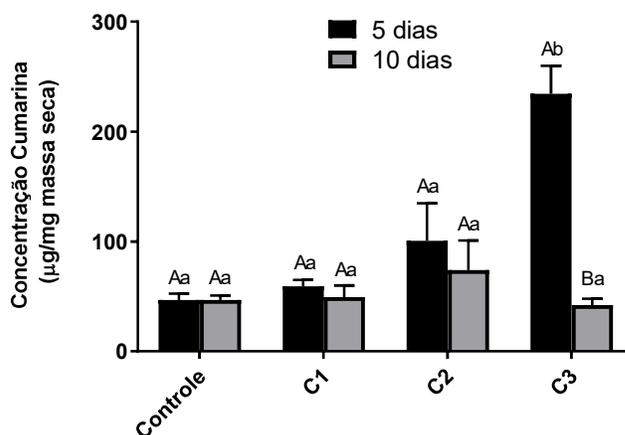
Figura 17. Quantificação de cumarina, *m/z* 147 (A) e ácido dicafeoilquínico, *m/z* 515 (B) nas suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de fenilalanina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de fenilalanina iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

4.3.4. Ensaio Ácido *o*-cumárico

Devido à baixa concentração nos calos, não foi possível calcular a produção endógena de ácido *o*-cumárico nas células de *M. glomerata*. Portanto, o volume inoculado no meio para os tratamentos foi o mesmo definido para fenilalanina anteriormente: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM (Tratamentos C1, C2 e C3, respectivamente). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de ácido *o*-cumárico.

Como esperado, a alta disponibilidade de *o*-cumárico, precursor da cumarina, aumentou a biossíntese deste metabólito em quase cinco vezes em relação ao grupo controle, nos primeiros cinco dias de tratamento. Após 10 dias essa alta concentração de cumarina no último tratamento não é mais observada, mostrando que a mobilização na rota para a produção de cumarina é rápida e não se mantém a longo prazo (Figura 18). Já os níveis de ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico não apresentaram resposta ao tratamento de ácido *o*-cumárico.

Não foram detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 18. Quantificação de cumarina, m/z 147 em suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *o*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

Além dos analitos principais da via de biossíntese em estudo, notou-se novamente o aparecimento de um pico, desta vez no tempo de retenção 2,87 min, que não havia sido observado no controle (Figura 19). O espectro de massas indica como componente majoritário uma substância de m/z 325 e, em menor quantidade, uma substância de m/z 327 (Figura 20). Assim como no tratamento com cumarina, um LC-MS/MS foi feito para tentar identificar estes analitos e os principais fragmentos identificados apresentavam m/z 119 e m/z 163 (Figura 20), para m/z 325 e fragmentos de m/z 121 e m/z 147 e m/z 165, para m/z 327. Os espectros de fragmentação em conjunto com resultados reportados por Yang et al. (2007), por Mouton e Van der Kooy (2014) e por Costa et al. (2017) sugerem que estes metabólitos correspondam ao melilotosídeo para a substância de m/z 325 e diidromelilotosídeo para a substância de m/z 327.

A quantificação foi realizada por comparação, utilizando a curva de calibração para o ácido *o*-cumárico como padrão ($y = 200895x - 397903$; $R^2 = 0,9982$). As concentrações das substâncias só puderam ser calculadas para os extratos de células tratadas com 0,75 mM de *o*-cumárico. Células com cinco dias de tratamento continham 0,53 mg.g⁻¹ de massa seca de melilotosídeo e 0,22 mg.g⁻¹ de diidromelilotosídeo. Após dez dias, esse valor aumentou para o melilotosídeo, com concentração de 1,20 µg.g⁻¹, enquanto que para o diidromelilotosídeo a concentração permaneceu constante, com 0,22 µg.g⁻¹ de massa celular seca.

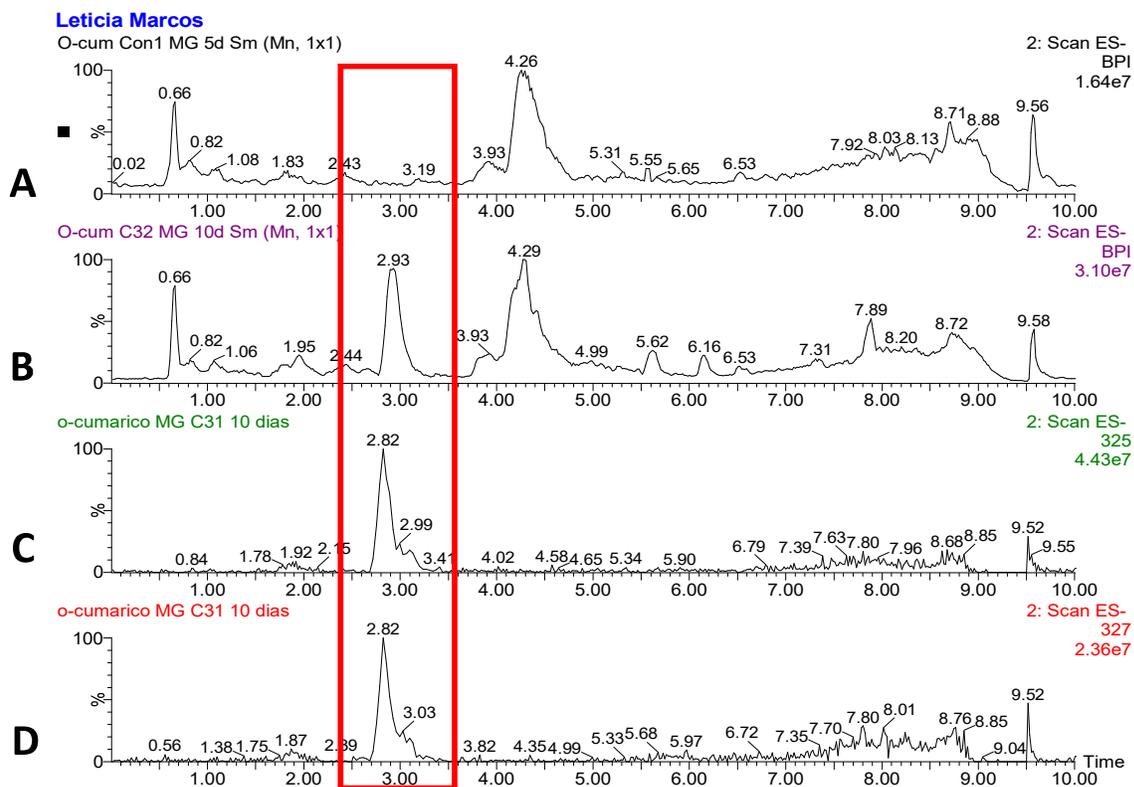


Figura 19. Cromatograma UHPLC-MS no modo negativo de extratos de suspensões celulares de *Mikania glomerata*, do grupo controle (A) e de células tratadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico, C3 (B) e cromatogramas selecionados para os íons m/z 325 (C) e m/z 327 (D).

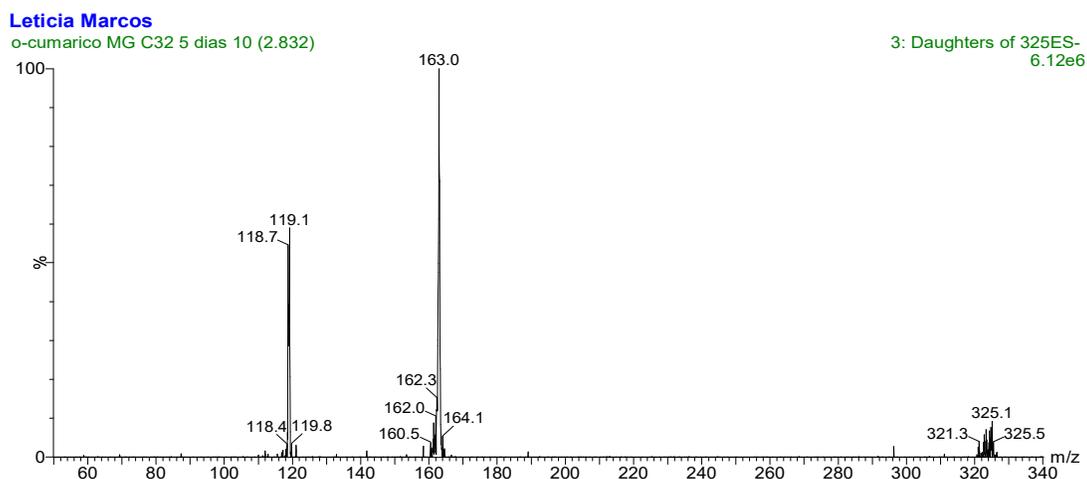


Figura 20. Espectro de massas, modo negativo, com os fragmentos obtidos por LC-MS/MS da substância de m/z 325 encontrado em células de *Mikania glomerata* tratadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico.

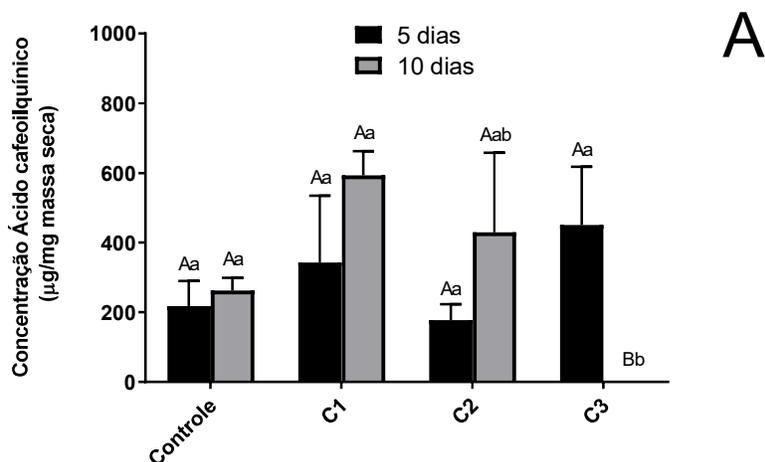
4.3.5. Ensaio Ácido *p*-cumárico

Devido à baixa concentração nos calos, não foi possível calcular a produção endógena de ácido *p*-cumárico nas células de *M. glomerata*. Portanto, o volume inoculado no meio para os tratamentos foi o mesmo definido para fenilalanina e ácido *o*-cumárico: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM (Tratamentos C1, C2 e C3, respectivamente) (Figura 21). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de ácido *p*-cumárico.

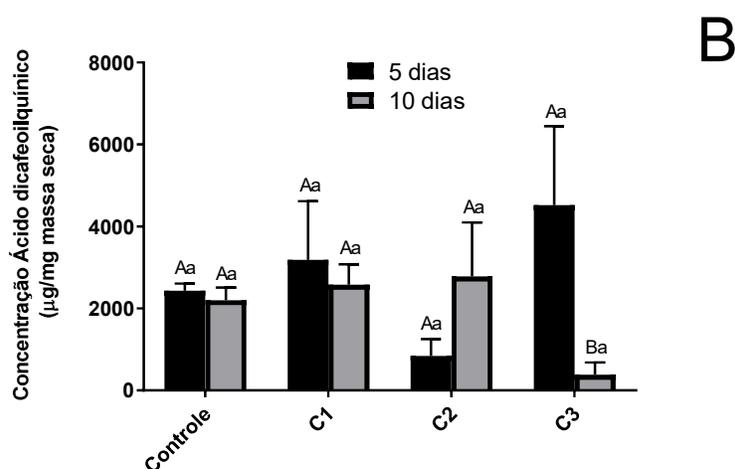
O ensaio com adição de ácido *p*-cumárico ao meio de cultura de células de *M. glomerata* não afetou significativamente o teor de ácido 5-cafeoilquínico das células tratadas com relação ao controle (Figura 21A). A única exceção se encontra no extrato de células tratadas com 0,75 mM de ácido *p*-cumárico e coletadas após dez dias de tratamento. Neste caso, o resultado sugere um efeito negativo na concentração de ácido 5-cafeoilquínico, uma vez que este não pode mais ser detectado pelo método UHPLC-MS.

Comparando com os dados das amostras do grupo controle, os resultados da concentração de ácido dicafeoilquínico nessas células também sugerem que o ácido *p*-cumárico não afetou os níveis desse analito de maneira significativa (Figura 21B). Contudo, mesmo não sendo estatisticamente distintos os resultados sugerem que as células tratadas do grupo C3 passaram por uma modulação negativa por parte do ácido *p*-cumárico nos níveis do ácido 5-cafeoilquínico em dez dias de tratamento, assim como ocorreu para o ácido 5-cafeoilquínico (Figura 21A).

Não foram detectados cumarina, ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. glomerata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 21. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, *m/z* 353 (A) e ácido dicafeoilquínico, *m/z* 515 (B) em suspensões celulares de *Mikania glomerata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *p*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *p*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

4.4. Tratamentos com células de *Mikania laevigata*

4.4.1. Ensaio Ácido Clorogênico

Como não foi possível quantificar as concentrações endógenas de ácido clorogênico nas análises preliminares com calos de *M. laevigata* com 20 dias de subcultivo, o ensaio com inoculação de ácido clorogênico em suspensões celulares dessa espécie foi realizado com

as mesmas concentrações utilizadas no ensaio com *M. glomerata*: C1 = 31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, C2 = 170,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, C3 = 310 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, C4 = 1705 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e C5 = 3100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca de células (Figuras 22 e 23). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de ácido clorogênico.

As análises pelo UHPLC-MS não detectaram ácido 5-cafeoilquínico no grupo controle nem no tratamento C1, com cinco dias de tratamento. Contudo, nos tratamentos C2, C3, C4 e C5 este foi detectado e pode ser quantificado, mantendo-se constante entre os quatro tratamentos (Figura 22). Após dez dias de experimento o analito não foi detectado no grupo controle ou nas células tratadas.

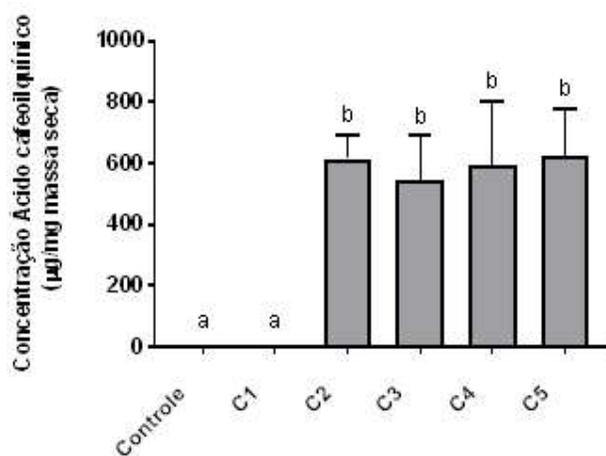


Figura 22. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353, em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa celular seca). C1, C2, C3, C4 e C5 correspondem às concentrações de ácido clorogênico iguais a 31; 170,5; 310; 1705 e 3100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ célula fresca, respectivamente. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (one way ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

O ácido dicafeoilquínico, por sua vez, foi detectado tanto nos grupos controle quanto nos grupos de células tratadas com ácido clorogênico (Figura 23). Primeiramente, observa-se que as concentrações desse metabólito no controle e no primeiro tratamento C1 são semelhantes nos dois períodos de coleta, mas a partir do tratamento C2 há uma mudança notável entre as células tratadas que foram coletadas em cinco e em dez dias. Após cinco dias da adição de ácido clorogênico há um aumento significativo do ácido dicafeoilquínico em células tratadas, principalmente no tratamento C2, em que o aumento foi cerca de sete vezes o valor encontrado no controle. Em dez dias de tratamento, por outro lado, os níveis

de dicafeoilquínico se mostraram estáveis em todos os tratamentos, mantendo-se semelhante ao encontrado no grupo controle.

A cumarina foi detectada em algumas amostras, porém não pode ser quantificada uma vez que estava abaixo do limite de quantificação. Não foram detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.

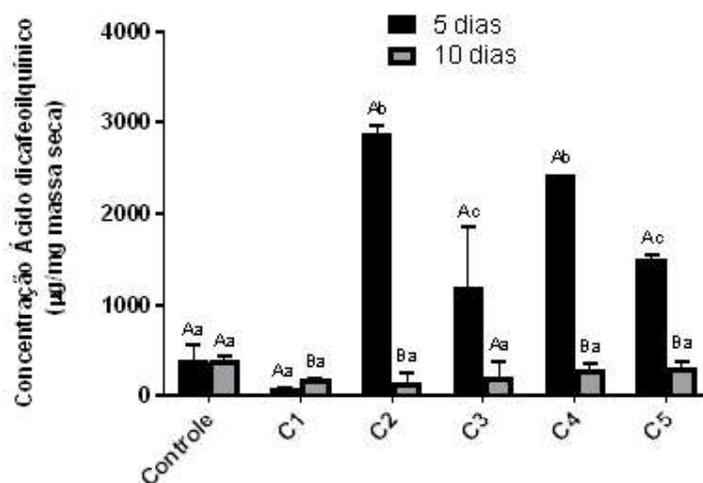


Figura 23. Quantificação de ácido dicafeoilquínico, *m/z* 515, em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido clorogênico por 5 e 10 dias ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa celular seca). C1, C2, C3, C4 e C5 correspondem às concentrações de ácido clorogênico iguais a 31; 170,5; 310; 1705 e 3100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ célula fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

4.4.2. Ensaio Cumarina

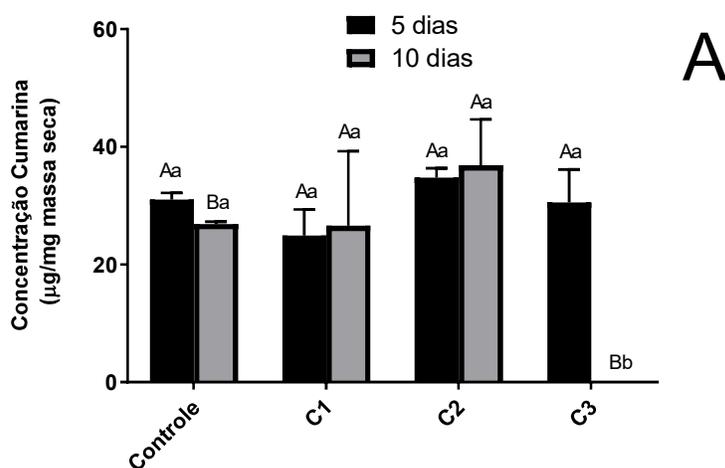
Novamente, não foi possível quantificar a concentração endógena do teor de cumarina em células de *M. laevigata* antes da montagem do experimento, portanto foram utilizadas as mesmas concentrações do ensaio com cumarina em células de *M. glomerata*: C1 = 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, C2 = 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca e C3 = 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca (Figura 24). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de cumarina.

O ensaio com adição de cumarina ao meio de cultura de células de *M. laevigata* não afetou significativamente o teor de cumarina endógena das células tratadas com relação ao controle (Figura 24A). A única exceção se encontra no extrato de células tratadas com 100

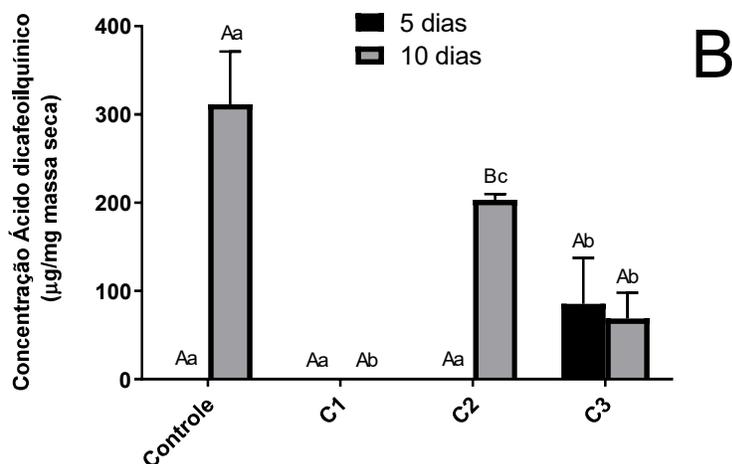
$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca (C3) e coletadas após dez dias de tratamento. Neste caso o metabólito não pode mais ser detectado pelo método UHPLC-MS, sugerindo um efeito negativo tardio na concentração de cumarina.

O ácido 5-cafeoilquínico não foi detectado em nenhum dos tratamentos ou no controle, tanto em cinco quanto em dez dias de tratamento. Já as concentrações de ácido dicafeoilquínico apresentaram um comportamento bastante diferente do visto até o momento nos tratamentos com células de guaco (Figura 24B). Em células coletadas com cinco dias de experimento este não foi encontrado no grupo controle ou nos tratamentos C1 e C2, enquanto no tratamento C3 o metabólito foi detectado, porém foi encontrado em baixíssima concentração. Em células com dez dias de tratamento, por sua vez, o ácido dicafeoilquínico está presente nas células do grupo controle. Em C1 ele deixa de ser detectado, mas volta a aparecer nos tratamentos C2 e C3.

Não foram detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de cumarina por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de cumarina por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 24. Quantificação de cumarina m/z 147 e ácido dicafeoilquínico m/z 515 em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com diferentes concentrações de cumarina por 5 e 10 dias ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa celular seca). C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de cumarina iguais a: 10 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, 20 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

Assim como em *M. glomerata*, notou-se a partir do primeiro tratamento com adição de cumarina o aparecimento de um pico no tempo de retenção 2,70 min, que não havia sido observado no controle (Figura 25). O composto majoritário encontrado no pico também apresentava uma m/z 327 e os fragmentos m/z 121, m/z 147 e m/z 165, identificados executando o método de LC-MS/MS (Figura 26). Novamente, com auxílio dos espectros de fragmentação (MS/MS) e comparação com os resultados reportados por Yang et al. (2007) sugere-se que este metabólito de m/z 327 seja o diidromelilotosideo.

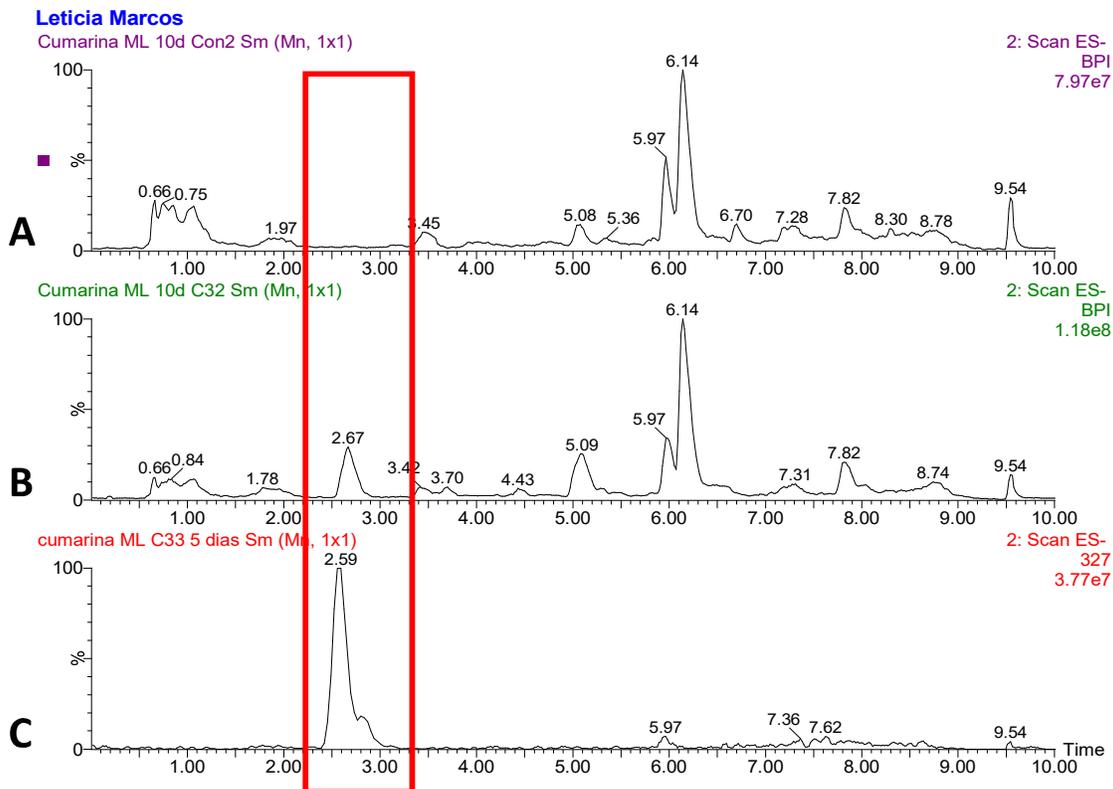


Figura 25. Cromatogramas UHPLC-MS no modo negativo de extratos de suspensões celulares de *Mikania laevigata*, do grupo controle (A) e de células tratadas com 100 μg de cumarina por grama de massa fresca, tratamento C3 (B) e cromatograma selecionado para o íon m/z 327 (C)

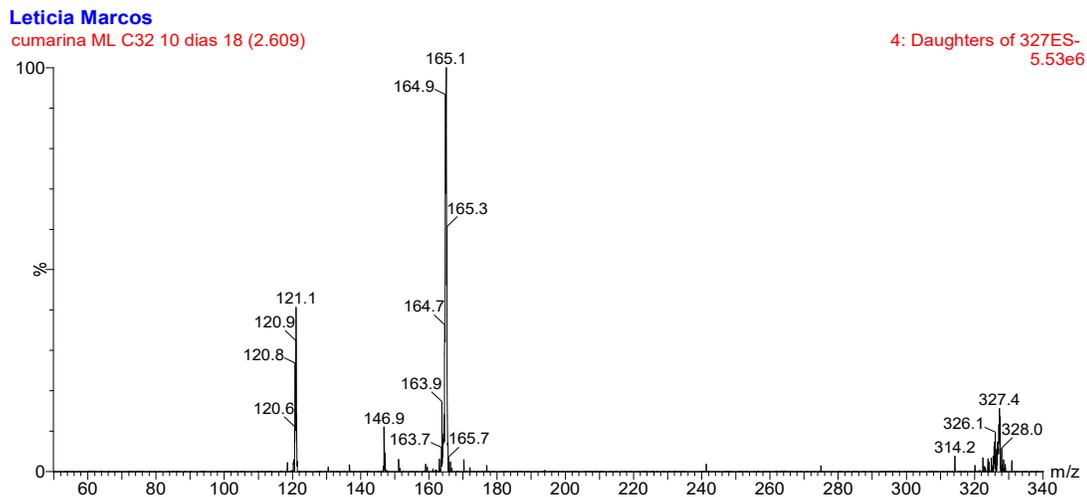


Figura 26. Espectro de massas, modo negativo, com os fragmentos obtidos por LC-MS/MS da substância de m/z 327 encontrado em células de *Mikania laevigata* tratadas com 100 μg de cumarina por grama de massa fresca.

O metabólito foi quantificado por comparação, utilizando-se a curva de calibração $y = 200895x - 397903$ ($R^2 = 0,9982$), calculada a partir de diferentes concentrações de soluções metanólicas de ácido *o*-cumárico, escolhido como amostra-padrão. Os resultados mostraram que há um aumento significativa no teor desse metabólito nas suspensões celulares de *M. laevigata* sob concentrações crescentes de cumarina no meio de cultura. Há também uma clara diferença entre as células coletadas em períodos distintos, em que grupos coletados após cinco dias apresentaram um teor maior da substância do que os grupos tratados por dez dias (Figura 27).

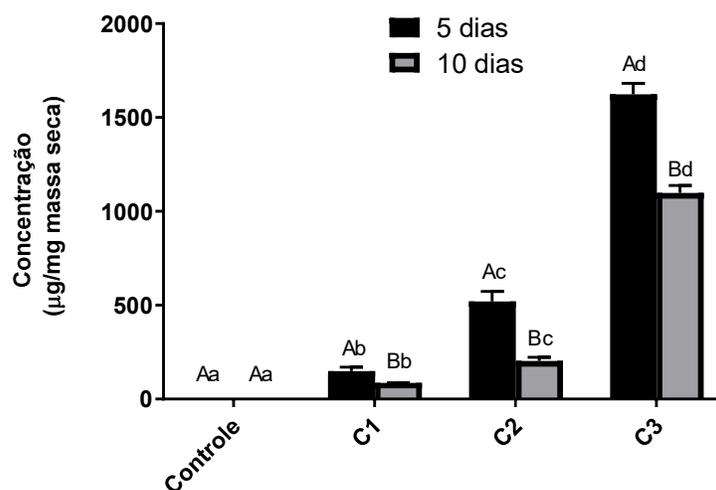


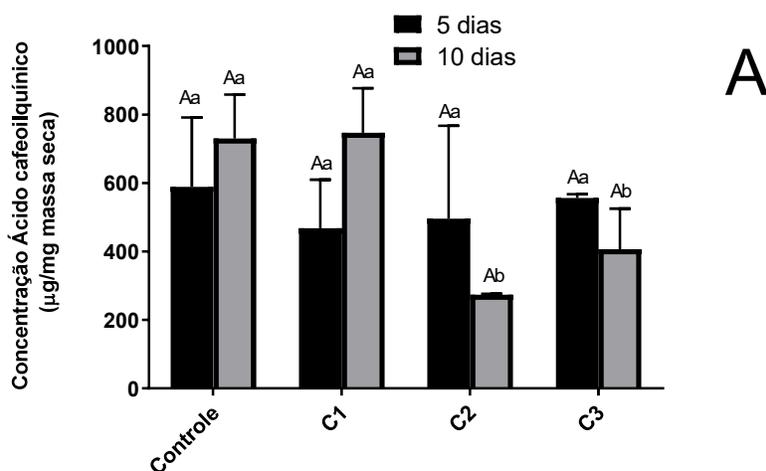
Figura 27. Quantificação da substância de m/z 327 e tempo de retenção 2,6 min nas suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de cumarina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de cumarina iguais a $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca e $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca, respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

4.4.3. Ensaio Fenilalanina

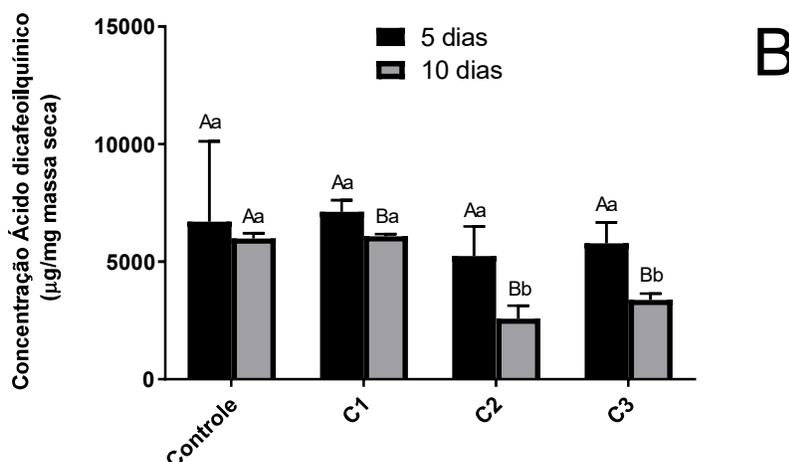
Como não foi possível quantificar a concentração endógena deste metabólito foram estabelecidas três concentrações arbitrárias para a montagem do experimento de 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM (Tratamentos C1, C2 e C3, respectivamente). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de fenilalanina.

Como em *M. glomerata* os resultados do ensaio com fenilalanina em células de *M. laevigata* também sugerem um efeito negativo desse metabólito nos níveis de ácido

clorogênico endógeno, porém o efeito não é tão forte quanto na outra espécie de guaco (Figura 28). Neste caso, o efeito é visto tanto nas concentrações de ácido 5-cafeoilquínico quanto de ácido dicafeoilquínico nos tratamentos C2 e C3, quando comparado com o controle, mas somente após dez dias de experimento.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de fenilalanina por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de fenilalanina por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 28. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (A) e ácido dicafeoilquínico, m/z 515 (B) nas suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de fenilalanina por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de fenilalanina iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (one way ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

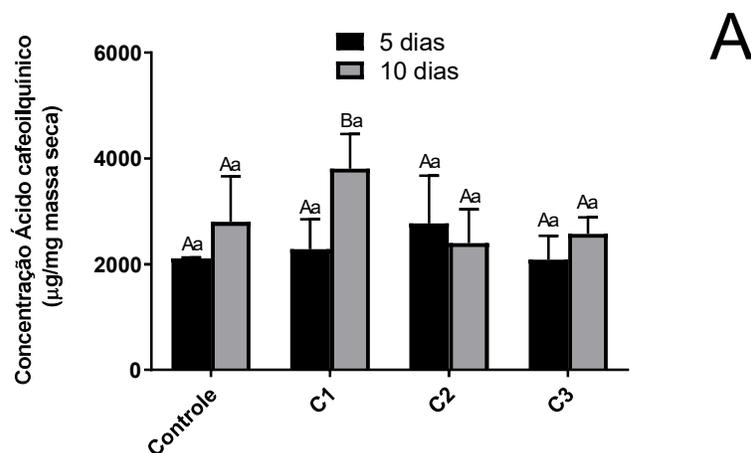
A cumarina foi detectada em algumas amostras de controle com dez dias de tratamento, porém suas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação e, por isso, não puderam ser calculadas. Além disso, não foram detectados ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.

4.4.4. Ensaio Ácido *o*-cumárico

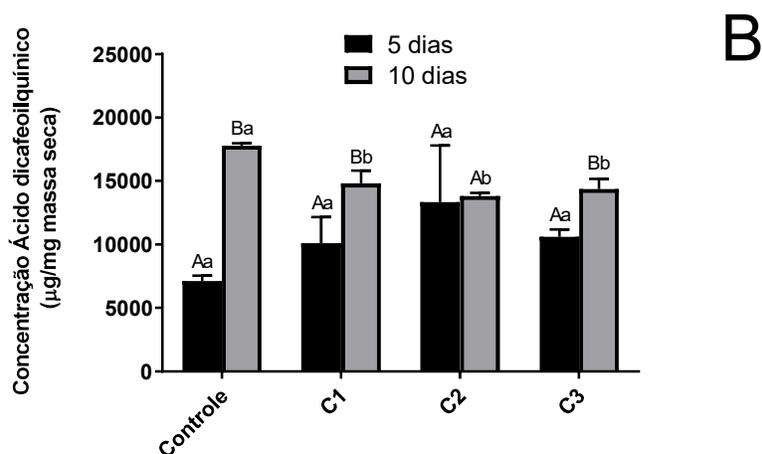
Devido à baixa concentração nos calos, não foi possível calcular a produção endógena de ácido *o*-cumárico nas células de *M. laevigata*. Portanto, o volume inoculado no meio para os tratamentos foi o mesmo definido para *M. glomerata*: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM (Tratamentos C1, C2 e C3, respectivamente). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de ácido *o*-cumárico.

Os resultados para o ensaio com ácido *o*-cumárico indicam que o metabólito não alterou significativamente os níveis de ácido 5-cafeoilquínico nas células tratadas, em comparação com os controles (Figura 29A). O mesmo é observado para as concentrações de ácido dicafeoilquínico, nos primeiros cinco dias de tratamento, mantendo-se semelhante ao encontrado no grupo controle. Contudo, o tratamento parece ter tido um efeito negativo em suspensões com dez dias de tratamento, em relação ao grupo controle (Figura 29B).

Não foram detectados cumarina, ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 29. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico, m/z 353 (A) e ácido dicafeoilquínico, m/z 515 (B) em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *o*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

Além dos analitos principais da via de biossíntese em estudo, notou-se novamente o aparecimento de um pico no tempo de retenção 2,87 min, que não havia sido observado no controle, apresentando como componente majoritário uma substância de m/z 325 e, em menor quantidade, uma substância de m/z 327 (Figura 30). Um LC-MS/MS foi feito para

tentar identificar estes analitos e, assim como em *M. glomerata*, os principais fragmentos identificados apresentavam m/z 119 e m/z 163 (Figura 31), para m/z 325 e m/z 121, m/z 147 e m/z 165, para m/z 327. Novamente sugere-se que estes metabólitos correspondam ao melilotosídeo para a substância de m/z 325 e diidromelilotosídeo para a substância de m/z 327.

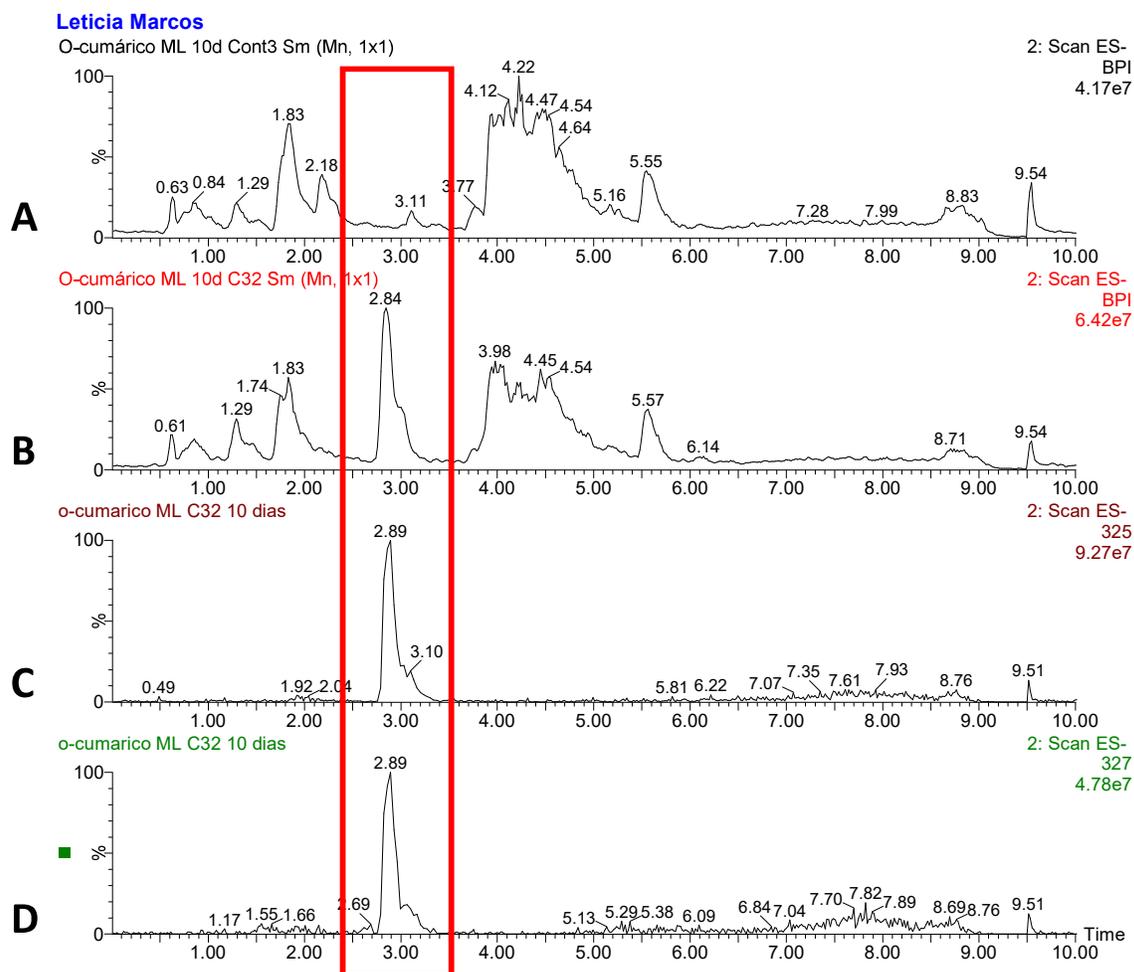


Figura 30. Cromatogramas UHPLC-MS no modo negativo de extratos de suspensões celulares de *Mikania laevigata*, do grupo controle (A) de células tratadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico, tratamento C3 (B) e cromatogramas selecionados para os íons m/z 325 (C) e m/z 327 (D).

Leticia Marcos

o-cumarico ML C32 10 dias 11 (2.866)

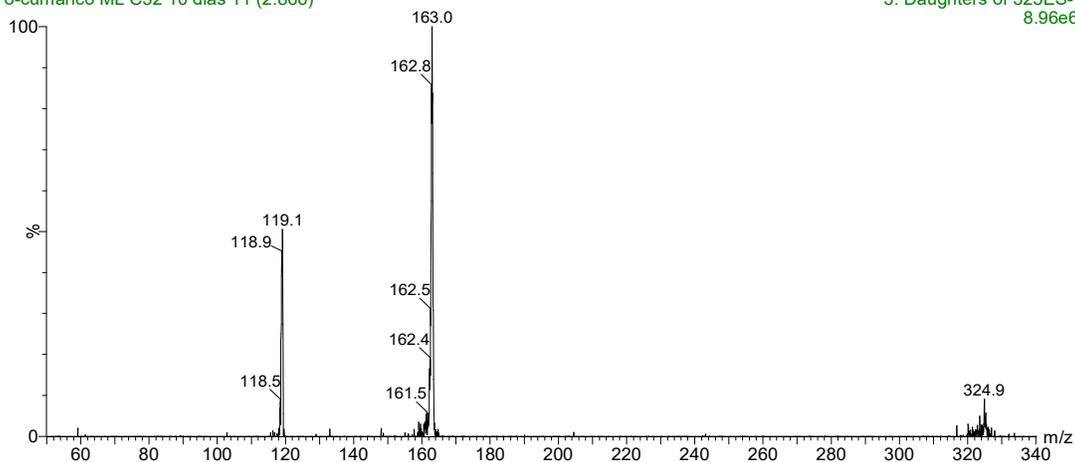
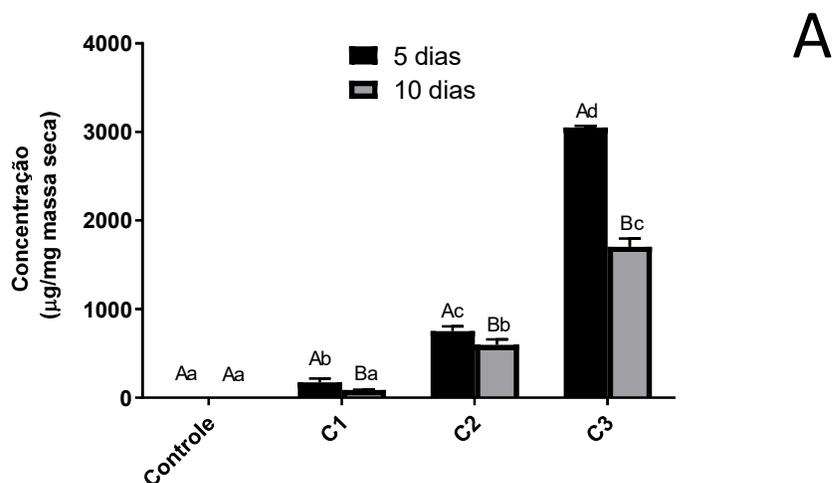
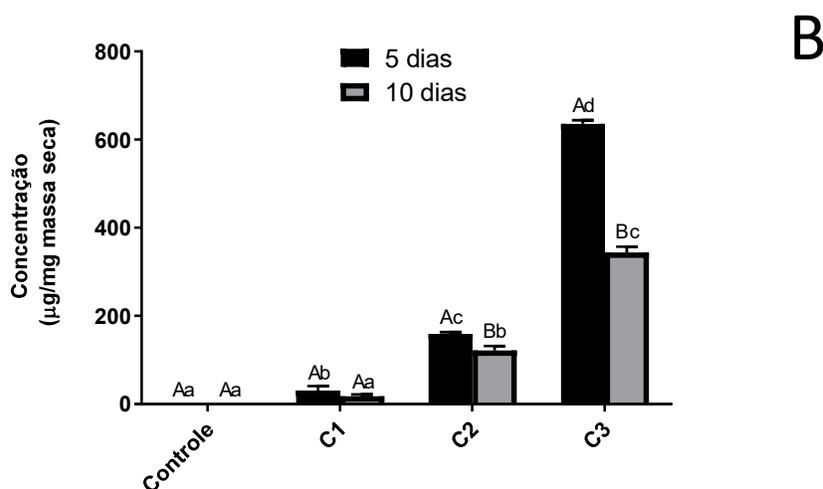
3: Daughters of 325ES-
8.96e6

Figura 31. Espectro de massas, modo negativo, com os fragmentos obtidos por LC-MS/MS da substância de m/z 325 encontrado em células de *Mikania laevigata* tratadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico.

As substâncias foram também quantificadas por comparação, utilizando-se a curva de calibração para o ácido *o*-cumárico ($y = 200895x - 397903$; $R^2 = 0,9982$). Os resultados mostraram que houve um aumento expressivo dos níveis desses metabólitos nas suspensões celulares de *M. laevigata* quando foi adicionado ácido *o*-cumárico ao meio de cultura, tanto em cinco quanto em dez dias de tratamento. Além disso, como em *M. glomerata* nota-se uma distinção entre os diferentes tempos de coleta, em que células coletadas após cinco dias apresentaram teores maiores da substância do que células com dez dias de tratamento (Figura 32).



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 32. Quantificação da substância de m/z 325 (A) e m/z 327 (B), com tempo de retenção 2,8 min nas suspensões de celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *o*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *o*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste t , $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

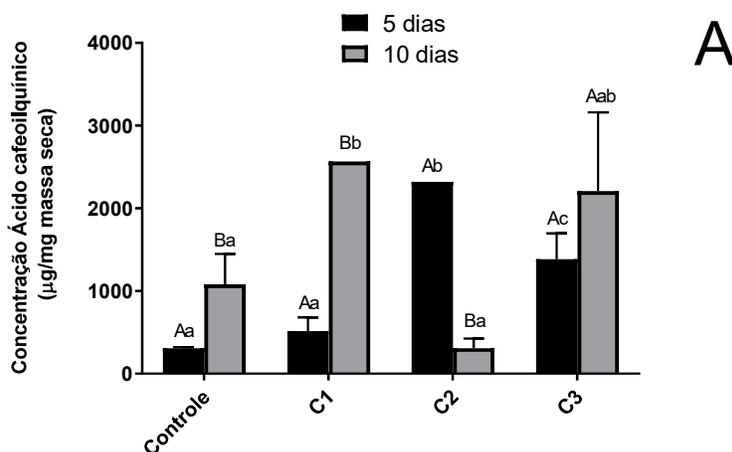
4.4.5. Ensaio Ácido *p*-cumárico

Devido à baixa concentração nos calos, não foi possível calcular a produção endógena de ácido *o*-cumárico nas células de *M. laevigata*. Portanto, o volume inoculado no meio para os tratamentos foi o mesmo definido para *M. glomerata*: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM (Tratamentos C1, C2 e C3, respectivamente). Um grupo controle também foi estabelecido sem a adição de ácido *p*-cumárico.

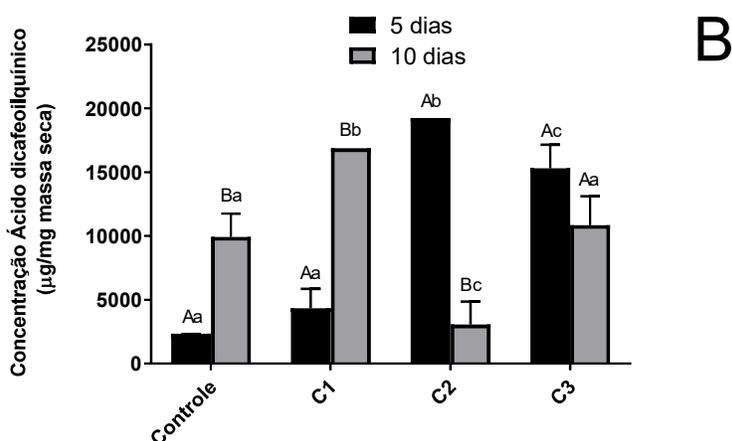
Os dados obtidos pela quantificação dos ácidos 5-cafeoilquinico e dicafeoilquinico (Figura 33) mostram comportamentos muito semelhantes de modulação dos dois metabólitos quando as células de *M. laevigata* foram tratadas com ácido *p*-cumárico. Primeiramente, nota-se um aumento na concentração dos dois analitos nos primeiros cinco dias de experimento no grupo de tratamento C2, quando comparados aos valores obtidos no grupo controle de cinco dias. Em seguida, as concentrações voltam a diminuir em células do tratamento C3. Em ambos os casos também, as células coletadas após dez dias apresentam um aumento na concentração desses dois ácidos clorogênicos no grupo tratado C1, em

relação ao controle. No tratamento C2, esses valores voltam a diminuir a valores próximos, ou até menores, ao basal e no último tratamento (C3) estes metabólitos aumentam novamente.

Não foram detectados cumarina, ácido *p*-cumárico ou ácido *o*-cumárico em nenhuma das amostras do grupo controle ou dos tratamentos, em cinco ou dez dias, pelo método utilizado por UHPLC-MS.



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo



Amostras controle e de suspensões celulares de *M. laevigata* tratadas com diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico por 5 e 10 dias de cultivo

Figura 33. Quantificação de ácido 5-caffeoilquínico, *m/z* 353 (A) e ácido dicaffeoilquínico, *m/z* 515 (B) em suspensões celulares de *Mikania laevigata* tratadas com concentrações crescentes de ácido *p*-cumárico por 5 e 10 dias. C1, C2 e C3 correspondem às concentrações de ácido *p*-cumárico iguais a: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,75 mM respectivamente. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre coletas de 5 e 10 dias, dentro do mesmo tratamento (teste *t*, $p < 0,05$), e letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, em 5 ou 10 dias (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Média de três repetições (\pm desvio padrão).

5. Discussão

5.1. Considerações sobre cultura de calos de *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*

A indução de calos a partir de espécies vegetais é um processo longo e que depende de vários fatores, como composição do meio de cultura, reguladores de crescimento e pelo tipo de tecido e idade da planta doadora utilizado para a obtenção do explante. Estes elementos ainda podem variar dependendo do propósito de determinada cultura como, por exemplo, para micropropagação, produção de determinada substância de interesse ou para estudos de biossíntese.

Os reguladores de crescimento vegetal são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de tecido *in vitro* como também influencia a produção de metabólitos, dessa forma, a determinação das concentrações ótimas de cada um é fundamental para o estabelecimento de culturas de calos. Nossos resultados mostraram que várias combinações de 2,4-D e BAP ocasionaram a formação de calos nas duas espécies de *Mikania* estudadas, porém também levaram ao crescimento de raízes, crescimento lento e pouca friabilidade dos calos. Dentre as combinações testadas, verificou-se que a adição de 0,5 mg/L de 2,4 D e 3 mg/L de 6-BA promoveu o desenvolvimento de calos em ambas espécies de guaco. Pereira, França e Câmara (1999) também estudaram diferentes meios, reguladores e concentrações para induzir calos de *Mikania glomerata* e relataram os mesmos problemas ao estabelecer suas culturas, contudo os autores optaram por utilizar meio White (1951), suplementado com 3 mg.L⁻¹ de NAA e 1 mg.L⁻¹ de BAP. As divergências entre os resultados obtidos pelos autores e os do presente estudo mostram como é variável o comportamento de cada planta frente a diferentes concentrações de reguladores de crescimento de plantas para a indução de calos, mostrando como as concentrações ótimas devem ser determinadas experimentalmente para cada espécie e até mesmo entre genótipos.

As análises por UHPLC-MS de calos de *M. glomerata* com 20 dias de cultivo, logo após o estabelecimento das culturas, detectaram baixas concentrações de ácido 5-cafeoilquínico e ácido dicafeoilquínico e a ausência de cumarina. Decorridos dois anos de manutenção desses calos, houve um aumento marcante nos níveis dos dois ácidos clorogênicos monitorados e o aparecimento de cumarina nas amostras de 15 e 30 dias de cultivo. Os dados se mostram coerentes com as informações documentadas por Melo (2013), em que há acúmulo predominante de ácido clorogênico em *M. glomerata* e cumarina ausente ou em baixas concentrações em seus estudos de composição química de folhas dessa espécie. Os trabalhos de Pereira, França e Câmara (1999) também detectaram a presença de

cumarina em calos de *M. glomerata*, acumulando cerca de $25 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca nas condições mais favoráveis, um valor inferior ao encontrado nos nossos calos cultivados por 30 dias, que apresentaram em média $53,76 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca.

Os baixos valores de cumarina nos calos também podem estar relacionados à fonte dos explantes utilizados para o estabelecimento das culturas. Em estudos de perfil químico de pecíolos de *M. glomerata* por Costa et al. (2017) estas estruturas apresentaram valores entre 0,8 e 1 mg de cumarina por grama de massa seca, diferentes dos extratos das folhas em que a substância não foi detectada ou se encontrava em baixíssimas concentrações. Para a indução dos calos, os pecíolos foram descartados e utilizados somente o limbo das folhas, assim, futuros estudos poderiam estabelecer culturas a partir dos pecíolos e verificar caso o tecido de origem do explante possa influenciar a produção de metabólitos nestes calos.

Os altos níveis de ácido 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico ($11,80 \text{ mg.g}^{-1}$ e $52,97 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente) também estão de acordo com o encontrado na literatura. Almeida et al. (2017) obteve em extratos de folhas de plantas monitoradas ao longo do ano uma média de 2,3 mg de ácido 5-cafeoilquínico por grama de massa seca e aproximadamente 6 mg de ácido dicafeoilquínico por grama de massa seca. Já Costa et al. (2017) quantificou em seus extratos de folhas da mesma espécie concentrações ainda maiores desses dois compostos, $30,4 \text{ mg.g}^{-1}$ e $174,6 \text{ mg.g}^{-1}$ de ácido 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico, respectivamente. Nota-se que os resultados com calos de *M. glomerata* apresentam valores intermediários entre os encontrados nos dois estudos citados. As concentrações desses dois ácidos clorogênicos são maiores do que os observados por Almeida et al. (2017), porém não superam os valores dos extratos de Costa et al. (2017). Os dados obtidos pelo perfil químico de calos, em conjunto com o encontrado na literatura, sugerem estes ácidos clorogênicos como marcadores químicos mais adequados para *M. glomerata*.

No caso de *M. laevigata*, os extratos de calos com 20 dias de subcultivo não apresentaram níveis detectáveis de cumarina ou dos ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico. Entretanto, após dois anos do estabelecimento dessas culturas, os três metabólitos foram encontrados nas amostras de calo. A cumarina esteve presente em amostras de 15 e 30 dias de cultivo, porém parou de ser detectada novamente após 60 dias, um comportamento semelhante ao observado para as concentrações de cumarina em *M. glomerata*. O período de 60 dias é um tempo longo para a cultura de calos, que já começam a apresentar sinais de estresse oxidativo, observado pela coloração mais escura das células e do meio de cultura. O escurecimento de culturas de células afeta o crescimento celular e leva à morte

celular, o que resulta em redução de acumulações de biomassa e produção de metabólitos (Mustafa et al., 2011). Dong e colaboradores (2016) mostraram que o aumento de flavonóides pode ser o principal causador do escurecimento em culturas celulares de *Taxus chinensis*. Dessa forma, é possível que este estresse afete de maneira negativa a síntese de cumarina nesses calos mais velhos, favorecendo a produção de outros metabólitos. É importante ressaltar que o tempo não afetou a concentração dos ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico, que possuem um potente efeito antioxidante, em calos de *M. laevigata* e até aumentou em calos de *M. glomerata*.

As concentrações de cumarina nos calos de *M. laevigata*, uma média de 119,36 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca, foi o dobro do encontrado em calos de *M. glomerata*, o que condiz com o observado na comparação entre as duas plantas. Contudo, os valores são muito inferiores ao encontrado por Costa et al. (2017) que obteve 34,8 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em extratos de folhas secas de *M. laevigata* e por Almeida et al. (2017) que estudou o teor de cumarina mensalmente ao longo do ano e as maiores médias apresentaram 11,2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa foliar seca.

Em *M. laevigata* as maiores concentrações dos ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico nos calos (5,53 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e 36,38 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente) foram inferiores aos encontrados em *M. glomerata*, porém se mantiveram constantes entre os períodos de coleta. Comparando-se os resultados dos calos ao encontrado nas folhas dessa espécie, a concentração de ácido 5-cafeoilquínico foi maior do que o encontrado por Almeida et al. (2017), que obteve 1,1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca, porém foi inferior aos 13,7 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ obtido por Costa et al. (2017). O ácido dicafeoilquínico também apresentou valores superiores ao obtido por Almeida et al. (2017), cujo extrato de folhas secas apresentou 2,2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ da substância. Já os extratos de folha de Costa et al. (2017) apresentaram uma média de 35 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca, o que é muito semelhante ao valor encontrado nos calos de *M. laevigata*.

As mudanças observadas nos perfis químicos entre calos analisados logo após o estabelecimento das culturas e após dois anos de manutenção podem ser atribuídas a diferentes fatores como a possível ocorrência de variação somaclonal em determinadas células do calo. Sabe-se que culturas de células vegetais podem gerar variabilidade genética, conhecidas como variações somaclonais, provavelmente como resultado de mutações de genes ou mudanças epigenéticas (Krishna et al. 2016). Os seus mecanismos ainda não foram completamente esclarecidos, mas o fenômeno já é conhecido desde 1971, quando foram descobertas variações morfológicas em plantas de cana de açúcar cultivadas

in vitro. Desde então foram reportados casos para inúmeras espécies, como batata, tabaco, arroz, uva, entre outros (Larkin e Scowcroft. 1981).

Tecidos vegetais *in vitro* de diferentes espécies podem apresentar variação somaclonal quando cultivados em presença da auxina sintética 2,4 D (Krishna et al. 2016). O 2,4 D é uma auxina considerada forte em cultivo *in vitro* que promove a formação de calos em diferentes espécies e que também pode causar a variação somaclonal. Em estudos de melhoramento genético, utiliza-se o cultivo de tecido *in vitro* em presença de concentrações elevadas de 2,4 D para provocar variação somaclonal, mutação, visando o desenvolvimento de genótipos diferentes, o que pode trazer variabilidade genética, que serão benéficas ou não.

As variações somaclonais podem ocorrer durante vários ciclos de subcultivo. Durante este período a produção de metabólitos geralmente é variável de um ciclo para o outro, contudo, após um período de tempo a estabilidade genética é alcançada. Este espaço de tempo pode variar de semanas a anos. Bourgaud e colaboradores (2001) consideraram 90% de suas culturas estabilizadas após 48 semanas (aproximadamente 16 ciclos de subcultivo), já Fett Neto e colaboradores (1994a) relataram uma demora de dois anos para a estabilização de culturas de *Taxus cuspidata*.

5.2. Considerações sobre as suspensões celulares de *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*

A figura 34A ilustra uma curva de crescimento teórica de células vegetais, apresentando as fases típicas de crescimento: a fase lag ou de adaptação, a fase exponencial e a fase estacionária e a figura 34B mostra uma curva de crescimento real de células em suspensão de *Cinchona robusta* com estas três fases bem definidas (Blom et al. 1992) As curvas de crescimento com suspensões celulares de guaco apresentaram um comportamento incomum, não apresentando uma fase estacionária como o esperado para células vegetais em suspensão. São observados picos de biomassa e depois uma estabilização da biomassa próxima ou inferior da biomassa inicial de células. Não foi encontrado nenhum outro exemplo na literatura desse tipo de curva de crescimento, até o momento.

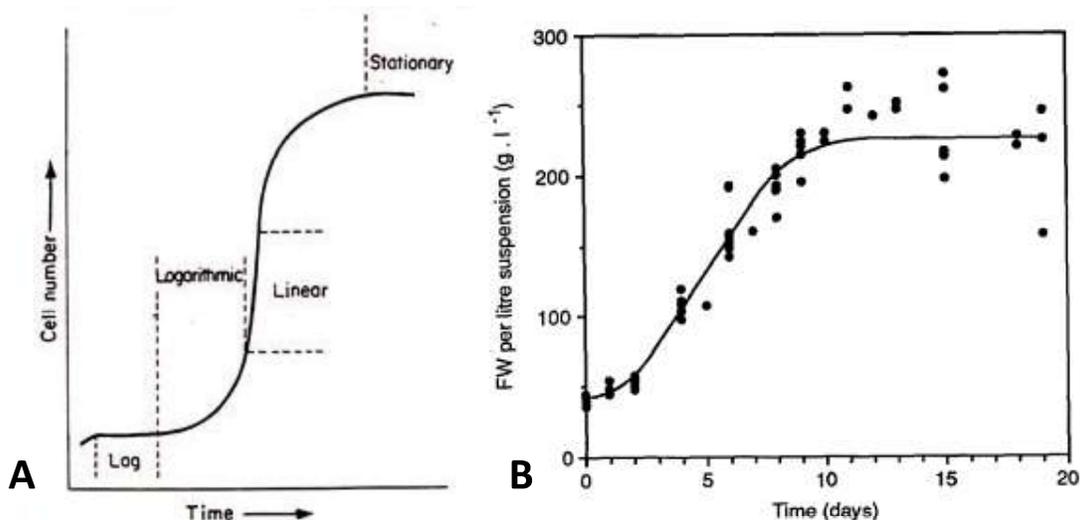


Figura 34. Curva de crescimento típica de uma cultura de células vegetais em suspensão, mostrando as principais fases de crescimento (A) e curva de crescimento de células em suspensão de *Cinchona robusta* (B). Fonte: Blom et al. 1992.

Observa-se que a ocorrência da curva padrão da cultura de suspensão celular, com as três fases, pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: a espécie estudada, o tipo de calo, sendo o friável o mais adequado por possuir células meristemáticas com potencial de divisão celular, a formação de grumos (pode ser evitada por meio de filtração), a quantidade de massa de calo utilizada para iniciar a suspensão celular, o volume de meio líquido, o tipo de regulador de crescimento de planta utilizado no meio líquido, a iluminação, as condições de aeração da cultura, agitação e rotação, a temperatura, entre outros. Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade de que o padrão encontrado nas curvas de crescimento das suspensões celulares se deva a variações experimentais, influenciadas pelos fatores apresentados acima.

As concentrações dos metabólitos da via de biossíntese dos fenilpropanóides em células de *M. glomerata* em suspensão foram inferiores às de calos da mesma espécie, de maneira geral. Os valores máximos obtidos, em média, para a cumarina foi de 11,64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, para o ácido 5-cafeoilquínico foi de 2,64 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e para o ácido dicafeoilquínico foi de 8,52 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. A menor produtividade das células em suspensão em comparação com os calos pode ter ocorrido pelas mudanças causadas pela substituição de um meio de cultura semi-sólido para um meio líquido. Apesar de conter os mesmos nutrientes e concentrações de reguladores de crescimento, o meio líquido e a agitação permitem maior contato das células com os componentes do meio e, conseqüentemente, alteram a biossíntese de metabólitos.

Outro ponto relevante, foi o aumento da concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura líquido de 30 g.L⁻¹ para 50 g.L⁻¹ com o objetivo de acelerar o crescimento celular. Sabe-se que a adição de sacarose estimula altas taxas de crescimento, porém pode também aumentar ou diminuir a expressão de vias metabólicas (Matsuura et al. 2017). Dessa forma, muitas vezes é utilizado um sistema duplo para a máxima produção de metabólitos de interesse, em que um primeiro meio é responsável pelo rápido crescimento da biomassa e o segundo é favorável a biossíntese de produtos naturais (Malik et al. 2013). Modificações do meio podem incluir: a redução ou eliminação de reguladores de crescimento vegetais, como o 2,4-D; redução nos níveis de fosfato e modificação da relação carboidrato:nitrogênio (Ochoa-Villarreal et al. 2016, Ramachandra e Ravishankar, 2002).

Os resultados da quantificação dos metabólitos também revelam um quadro interessante na acumulação dessas substâncias em células de *M. glomerata* ao longo de 60 dias. Ao sobrepor os gráficos da curva de crescimento e os gráficos da quantificação dos ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico, nota-se os picos de aumento da concentração desses dois metabólitos parecem acompanhar os picos de biomassa provavelmente indicando uma correlação entre aumento de biomassa e produção de ácido clorogênico. O efeito é bastante incomum, pois em geral o crescimento celular e a produção de metabólitos secundários estão inversamente relacionados. Essa produção tipicamente ocorre em fase estacionária e está associada à inibição do crescimento e à produção de enzimas para o metabolismo secundário. A falta de produção nos estágios iniciais pode ser explicada pela alocação de carbono, distribuída principalmente entre os processos do metabolismo primário (ex. fotossíntese, construção de estruturas celulares e respiração) quando o crescimento é muito ativo. Por outro lado, quando o crescimento cessa, o carbono não é mais necessário em grandes quantidades para o metabolismo primário, os compostos secundários se tornam mais ativamente sintetizados. No entanto, alguns produtos secundários de plantas são conhecidos por estarem associados ao crescimento de células indiferenciadas, como betalaínas e carotenóides (Matsuura et al. 2017).

Em relação às concentrações de cumarina, nota-se que os picos de acúmulo de cumarina se intercalam com os picos de ácido clorogênico. Como estes metabólitos são sintetizados pela mesma via e derivam do mesmo precursor, a fenilalanina, é possível que exista uma modulação positiva entre as produções de ácido clorogênico e cumarina. Dessa forma, altos níveis de ácido clorogênico estariam estimulando a produção de cumarina e vice-versa em células de *M. glomerata*.

A ausência dos metabólitos estudados em células de *M. laevigata* pode ser explicada novamente por variações somaclonais das culturas, uma vez que o ensaio da curva foi realizado logo após o estabelecimento das culturas de calo e quando obteve-se biomassa suficiente. Desse modo, é possível que as células ainda não estivessem se estabilizado geneticamente. Seria necessário realizar o ensaio de curva de crescimento novamente para avaliar como o tempo afeta o perfil químico de suspensões celulares de *M. laevigata*.

5.3. Tratamentos

Tratamento Ácido clorogênico

Em relação ao tratamento com ácido clorogênico, pode-se sugerir que, por comparação ao grupo controle, há uma modulação positiva em termos de metabolismo em cultura de células de *M. glomerata* que modifica a rota metabólica para biossíntese de cumarina quando é alta a disponibilidade de ácido clorogênico para as células. Por outro lado, os resultados sugerem que o teor dos ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico apresenta correlação negativa ao aumento da concentração de ácido clorogênico adicionado à suspensão celular, principalmente quando as células são expostas a concentrações elevadas do mesmo. Entretanto, também foi observado um leve aumento de ácido dicafeoilquínico em alguns tratamentos com concentrações menores de ácido clorogênico exógeno.

Os resultados sugerem, portanto, que o ácido clorogênico adicionado ao meio agiu nas etapas iniciais da via metabólica, provavelmente no ponto de ramificação do ácido cinâmico, inibindo a produção de ácido *p*-cumárico pela enzima C4H, que leva a síntese de ácido clorogênico, e favorecendo a rota para a produção de cumarina através da enzima C2H que sintetiza o ácido *o*-cumárico.

Não se pode descartar também a possibilidade de o ácido clorogênico ter agido em outras etapas da via metabólica. Em 1965 Zucker já havia demonstrado uma relação direta entre a atividade da enzima PAL e a quantidade de ácido clorogênico sintetizado a partir do substrato endógeno e em 1979 Lamb concluiu que a acumulação de ácido clorogênico em discos de batata é controlada por mudanças rápidas e inter-relacionadas entre os níveis de atividade das enzimas biossintéticas PAL, C4H e HQT.

Howles e colaboradores (1996) também mostraram em seus estudos que a superexpressão da atividade da enzima PAL em plantas de tabaco resultou em um aumento na acumulação de ácido clorogênico, apresentando uma relação próxima ao linear. O oposto também foi observado, em que plantas de tabaco com redução na atividade enzimática da PAL reduziu

de maneira proporcional o nível desse metabólico em comparação com o nível de ácido clorogênico de plantas do tipo selvagem (Bate et al., 1994). Essas observações, segundo Howles et al. (1996), indicam que a PAL seria a principal enzima limitante na taxa de biossíntese de ácido clorogênico, de modo que as etapas subsequentes neste sistema não contribuem significativamente para o controle do fluxo desse metabólito. Contradizendo estes trabalhos, estudos de silenciamento e super expressão de HQT em duas espécies de Solanaceae, *Nicotiana benthamiana* e tomate (*Solanum lycopersicum*) demonstraram que a enzima HQT não é só necessária para a síntese de ácido clorogênico, mas que sua atividade também pode determinar a taxa de fluxo dessa substância (Clé et al. 2008 e Niggeweg et al. 2004).

Como a concentração de cumarina não foi afetada de modo negativo pelo tratamento com ácido clorogênico, é improvável que este esteja inibindo a enzima PAL. Dessa forma, supõe-se que o ácido clorogênico exógeno esteja atuando na enzima HQT, inibindo ou estimulando sua atividade. Esta influência parece ser dependente da dose administrada no meio, uma vez que pelos resultados com *M. glomerata*, o tratamento com uma dose mais baixa de ácido clorogênico exógeno aumentou a concentração de ácido dicafeoilquínico e uma dose bastante elevada reduziu a sua concentração em relação ao controle. Pode ser provável também que a diferença na modulação dos dois ácidos se deva ao duplo papel da enzima HQT proposta por Moglia et al. (2014), que catalisa duas reações em diferentes compartimentos subcelulares. É possível que diferentes concentrações do metabólito exógeno afetem de maneiras distintas as enzimas atuando no citoplasma e no vacúolo, com doses menores estimulando a enzima localizada no vacúolo e favorecendo a atividade de clorogenato: clorogenato transferase (acil-quinato: acil-quinato transferase), que produz ácido dicafeoilquínico.

Além disso, a reação catalisada por HQT é um passo que é livremente reversível in vitro (Niggeweg et al. 2004), portanto é possível que não tenha ocorrido somente a inibição da síntese de ácido clorogênico, mas a reação por HQT pode ter se revertido, acumulando cafeoil-CoA ou outros metabólitos da via. Como essa via também leva a produção de unidades formadoras da lignina, seria interessante avaliar se esses tratamentos com ácido clorogênico afetam igualmente os níveis de lignina dessas células. Em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), a biossíntese de ácidos clorogênicos parece estar intimamente conectada com a produção de suberina através do metabólito cafeoil-CoA que é um precursor de feruloil-CoA, necessário para a biossíntese de lignina e suberina e crucial para

o desenvolvimento de tubérculos (Valiñas et al. 2015). Em *S. lycopersicum* a perda ou aumento de atividade de HQT não teve efeito detectável na formação de lignina (Niggeweg et al. 2004).

Já em *M. laevigata* não é observada uma alteração na rota para a síntese de cumarina e de maneira contrária aos resultados obtidos em *M. glomerata*, houve uma modulação positiva na concentração dos ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico em células tratadas com ácido clorogênico, mas somente nos primeiros cinco dias. Como visto para *M. glomerata*, a ação do tratamento com ácido clorogênico parece depender da dose aplicada, dessa forma, as doses utilizadas neste experimento parecem estimular o acúmulo desses dois ácidos clorogênicos nas células de *M. laevigata*, pelo menos num primeiro momento. O retorno aos níveis basais de ácido 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico após dez dias de tratamento indica que este estímulo não se mantém por períodos muito longos de tempo nesta e que o excesso produzido desses ácidos precisa ser metabolizado. Talvez esse seja um dos motivos para a baixa quantificação destes compostos em outros estudos com esta planta (Almeida et al. 2017, Costa et al. 2017 e Melo et al. 2015).

Tratamento Cumarina

Os tratamentos com cumarina em células de *M. glomerata* sugerem uma modulação positiva inicial na produção de ácido clorogênico, mas que não se mantém ao longo dos 10 dias de tratamento. Com relação a concentração de cumarina endógena, os tratamentos realizados tiveram efeito levemente positivo na biossíntese desse metabólito, porém só nos primeiros cinco dias. Após dez dias os valores de cumarina são semelhantes aos valores basais do controle. Estes dados, em conjunto com os resultados previamente obtidos do tratamento com ácido clorogênico e a partir da quantificação dessas substâncias em células da curva de crescimento, também sustentam a hipótese inicial de uma modulação positiva entre as vias de biossíntese de ácido clorogênico e cumarina. Esta modulação deve ocorrer possivelmente na etapa onde há uma ramificação da via dos fenilpropanóides, em que o ácido cinâmico é convertido em ácido *p*-cumárico ou em ácido *o*-cumárico pelas enzimas C4H e C2H, respectivamente.

Em *M. laevigata*, por sua vez, o fornecimento de cumarina não afetou a concentração endógena da substância, com exceção das suspensões tratadas com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca e coleta após dez dias, em que ocorreu uma redução expressiva da cumarina, que deixou de ser detectada. Com relação ao teor de ácido clorogênico, os níveis de ácido

dicafeoilquínico sofreram uma queda em células tratadas com cumarina coletadas após dez dias, sugerindo uma provável modulação negativa da via dos ácidos clorogênicos pelo aumento da cumarina, o que poderia explicar a prevalência de cumarina nesta espécie ao invés de ácido clorogênico como em *M glomerata*.

O mais interessante, no entanto, foi o aparecimento de um pico no tempo de retenção 2,6 min em células tratadas das duas espécies de guaco que não foi detectado nas células do grupo controle, cuja substância majoritária identificada no espectro possuía m/z 327. Com auxílio dos espectros de fragmentação (MS/MS) e comparação com os resultados reportados por Yang et al. (2007) sugere-se que a identidade desse metabólito desconhecido seja o diidromelilotosideo (Figura 35), um intermediário glicosilado da via de biossíntese da cumarina.

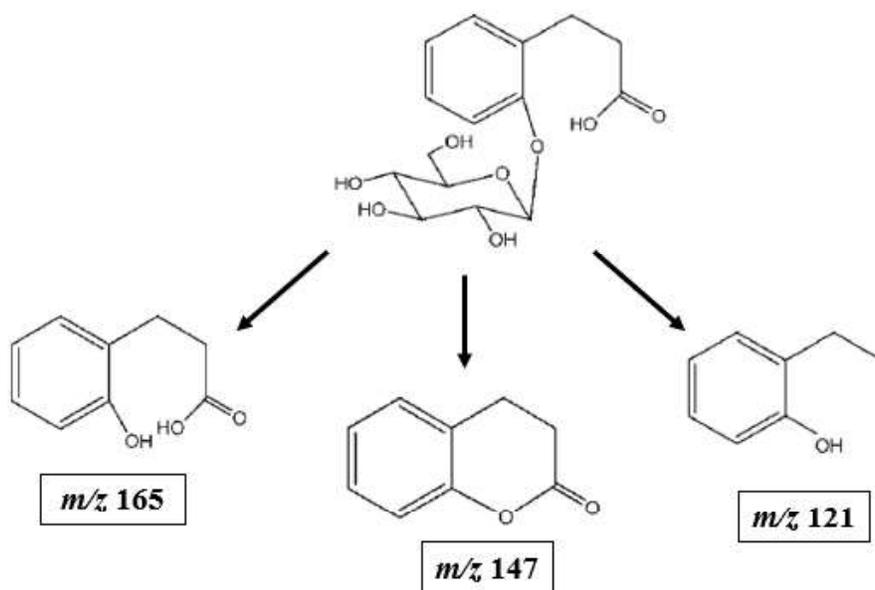


Figura 35. Estrutura do Diidromelilotosideo (PM = 328) e dos possíveis fragmentos obtidos por MS/MS. Fonte adaptada de Yang et al. 2007

Kosuge e Conn (1959) foram os primeiros a estudar o metabolismo da cumarina fornecida de forma exógena em *Melilotus alba* (sweet clover). Eles administraram uma solução de cumarina-3- ^{14}C a plântulas excisadas e após um período de 28 horas foram isolados dois metabólitos radioativos, chamados pelos autores de ácido melilótico e ácido β -glicosil-melilótico (atualmente denominado diidromelilotosideo). Os mesmos autores confirmaram o experimento dois anos depois, mostrando que os dois metabólitos previamente adquiriram 12% e 59%, respectivamente, da radioatividade da cumarina marcada (Kosuge e Conn 1961), reforçando nossa hipótese de que o composto de m/z 327 encontrado em

nossas células também tratadas com cumarina é o metabólito diidromelilotosideo. Além disso, o fato desses metabólitos conterem a radioatividade da cumarina exógena indica que a cumarina aplicada no meio é canalizada para a via de síntese deste derivado conjugado. Ao mesmo tempo, nossos resultados com *M. laevigata*, em que houve diminuição da cumarina endógena em células tratadas por dez dias, sugerem que o aumento na concentração desse metabólito no meio também pode afetar a síntese da cumarina endógena, desviando a rota para esta mesma direção.

A produção de conjugados fenólicos é frequentemente observada quando os níveis de intermediários ou produtos finais da via dos fenilpropanóides são aumentados artificialmente. Por exemplo, a adição de ácido cinâmico exógeno a culturas de alfafa leva ao acúmulo de dois conjugados de ácido cinâmico (Orr et al., 1993). A glicosilação de grupos hidroxila em compostos fenólicos potencialmente reativos é um mecanismo bioquímico comum de desintoxicação em organismos vegetais (Vickery, 1981).

Tratamento Fenilalanina

O fornecimento de um composto precursor ou intermediário (de preferência barato e disponível) de uma via biossintética do metabólito secundário é uma estratégia comum para aumentar o rendimento do produto final e tem sido frequentemente observada (Matsuura et al. 2017). A adição de fenilalanina ou de ácido benzoico em culturas de suspensão de *Taxus*, por exemplo, resultou no aumento do rendimento de taxol (Fett-neto et al. 1994b).

A fenilalanina é o precursor de diversos compostos aromáticos através da via dos fenilpropanóides. PAL é a enzima que representa o ponto de entrada da via canalizando a fenilalanina do pool metabólico primário para a síntese de ácido E-cinâmico (Zhang e Liu 2015). A atividade de PAL é muitas vezes associada a mudanças simultâneas na taxa de acumulação de flavonóides e compostos fenólicos. Esta correlação sugere uma possível relação causal entre os dois parâmetros, por isso acredita-se que PAL é o principal fator limitante na biossíntese de flavonóides, ácidos cinâmicos e outros fenilpropanóides (Margna 1977).

O papel limitante da fenilalanina na produção de fenilpropanóides se torna evidente em muitos estudos em que o aminoácido é administrado externamente. O fornecimento exógeno de fenilalanina aumentou a concentração de antocianinas em uma variedade de espécies da família Brassicaceae, em centeio e em suspensões celulares de morango; flavonóides em trigo mourisco; ácido cinâmico em morango; lignina em *Sorghum*;

fenilpropanóides voláteis em *Petunia*; entre vários outros casos (Edahiro et al. 2005, Margna 1977, Oliva et al. 2015). Os níveis elevados de aminoácidos incluindo fenilalanina e tirosina pela presença de uma proteína AroG também levou a um aumento dramático em fenilpropanóides de suspensões celulares de *Vitis vinifera* cv. *Gamay Red* (Manela et al. 2015) e de fenilpropanóides voláteis em *Petunia x hybrida* V26 (Oliva et al. 2015), sugerindo novamente que os níveis de aminoácidos, principalmente fenilalanina, são fatores limitantes para a produção de fenilpropanóides.

Não há um consenso em estudos encontrados na literatura sobre a limitação de fenilalanina na produção de ácido clorogênico. Em mudas de trigo mourisco e em tecido de tubérculos de batata a adição do aminoácido teve um efeito positivo na produção dessa substância (Margna, 1977 e Zucker, 1965), enquanto que em plantas de tabaco que superexpressam PAL observou-se um acúmulo de ácido clorogênico em níveis maiores do que os do tipo selvagem, sugerindo que o pool de fenilalanina não é um fator limitante para a síntese ou que as enzimas envolvidas na biossíntese de fenilalanina são induzidas concomitantemente (Howles et al. 1996).

Diferente desses resultados anteriores, ensaios com fenilalanina exógeno em células de *M. glomerata* diminuíram de maneira expressiva as concentrações do ácido dicafeoilquínico, em comparação com os controles enquanto que os níveis de cumarina não foram alterados. Em *M. laevigata* a cumarina também não foi afetada pela adição de fenilalanina no meio. Já as concentrações dos ácidos 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico também diminuíram como em *M. glomerata*, mas não de maneira tão importante.

Criou-se a hipótese de que as altas concentrações de fenilalanina no meio devem ter alterado o fluxo de metabólitos da rota para a produção de outras substâncias da via dos fenilpropanóides. Embora as mudanças no nível de um único ou de um grupo de substâncias não necessariamente coincidam com o aumento do precursor, ainda é possível que a produção total de fenilpropanóides se correlacione positivamente (Margna 1977). Manela et al. (2015) reportou igualmente uma ligeira redução das concentrações totais de antocianinas nas células AroG* e alterações nas frequências relativas das diferentes antocianinas, com diminuição significativa no teor de delphinidina e delphinidinas glicosiladas derivadas (petunidina e malvidina). Ao mesmo tempo, outros metabólitos da via, como resveratrol, ácido *p*-cumárico, diidroquercetina e 4 hidroxibenzoato, apresentaram concentrações significativamente maiores.

Tratamento Ácido *o*-cumárico

Os resultados do tratamento com ácido *o*-cumárico mostram o aumento da concentração de cumarina em suspensões celulares de *M. glomerata* inoculadas com 0,75 mM de ácido *o*-cumárico nos primeiros cinco dias. O efeito é condizente com o esperado, uma vez que o ácido *o*-cumárico é um precursor direto da via de biossíntese da cumarina. Não foi observado, no entanto, alteração nos níveis de ácido 5-cafeoilquínico ou dicafeoilquínico relacionados a adição de ácido *o*-cumárico ao meio de cultura das suspensões. Em células de *M. laevigata*, os resultados sugerem que os tratamentos não surtiram qualquer efeito nas concentrações de cumarina e ácido 5-cafeoilquínico, contudo notou-se um decaimento nos níveis de ácido dicafeoilquínico em comparação ao grupo controle após dez dias de experimento.

Como nos tratamentos com cumarina, notou-se o surgimento de um pico nos cromatogramas referentes as células das duas espécies tratadas e que não era detectado nos grupos controle. O pico apareceu no tempo de retenção 2,9 min e apresentava dois componentes majoritário que possuíam m/z 325 e m/z 327. Com auxílio dos espectros de fragmentação (MS/MS) e comparação com os resultados reportados por Yang et al. (2007), por Mouton e Van der Kooy (2014) e por Costa et al. (2017) sugere-se que a identidade desses metabólitos desconhecidos sejam: melilotosideo para a substância de m/z 325 (Figura 36) e diidromelilotosideo para a substância de m/z 327 (Figura 35).

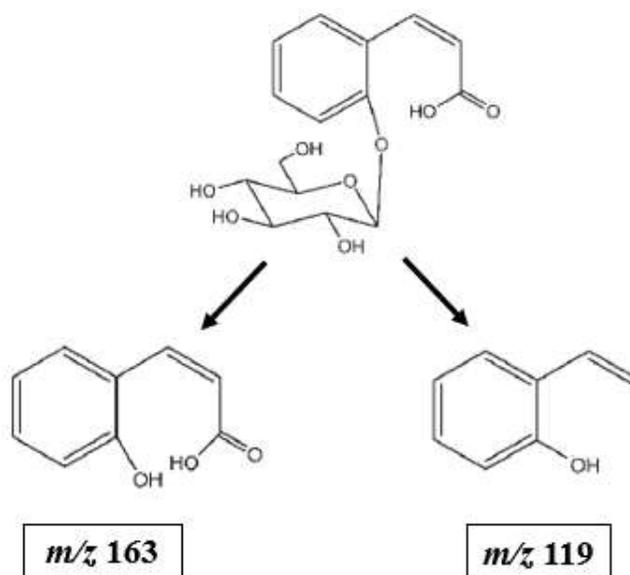


Figura 36. Estrutura do Melilotosideo (PM = 326) e dos possíveis fragmentos obtidos por MS/MS. Fonte adaptada: Yang et al. 2007

Em um segundo experimento realizado por Kosuge e Conn (1959), as plântulas excisadas de *Melilotus alba* foram expostas ao ácido *o*-cumárico-2-¹⁴C. Nessas condições, 20% da radioatividade foi encontrada em β-glicosídeo do ácido *o*-cumárico (melilotosídeo). Em menores proporções alguma radioatividade apareceu em moléculas de cumarina, tanto na sua forma livre quanto em sua forma conjugada, e em diidromelilotosídeo. À vista disso, pode-se sugerir que, como nos tratamentos com cumarina, a aplicação de ácido *o*-cumárico em suspensões celulares de *Mikania* induz a conversão desse excesso de compostos fenólicos para derivados menos reativos talvez como um meio desintoxicação (Vickery, 1981).

É relevante também notar que as duas espécies chegaram a uma mesma condição em tempos diferentes. Em *M. glomerata*, nos primeiros cinco dias de tratamento é observado um aumento da concentração de cumarina que acompanha os níveis crescentes de ácido *o*-cumárico adicionado. Quando as células atingiram dez dias do início do experimento, a cumarina voltou aos níveis basais enquanto houve um aumento considerável de melilotosídeo extraído, indicando uma modulação mais lenta dessa espécie para a formação de conjugados. Já em *M. laevigata* as concentrações desses metabólitos glicosilados são altas logo no início e até diminuí após dez dias.

Não foram encontrados muitos trabalhos na literatura que investiguem as atividades biológicas ou propriedades terapêuticas dessas substâncias. Até o momento foram avaliados: atividade antiprotozoária de melilotosídeo isolado de *Teloxys gravesolens*, uma planta medicinal utilizada para tratamento de algumas doenças gastrointestinais (Calzada et al., 2003); atividade antioxidante de *cis*-melilotosídeo, *trans*-melilotosídeo e diidromelilotosídeo de *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* (Yang et al., 2007) e atividade alelopática de metabólitos de *Melilotus neapolitana* (Esposito et al., 2008).

Tratamento Ácido p-cumárico

A aplicação de ácido *p*-cumárico ao meio de cultura de células de *M. glomerata* não afetou a rota metabólica da cumarina e na maior parte dos tratamentos também não alterou de maneira significativa a síntese de ácido 5-cafeoilquínico e ácido dicafeoilquínico. A exceção ocorreu no tratamento com 0,75 mM de ácido *p*-cumárico que diminuiu dramaticamente a concentração de ácido 5-cafeoilquínico, mas somente após dez dias de tratamento. Em células de *M. laevigata* por outro lado, a adição do composto teve efeito tanto positivo quanto negativo, dependendo da dose aplicado e do tempo de coleta. A

cumarina nesta espécie também não apresentou mudança das células do grupo controle para as células tratadas.

O ácido *p*-cumárico é um intermediário chave na produção de muitos derivados da rota dos fenilpropanóides, levando a produção de flavonóides, estilbenos, unidades formadoras de lignina e, é claro, ácidos clorogênicos (Vogt, 2010). Além disso, em muitos trabalhos foi identificado também um papel importante do ácido *p*-cumárico na regulação de enzimas e, conseqüentemente, na produção de metabólitos secundários dessa via.

O mais conhecido é seu efeito negativo na atividade da enzima PAL, cuja causa mais provável está relacionada a inibição de C4H (Lamb 1979), provocando o acúmulo de ácido cinâmico, um inibidor conhecido da expressão de PAL, em nível de transcrição e pós-tradução (Zhang e Liu 2015). Em 1993 Orr, Roberts e Dixon utilizaram cromatografia gasosa de alta resolução para determinar os níveis de ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico em suspensões celulares de alfafa (*Medicago sativa* L.) no intuito de investigar o papel desses intermediários como potenciais reguladores negativos da fenilalanina amônia-liase (PAL) *in vivo*. A adição exógena de ácido cinâmico a culturas tratadas resultou em aumentos rápidos nos níveis de ácido cinâmico endógeno, ácido *p*-cumárico e inibiu a transcrição de PAL. Tratamento de culturas induzidas com *a*-aminoxí-8- ácido fenilpropiónico (AOPP), um inibidor potente e específico da atividade de PAL *in vivo*, resultou em reduções de ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico, com aumentos concomitantes na transcrição de PAL e em sua atividade. A inibição da atividade da PAL também foi percebida em culturas de suspensão de células de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) em resposta ao tratamento pela adição de intermediários da via dos fenilpropanóides: ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico e ácido férúlico (Dixon et al. 1980).

Caso a síntese de ácido clorogênico esteja tão intimamente relacionada à atividade da enzima PAL, como reportado por Bate et al. (1994) e Howles et al. (1996), o efeito negativo na concentração de ácido 5-cafeoilquínico observado em células de *M. glomerata* pode estar relacionada a possível inibição da enzima PAL pelas altas doses de ácido *p*-cumárico administradas no meio de cultura. Além disso, este intermediário também está relacionado a produção de outros metabólitos, cujas rotas de síntese podem ter sido favorecidas pelo fornecimento desse precursor.

Zanardo e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos alelopáticos do ácido *p*-cumárico em raízes de soja (*Glycine max* (L.) Merr) e observaram concomitantemente um aumento no

teor de lignina e de seus monômeros *p*-hidroxifenil (H) e guaiacil (G) e uma diminuição na atividade enzimática da PAL, além de reduzir significativamente o crescimento radicular das mudas. Para os autores a ação inibitória do ácido *p*-cumárico na atividade PAL ocorreu pela acumulação de ácido cinâmico pela inibição da enzima C4H. Ao mesmo tempo, o alto influxo de ácido *p*-cumárico foi canalizado para a via, resultando em um aumento dos monômeros de lignina H e G que solidificaram a parede celular e, assim restringindo o crescimento da raiz de soja.

Foi verificada também a importância da modulação de ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico na mudança do fluxo da via dos fenilpropanóides para a produção de flavonóides em plantas de tabaco (Bate et al. 1994). Em situações favoráveis, o ácido cinâmico inibe a transcrição de CHS (primeiro passo para a biossíntese de flavonóides) mas induz a atividade da HQT. A medida que os intermediários da via se tornam progressivamente limitantes há uma indução parcial de CHS e supressão de HQT, assegurando uma síntese contínua de flavonóides e contribuindo para a mudança do ácido clorogênico para a acumulação de rutina sob condições de baixo fluxo global na via nestas plantas (Bate et al. 1994). Em contraste, ácido *p*-cumárico adicionado de forma exógena (0,5 mM) estimulou a expressão de um promotor de chalcona sintase de feijão (*chs*) fundido ao gene repórter de cloranfenicol acetiltransferase (CAT) em até 4,5 vezes em protoplastos de alfafa, enquanto que o ácido cinâmico reduziu expressivamente a expressão de *chs* (Loake et al., 1991).

Os resultados com células tratadas de *M. laevigata* mostraram que células desta espécie parecem ser bastante sensíveis a dose aplicada de ácido *p*-cumárico, que teve efeito tanto positivo quanto negativo nos níveis endógenos de ácido 5-cafeoilquínico e dicafeoilquínico. Devido a ligação entre as ações de ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico na modulação de muitas rotas dentro da via dos fenilpropanóides, ensaios com ácido cinâmico em culturas de células de *Mikania* contribuiriam para definir o papel dos dois compostos na modulação dos metabólitos secundários estudados, principalmente dos dois ácidos clorogênicos majoritários. Além disso, a regulação de enzimas biossintéticas da via dos fenilpropanóides em suspensões celulares são, na sua maioria, rápidas e transitórias (Dixon et al. 1980), portanto seria interessante verificar também a modulação na síntese desses produtos em intervalos menores de tempo de tratamento.

6. Conclusão

Os resultados apresentados nesta dissertação de mestrado sugerem o emprego da cultura de células de *M. glomerata* como um modelo biológico viável para aplicação em experimentos associados ao estudo da via de biossíntese de cumarina e de ácido clorogênico. Apesar dos resultados positivos com calos de *M. laevigata* sugerir um potencial para a cultura de células desta planta, suas suspensões celulares se mostraram muito instáveis entre os tratamentos e produziram baixas concentrações de cumarina e de ácido clorogênico. Dessa forma, seria preciso aprimorar as condições de cultivo e avaliar o período de ocorrência de variações somaclonais para essa espécie antes de indicá-la como possível modelo para estudos futuros.

Foi possível verificar clara diferença entre as culturas de células das duas espécies de guaco estudadas, tanto no crescimento das culturas, que é mais acelerada em *M. glomerata*, quanto no perfil químico dos extratos EtOH 70% das culturas de células vegetais. Contudo, a maior diferença entre as culturas envolve a modulação da via de biossíntese de cumarina e dos ácidos clorogênicos, indicando que diferenças intrínsecas na regulação da via dos fenilpropanóides levariam ao acúmulo de cumarina em *M. laevigata* e de ácidos clorogênico em *M. glomerata*. Portanto, os dados apontam para que *M. laevigata* e *M. glomerata* não sejam usadas de forma intercambiável.

A continuidade dos estudos se faz necessária para aprimorar os estudos com as culturas de células de guaco, com o intuito de aumentar e manter constante a produção de metabólitos secundários *in vitro* e para se obter maiores informações e buscar entender melhor os processos biossintéticos e metabólicos nessas duas espécies vegetais, agregando qualidade a seus fitoderivados.

10. Referências Bibliográficas

- Almeida CL, Xavier RM, Borghi AA, Santos VF, Sawaya ACHF (2017) Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultz and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC–MS/MS. *International Journal of Mass Spectrometry* 418: 162–172.
- ANVISA, Instrução Normativa N°5 de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado".
- Bate NJ, Orr J, Ni W, Meromi A, Nadler-Hassar T, Doerner PW, Dixon RA, Lamb CJ, Elkind Y (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(16): 7608-7612
- Benko-Iseppon AM, Crovella S (2011) Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: state of art and perspectives. *Current Protein Peptide Science* 11: 189-94
- Bighetti AE, Antônio MA, Kohn LK, Rehder VLG, Foglio MA, Possenti A (2005) Antitumorogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. *Phytomedicine* 12: 72-77.
- Blom TJM, Kreis W, van Iren E e Libbenga KR (1992) A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. *Plant Cell Reports* 11: 146-149
- Boeger MRT, Alquini Y, Negrelle RRB (2004) Características anatômicas da região nodal de estacas em diferentes fases de desenvolvimento de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel - Asteraceae) e formação de raízes adventícias. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 6: 1-6
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546.
- Bolina RC, Garcia EE, Duarte MGR (2009) Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19: 294-298.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839–851

- Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, Matern U (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews* 5: 293–308.
- Bolwell GP, Cramer CL, Lamb CJ, Schuch W, Dixon RA (1986) L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: modulation of the levels of active enzymes by trans-cinnamic acid. *Planta* 169: 97–107.
- Brandão MGL, Zanetti NN, Oliveira GR, Goulard LO, Monte-Mor RL (2008) Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 127-134
- Calzada F, Velázquez C, Cedillo-Rivera R e Esquivel B (2003) Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytotherapy Research* 17: 731–732.
- Carvalho, J.M.F.C. Técnicas de micropropagação. Campina Grande: Embrapa - CNPA, 1999 p.39 (Embrapa-CNPA. Documento, 64).
- Carvalho AC, Balbino EE, Maciel A, Perfeito, JP (2008) Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 314-319
- Carvalho AC, Lanaa TN, Perfeito JP, Silveira D (2018) The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 212: 29–35.
- Celeghini RMS, Vilegas JHY, Lancas FM (2001) Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12:706-709.
- Choi J, Park JK, Lee KT, Park KK, Kim WB, Lee JH, Jung HJ, Park HJ (2005) In vivo antihepatotoxic effects of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and the identification of the active component, 3, 4-dicaffeoylquinic acid. *Journal of Medicinal Food* 8: 348–352
- Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y, Prinsen E, Jansen MAK (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69: 2149–2156.
- Clifford MN, Jaganath IB, Ludwig IA, Crozier A (2017) Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports* 34(12): 1391-1421.

- Costa VCO, Borghi AA, Mayer JLS, Sawaya ACHF (2017) Comparison of the morphology, anatomy, and chemical profile of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*. *Planta Medica* 84(3): 191-200.
- Dewick, PM *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, ed. John Wiley & Sons, 1997, 467p
- Dixon RA, Browne T e Ward M (1980) Modulation of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase by pathway intermediates in cell suspension cultures of dwarf french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Planta* 150: 279-285.
- Dong YS, Fu CH, Su P, Xu XP, Yuan J, Wang S, Zhang M, Zhao CF, Yu LJ (2016) Mechanisms and effective control of physiological browning phenomena in plant cell cultures. *Physiologia Plantarum* 156(1): 13-28.
- Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C (2004) Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14: 6-8.
- Edahiro JI, Nakamura M, Seki M e Furusaki S (2005) Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of l-phenylalanine into the medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99: 43–47.
- Escamilla-Treviño LL, Shen H, Hernandez T, Yin Y, Xu Y, Dixon R (2014) Early lignina pathway enzymes and routes to chlorogenic acid in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Molecular Biology* 84: 565–576.
- Esposito A, Fiorentino A, D'Abrosca B, Izzo A, Cefarelli G, Golino A e Monaco P (2008) Potential allelopathic interference of *Melilotus neapolitana* metabolites on three coexisting species of Mediterranean herbaceous plant community. *Journal of Plant Interactions* 3(3): 199-210
- Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 1 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929.
- Farmacopéia Brasileira 2005. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, sexto fascículo.
- Ferreira FP e Oliveira, DCR (2010) New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. *Tetrahedron Letters* 51: 6856-6859
- Fett Neto AG, Zhang WY, DiCosmo F (1994a) Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 205–210.

- Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson SA, Pennington JJ e Dicosmo F (1994b) Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 967–971.
- Fischer R, Vasilev N, Twyman R M, Schillberg S (2015) High-value products from plants: The challenges of process optimization. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 156–162.
- Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Rezin GT, Rocha J, Citadini-Zanette V, Romao PT, Dal-Pizzol F, Pinho RA, Andrade VM, Streck EL (2008) Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. *Journal of Medicinal Food* 11: 761-766.
- Gasparetto JC, Campos FR, Budel JM, Pontarolo R (2010) *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20: 627-640
- Gasparetto J, de Francisco TMG, Pantarolo R (2013) Chemical constituents of *Mikania glomerata* Spreng and *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker. *Journal of Medicinal Plants Research* 7: 753-765.
- Gestetner B, Conn EE (1974) The 2-hydroxylation of trans-cinnamic acid by chloroplasts from *Melilotus alba* Desr. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 163(2): 617-24
- Graça C, Baggio CH, Freitas CS, Rattmann YD, Souza LM, Cipriani TR, Sasaki GL, Rieck L, Pontarolo R, Santos JE, Marques MCA (2007) In vivo assessment of safety and mechanisms underlying in vitro relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. *Journal of Ethnopharmacology* 112: 430-439.
- Hout JRS, Payá M (1996) Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology* 27: 713-722.
- Howles PA, Sewalt V, Paiva NL, Elkind Y, Bate NJ, Lamb C, Dixon RA. (1996) Overexpression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis'. *Plant Physiology* 112: 1617-1624.
- Islam S (2006) Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf: its potential effect on human health and nutrition. *Journal of Food Science* 71: R13–R121

- Jiménez, VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.
- Kleinhofs A, Haskins FA, Gorz, HJ (1967) Trans-o-hydroxycinnamic acid glucosylation in cell-free extracts of *Melilotus alba*. *Phytochemistry* 6: 1313-1318.
- Kosuge T, Conn EE (1959) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. I. Coumarin and o-coumaric acid. *Journal of Biological Chemistry* 234(8): 2133-7.
- Kosuge T, Conn EE (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. III. The beta-glucosides of o-coumaric, coumarinic, and melilotic acids. *Journal of Biological Chemistry* 236: 1617-21.
- Krikorian AD, Berquam DL (1969) Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. *The Botanical review* 35: 59-88.
- Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauhan N, Eftekhari M, Sadh RK (2016) Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6(1): 54.
- Lallemand LA, Zubieta C, Lee SG, Wang Y, Acajjaoui S, Timmins J, McSweeney S, Jez JM, McCarthy JG, McCarthy AA (2012) A structural basis for the biosynthesis of the major chlorogenic acids found in coffee. *Plant Physiology* 160(1): 249-60.
- Lamb CJ (1979) Regulation of enzyme levels in phenylpropanoid biosynthesis: Characterization of the modulation by light and pathway intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 192: 311-317.
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60(4): 197-214.
- Leite MGR, Souza CL, Silva MAM, Moreira LKA, Matos FJA, Viana GSB (1993) Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearenses* (cumaru). *Revista Brasileira de Farmácia* 74: 12-15.
- Lima NP, Biasi LA, Zanette F, Nakashima T (2003a) Estaquia semilenhosa e análise de metabólitos secundários de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 5: 47-54
- Lima NP, Biasi LA, Zanette F, Nakashima T (2003b) Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. *Horticultura Brasileira* 21:106-109.

- Loake GJ, Choudhary AD, Harrison MJ, Mavandad M, Lamb CJ, Dixon RA (1991) Phenylpropanoid pathway intermediates regulate transient expression of a chalcone synthase gene promoter. *Plant Cell* 3: 829-840
- Malik S, Mirjalili M, Fett-Neto A, Mazzafera P e Bonfill, M (2013) Living between two worlds: Two-phase culture systems for producing plant secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 33(1): 1-22.
- Manela N, Oliva M, Ovadia R, Sikron-Persi N, Ayenew B, Fait A, Galili G, Perl A, Weiss D, Oren-Shamir M (2015) Phenylalanine and tyrosine levels are rate-limiting factors in production of health promoting metabolites in *Vitis vinifera* cv. Gamay Red cell suspension. *Frontiers in plant science* 6: 538.
- Margna U (1977) Control at the level of substrate supply—an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry* 16: 419-426.
- Matsuura HN, Malik S, de Costa F, Yousefzadi M, Mirjalili MH, Arroo R, Bhambra AS, Strnad M, Bonfill M, Fett-Neto AG (2017) Specialized plant metabolism characteristics and impact on target molecule biotechnological production. *Molecular Biotechnology* 60(2): 169-183.
- Melo LV (2013) Avaliação da estabilidade de extratos hidroalcoólicos de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas 72p (Dissertação de Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Melo LV, Sawaya ACHF (2015) UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25 (2): 105–110
- Mhlongo MI, Steenkamp PA, Piater LA, Madala, NE e Dubery IA (2016) Profiling of altered metabolomic states in *Nicotiana tabacum* cells induced by priming agents. *Plant Science* 7: 1527.
- Mirjalili N, Linden JC (1996) Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models. *Biotechnology Progress* 12(1): 110-8.
- Moglia A, Lanteri S, Comino C, Acquadro A, de Vos R, Beekwilder J (2008) Stress-induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(18): 8641-9.

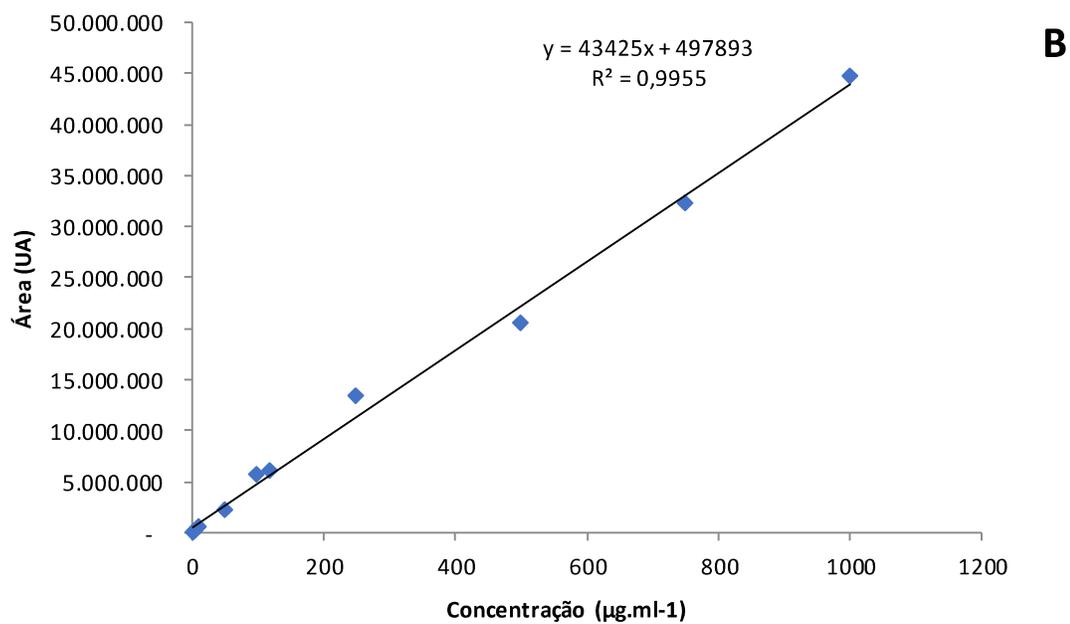
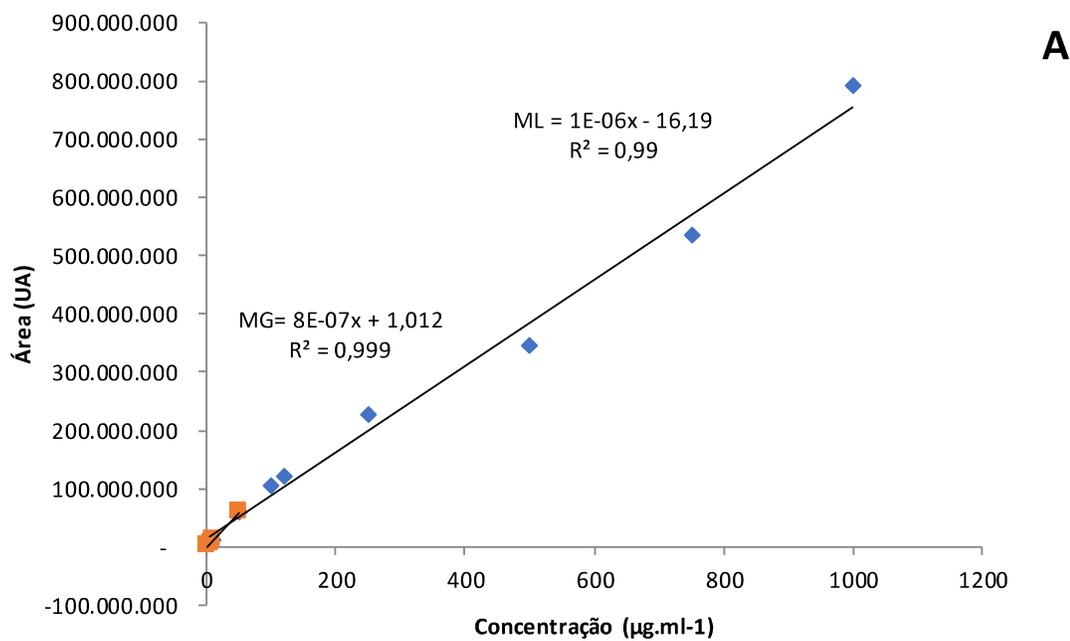
- Moglia A, Lanteri S, Comino C, Hill L, Knevt D, Cagliari C, Rubiolo P, Bornemann S e Martin C (2014) Dual catalytic activity of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase from tomato allows it to moonlight in the synthesis of both mono- and dicaffeoylquinic acids. *Plant Physiology* 166: 1777–1787.
- Moura SR, Costa SS, Jansen JM, Silva CA, Lopes CS, Bernardo-Filho M, Silva VN, Criddle DN, Portela BN, Rubenich LMS, Araújo RG, Carvalho CRM (2002) Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54: 249-256.
- Mouton J e Van der Kooy F (2014) Identification of cis- and trans- Melilotoside within an *Artemisia annua* Tea Infusion. *European Journal of Medicinal Plants* 4: 52-63.
- Murashige, T.; Skoog, F (1962) A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Mustafa NR, de Winter W, van Iren F, Verpoorte R (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols* 6(6): 715-42.
- Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, Fang Fang X, Modarresi-Ghazani F, Wen Hua, Li, Xiao Hui Z (2018) Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 97: 67–74.
- Niggeweg R1, Michael AJ, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22(6): 746-54.
- Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong S, Jang M O, Jin YW, Lee EK e Loake GJ (2016) Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports* 49(3): 149–158.
- Oksman-Caldentey KM and Inzé D (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9(9): 433-440
- Okuyama CE, Bitencourt JGG, Oliveira DAF, Oliveira MS, Barbosa RSS, Sawaya ACHF, Eberlin MN (2011) Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity, and cytotoxicity of extracts of *Mikania laevigata* Schultz bip (Asteraceae). *Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica* 3(1): 29-35.
- Oliva M, Ovadia R, Perl A, Bar E, Lewinsohn E, Galili G, Oren-Shamir M (2015) Enhanced formation of aromatic amino acids increases fragrance without affecting flower longevity or pigmentation in *Petunia* × *hybrid*. *Plant Biotechnology Journal* 13(1): 125-36.

- Oliveira F, Oga S, Akisue G, Akisue MK (1985) Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco de mato (*Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker). Anais de farmácia e química de São Paulo 25: 50-54.
- Orr JD, Edwards R e Dixon RA (1993) Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIV. Changes in the levels of phenylpropanoid pathway intermediates in relation to regulation of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase in elicitor-treated cell-suspension cultures. Plant Physiology 101: 847-856
- Pavlov AI, Georgiev MI, Panchev IN e Ilieva MP (2005) Optimization of rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM plant cell suspension in a laboratory bioreactor. Biotechnology Progress 21: 394–396
- Pereira NA, Pereira BMR, Nascimento MC, Parente JP, Mors WB (1994) Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. Planta Medica 60: 99-100
- Pereira, AMS, França, CS e Câmara FLA (1999) Coumarin production in *Mikania glomerata* callus. Acta Horticulturae 502: 357-362.
- Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias-Filho BP, Nakamura CV (2003) Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. Revista Brasileira de Farmacognosia 13: 21-24.
- Pinto AC, Silva DHS, Bozani VS, Lopes NP, Epifanio RA (2002) Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova 25:45-61.
- Portaria GM N°3.237, Ministério da Saúde (2007) Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde.
- Poulton JE, McRee DE, Conn EE (1980) Intracellular localization of two enzymes involved in coumarin biosynthesis in *Melilotus alba*. Plant physiology 65:171-175
- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153
- Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusido RM (2016) Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. Molecules 21(2): 182.
- Rufatto LC, Gower A, Schwambach J, Moura S (2012) Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. Revista Brasileira de Farmacognosia 22: 1384–1403.

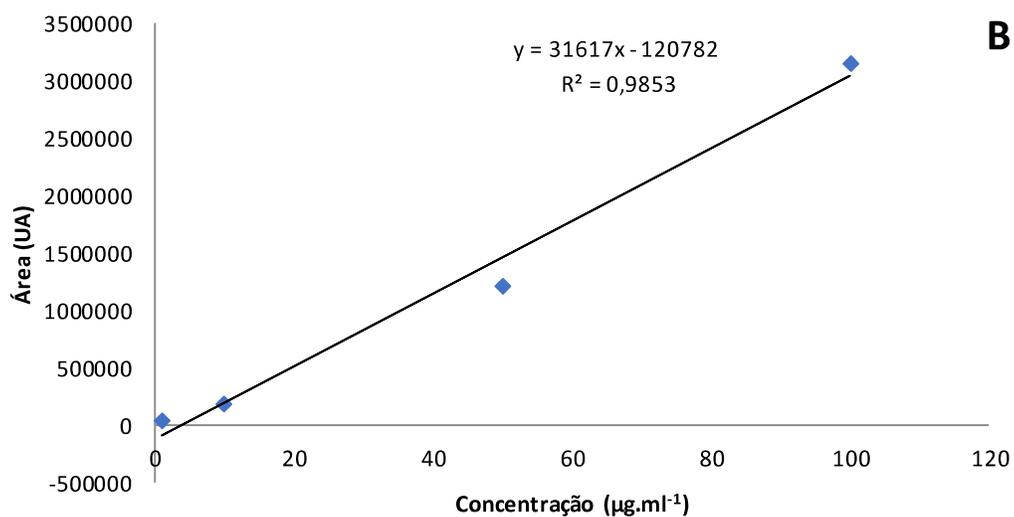
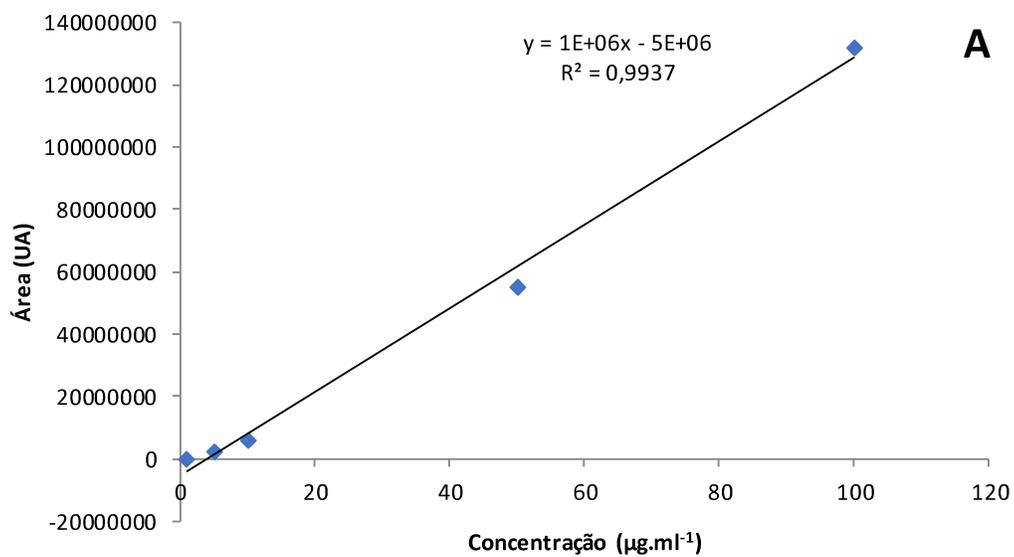
- Salgado HRN, Roncari AFF, Moreira RRD (2005) Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15: 205-208.
- Schillmiller AL, Stout J, Weng J-K, Humphreys J, Ruegger MO, Chapple C (2009) Mutations in the Cinnamate 4-Hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 60: 771-782
- Silva CRD, Gomes VS, Kulkamp IC, Kanis LA (2008) Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 594-599
- Silveira PF, Bandeira MAM, Arrais PSD (2008) Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 618-26
- Singh K, Kumar S, Rani A, Gulati A, Ahuja P (2009) Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Functional & Integrative Genomics* 9: 125-134
- Tajik N, Tajik M, Mack I, Enck P (2017) The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition* 1: 1-30.
- Tamura H, Akioka T, Ueno K, Chujyo T, Ki Okazaki, King PJ, Robinson WE Jr (2006) Anti-human immunodeficiency virus activity of 3, 4, 5-tricaffeoylquinic acid in cultured cells of lettuce leaves. *Molecular Nutrition & Food Research* 50: 396-400
- Thorpe, TA (2007) History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180
- Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa, ML (2006) Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. *Texto & Contexto Enfermagem* 15: 115-21.
- Valiñas MA, Lanteri ML, ten Have A, Andreu AB (2015) Chlorogenic acid biosynthesis appears linked with suberin production in potato tuber (*Solanum tuberosum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(19): 4902-13.
- Veneziani RCS, Camilo D, Oliveira R (1999) Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 99-102
- Vickery ML (1981) Sugar metabolism. In *Secondary Plant Metabolism*. University Park Press, Baltimore, MD, pp 32-41
- Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA (1998) Plant derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Medica* 64: 97-109.

- Vogt T (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 69: 233-249.
- Williams EG and Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.
- White PR (1951) Nutritional requirements of isolated plant tissue and organs. *Annual review of plant biology* 2: 231-244.
- Yang L, Han H, Nakamura N, Hattori M, Wang Ze Xu L (2007) Bio-guided isolation of antioxidants from the stems of *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum*. *Phytotherapy Research* 21: 696-698.
- Yatsuda R, Rosalen PL, Cury JA, Murata, RM, Rehder VLG, Melo LV, Koo H (2005) Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of *Mutans streptococci*. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 183-189.
- Zanardo DIA, Lima RB, Ferrarese MLL, Bubna GA, Ferrarese-Filho O (2009) Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany* 66: 25-30.
- Zhang X and Liu CJ (2015) Multifaceted regulations of gateway enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Molecular Plant*. 8: 17-27.
- Zucker, M (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* 40: 779-788.

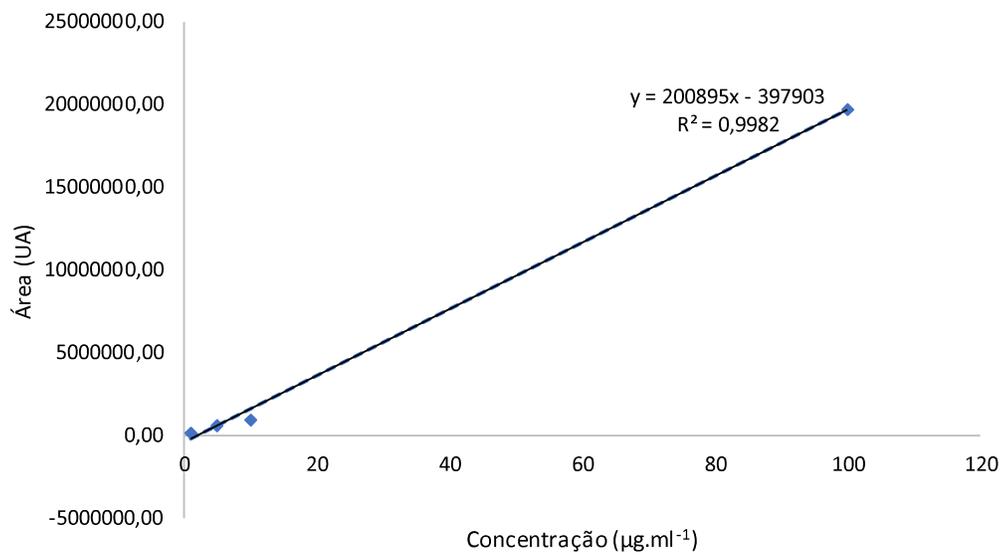
Anexos



Anexo 1. Curva analítica obtida pela análise de soluções de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de cumarina (A) e ácido clorogênico (B). UA= unidade arbitraria.



Anexo 2. Curva analítica obtida pela análise de soluções de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de cumarina (A) e ácido clorogênico (B). UA= unidade arbitrária.



Anexo 3. Curva analítica obtida pela análise de soluções de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de padrão de ácido *o*-cumárico. UA= unidade arbitrária.

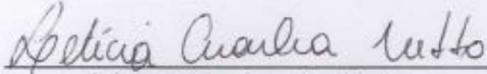


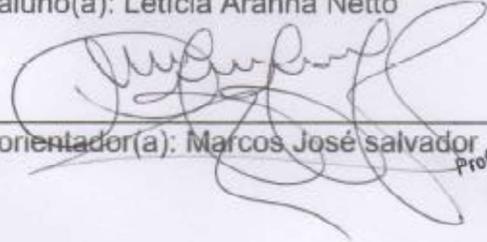
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgilb@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Emprego da cultura de tecidos e células vegetais como modelo experimental aplicado ao estudo da via de biossíntese de cumarina e de ácido clorogênico em Mikania glomerata e Mikania laevigata (Asteraceae)*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Letícia Aranha Netto

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Marcos José Salvador

Prof. Dr. Marcos José Salvador
Depto. Biologia Vegetal/IB
Matrícula Unicamp 29329-3

Data: 16 de Julho de 2018

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Emprego da cultura de tecidos e células vegetais como modelo experimental aplicado ao estudo da via de biossíntese de cumarina e de ácido clorogênico em Mikania glomerata e Mikania laevigata (Asteraceae)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de julho de 2018

Assinatura : Leticia Aranha Netto

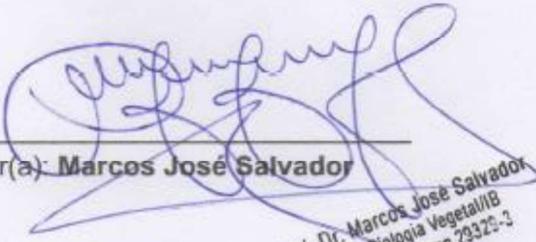
Nome do(a) autor(a): **Leticia Aranha Netto**

RG n.º 371220919

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Marcos José Salvador**

RG n.º 21878723


Prof. Dr. Marcos José Salvador
Deplo. Biologia Vegetal/IB
Matrícula Unicamp 29320-3