

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -  
AGRONOMIA

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR  
ELICITAÇÃO ABIÓTICA EM PLÂNTULAS DE  
*Anacardium othonianum* RIZZ CULTIVADAS *in vitro***

Autora: Ana Paula Gazolla  
Orientadora: Profa. Dra. Juliana de Fátima Sales

Rio Verde – GO  
julho – 2014

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -  
AGRONOMIA

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR  
ELICITAÇÃO ABIÓTICA EM PLÂNTULAS DE  
*Anacardium othonianum* RIZZ CULTIVADAS *in vitro***

Autora: Ana Paula Gazolla  
Orientadora: Profa. Dra. Juliana de Fátima Sales

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde - Área de concentração “Produção Vegetal Sustentável no Cerrado”.

Rio Verde – GO  
julho – 2014

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -  
AGRONOMIA

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR  
ELICITAÇÃO ABIÓTICA EM PLÂNTULAS DE  
*Anacardium othonianum* RIZZ CULTIVADAS *in vitro***

Autora: Ana Paula Gazolla  
Orientadora: Profa. Dra. Juliana de Fátima Sales

*Titulação:* Mestre em Ciências Agrárias – Agronomia, Área de Concentração -  
“Produção Vegetal Sustentável no Cerrado”

APROVADA em 31 de julho de 2014.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Helena Januário  
*Avaliadora externa*  
UNIFRAN

Dr.<sup>a</sup> Alessandra Cristina B. A. M. Hara  
*Avaliadora interna*  
IF Goiano – *Campus* Rio Verde

Prof. <sup>a</sup>Dr. <sup>a</sup>Juliana de Fátima Sales  
*Presidente da banca*  
IF Goiano – *Campus* Rio Verde

## **DEDICATÓRIA**

*“Qualquer homem pode alcançar o êxito, se dirigir seus pensamentos numa direção e insistir neles até que aconteça alguma coisa.” - Thomas Edison*

Dedico este trabalho aos meus pais  
José Roberto e Valdenice e ao meu irmão  
Paulo Roberto.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Aos meus pais, que muito se sacrificaram para que eu chegasse até aqui, apoiando incondicionalmente em todas as situações.

Ao meu irmão pelo apoio, amizade e conselhos.

Ao Instituto Federal Goiano, *Campus* Rio Verde e ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia.

Aos professores e servidores do programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Juliana de Fátima Sales, por me dar a oportunidade de ingressar no mestrado e por sempre me receber com muita educação e gentileza, estando sempre de portas abertas.

Ao meu coorientador Dr. Fabiano Guimarães Silva, por oferecer toda a estrutura de laboratório necessária para o cultivo das plântulas.

À minha coorientadora Dr.<sup>a</sup> Ana Helena Januário, por ter me recebido tão bem no Laboratório de Produtos Naturais da UNIFRAN, para a execução de todo o estudo químico. Pelas conversas, conselhos, motivação, por me ensinar a olhar as dificuldades com mais leveza, e a acreditar que coisas boas e inesperadas sempre podem acontecer. As três semanas que passei em Franca foram muito importantes, serei sempre grata!

À minha “amiga orientadora” Dr.<sup>a</sup> Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro Hara, por me receber no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e ensinar todas as técnicas necessárias para o cultivo *in vitro*. Por ouvir, aconselhar, acalmar, motivar e doar toda sua amizade, respeito, gentileza, a mim e a todos a sua volta. Por ser

essa pessoa de sorriso espontâneo e sincero. Toda a minha gratidão e admiração! Sem a sua ajuda a minha caminhada teria sido muito mais árdua.

Às amigas e colegas de laboratório Marlete, Rita, Núbia e Lorraine, que me ajudaram incontáveis vezes nos trabalhos de bancada. Pelas várias vezes que estiveram comigo nas noites, fins de semanas, feriados e “férias”. Muito Obrigada, sem a ajuda de vocês o trabalho teria sido muito mais longo.

Aos demais integrantes da equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos, Eduard, Jailma, Aurélio, Jefté, Juliana Cabral, Letícia, Rafael, pela convivência, amizade e colaboração.

Aos orientados da professora Ana Helena, Letícia, Luís e Fernanda, por toda a colaboração. Meu agradecimento e admiração pela humildade e comprometimento de cada um no que fazem.

Às colegas de mestrado e amigas, Renata, Liliane, Jehane, Vaneça e Yasmin que tornaram o cotidiano mais leve e divertido, mesmo durante as sofridas disciplinas de Estatística Experimental, Seminários e Fisiologia Vegetal. Vocês que sempre compartilharam as alegrias e as tristezas, e sempre me disseram palavras de conforto e incentivo, acreditando na minha capacidade mais do que eu mesma.

Aos familiares e amigos, que de alguma forma me incentivaram, apoiaram e torceram por mim.

*“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos. A felicidade aparece para aqueles que choram. para aqueles que se machucam, para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passaram por suas vidas.”*

Clarice Lispector

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

ANA PAULA GAZOLLA, filha de José Roberto Gazolla e Valdenice Alves Flores Gazolla, nasceu no dia 18 de junho de 1990, na cidade de Montividiu – Goiás.

Em fevereiro de 2008, ingressou no curso de Farmácia, na Universidade de Rio Verde (Fesurv), graduando-se em dezembro de 2011.

Em agosto de 2012, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, no Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, sob a orientação da professora Dr.<sup>a</sup> Juliana de Fátima Sales.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	10
ÍNDICE DE FIGURAS .....	11
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES .....	13
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	16
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL .....	18
1.1 Caracterização botânica do <i>Anacardium othonianum</i> Rizz .....	19
1.2 Perfil farmacológico do gênero <i>Anacardium</i> .....	21
1.3 Cerrado brasileiro .....	22
1.4 Compostos fenólicos .....	23
1.4.1 Ácido gálico .....	26
1.4.2 Ácido 3,4-diidroxibenzóico .....	27
1.4.3 Amentoflavona .....	28
1.5 Cultivo <i>in vitro</i> e elicitação .....	29
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA LUZ NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLÂNTULAS <i>in vitro</i> DE <i>Anacardium othonianum</i> RIZZ. ....	37
RESUMO .....	37
CAPÍTULO 2 – INFLUENCE OF QUALITY OF LIGHT IN THE PRODUCTION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN SEEDLINGS <i>in vitro</i> OF <i>Anacardium othonianum</i> RIZZ. ....	38
2.1 INTRODUÇÃO .....	39
2.2 METODOLOGIA .....	40

2.2.1	Material vegetal e cultivo <i>in vitro</i> .....	40
2.2.2	Crescimento das plântulas .....	43
2.2.3	Constituição química dos extratos vegetais .....	43
2.2.3.1	Preparo das soluções estoque e construção da curva dos padrões externos	43
2.2.3.2	Obtenção dos extratos brutos .....	44
2.2.3.3	Análise cromatográfica .....	44
2.2.4	Delineamento experimental .....	45
2.3	RESULTADOS .....	45
2.3.1	Composição espectral do Ambiente de cultivo.....	45
2.3.2	Crescimento .....	46
2.3.3	Análise quantitativa por CLAE-DAD do ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e amentoflavona.....	48
2.3.3.1	Curva padrão de calibração.....	48
2.4	DISCUSSÃO.....	54
2.5	CONCLUSÕES.....	55
2.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CAPÍTULO 3 – USO DE ELICITORES ABIÓTICOS NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS <i>in vitro</i> EM <i>Anacardium othonianum</i> RIZZ .....		58
RESUMO .....		58
ABSTRACT .....		59
3.1	INTRODUÇÃO .....	60
3.2	METODOLOGIA .....	62
3.2.1	Material vegetal e cultivo <i>in vitro</i> .....	62
3.2.2	Constituição química dos extratos vegetais .....	64
3.2.2.1	Preparo das soluções estoque e construção da curva dos padrões externos	64
3.2.2.2	Obtenção dos extratos brutos .....	64
3.2.3	Delineamento experimental .....	65
3.3	RESULTADOS .....	65
3.3.1	Crescimento .....	65
3.3.2	Análise da constituição química dos extratos vegetais .....	68
3.3.3	Curva padrão de calibração.....	68
3.3.4	Quantificação de ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e amentoflavona	71
3.4	CONCLUSÕES.....	76
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

## ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2	Página
Tabela 1. Composição espectral em porcentagem, dos comprimentos de onda das fontes de luz utilizadas.....	42
Tabela 2. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas expandidas de plântulas de <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. <i>in vitro</i> submetidas a diferentes tempos de avaliação. ....	46
Tabela 3. Acúmulo de massa fresca e seca de plântulas de <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. aos 40 dias após exposição aos diferentes comprimentos de onda de luz .....	47
CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Comprimento médio de parte aérea de plântulas de <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. <i>in vitro</i> em diferentes tipos de elicitores e tempos de exposição.....	66
Tabela 2. Número médio de folhas expandidas de plântulas de <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. <i>in vitro</i> em diferentes tipos de elicitores e tempos de exposição.....	66
Tabela 3. Número médio de folhas expandidas de plântulas de <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de elicitores. ....	67
Tabela 4. Médias dos valores obtidos de massa fresca e seca de plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz. aos 30 dias após exposição aos diferentes elicitores. ....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Página
Figura 1. Variabilidade da coloração e forma do pseudofruto de <i>A. othonianum</i> Rizz., de frutos oriundos de plantas diferentes com mesmo grau de maturação (A), (B), (C), (D).....	20
Figura 2. Estrutura fundamental dos fenóis simples.....	24
Figura 3. Estrutura fundamental dos taninos.....	25
Figura 4. Estrutura química fundamental dos flavonoides.....	25
Figura 5. Estrutura básica dos ácidos benzoicos (a) e ácidos cinâmicos (b).....	26
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Semeadura de <i>A. othonianum</i> Rizz em bandejas plásticas contendo areia como substrato (A); Plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz. com 30 dias após semeadura (B). .....	41
Figura 2. Lâmpadas e distribuições de energia espectral das fontes de luz utilizadas....	40
Figura 3. Plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz. aos 0 (A), 20 (B) e 40 (C) dias. (T1 = Luz branca; T2 = Luz azul; T3 = Luz verde; T4 = Luz vermelha; T5 = Luz amarela).....	45
Figura 4. Curvas padrão de calibração dos padrões plotadas através da área do pico versus concentração em mg mL <sup>-1</sup> .....	45
Figura 5. Teores e rendimento de ácido gálico (A e B), ácido 3,4-diidroxibenzoico (C e D) e amentoflavona (E e F) em plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz., submetidas a	

diferentes comprimentos de onda de luz.....	47
Figura 6. Perfil cromatográfico do ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona, obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz. cultivadas sob luz branca (A), azul (B), verde (C), vermelha (D) e amarela (E).....	50
Figura 7. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir dos extratos metanólicos de <i>A. othonianum</i> Rizz. cultivados sob luz branca, azul, verde, vermelha e amarela.....	50
Figura 8. Espectros de UV do ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona. ....	51

### CAPÍTULO 3

Figura 1. Curvas padrão de calibração dos padrões plotadas através da área do pico versus concentração em $\text{mg mL}^{-1}$ .....	65
Figura 2. Teor e rendimento de ácido gálico (A e B), ácido 3,4-diidroxibenzoico (C e D) e amentoflavona (E e F) em plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz, submetidas a diferentes concentrações de $\text{AgNO}_3$ e SA.....	67
Figura 3. Perfil cromatográfico do ácido gálico (1), ácido 3,4-diidroxibenzoico (2) e amentoflavona (3), obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz. cultivadas sob $\text{AgNO}_3$ 30 $\mu\text{M}$ (A), $\text{AgNO}_3$ 60 $\mu\text{M}$ (B), SA 30 $\mu\text{M}$ (C), SA 60 $\mu\text{M}$ (D). ....	71
Figura 4. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir dos extratos metanólicos de <i>A. othonianum</i> Rizz. cultivados sob ausência de elicitor, $\text{AgNO}_3$ 30 $\mu\text{M}$ , $\text{AgNO}_3$ 60 $\mu\text{M}$ , SA 30 $\mu\text{M}$ e SA 60 $\mu\text{M}$ . ....	72
Figura 5. Espectros de UV do ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona. ....	72

## **LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES**

**$\mu$ W** – microwatts

**AG** – ácido gálico

**AgNO<sub>3</sub>** – Nitrato de Prata

**BAP** – 6-benzilaminopurina

**MF** – massa fresca

**MS** – massa seca

**MS** – Murashigue e Skoog (meio de cultivo)

**nm** – nanômetro

**S** – Sul

**SA** – ácido salicílico

**W** – Oeste

## RESUMO

GAZOLLA, Ana Paula, M.Sc., Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, julho de 2014. **Produção de compostos fenólicos por elicitación abiótica em plântulas micropropagadas de *Anacardium othonianum* Rizz.** Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Juliana de Fátima Sales. Coorientadores: Ana Helena Januário e Fabiano Guimarães Silva.

O Cerrado é considerado um dos domínios de maior biodiversidade vegetal do mundo, e por estar em contato com outros biomas, o mesmo possui grande número de espécies vegetais. Dentre essas espécies, o *Anacardium othonianum* Rizz., se destaca, pois além de fornecer produtos de importância econômica, como doces, sucos, resinas, castanhas, dentre outros, também possui várias propriedades farmacológicas. Em virtude do grande potencial desta espécie, torna-se interessante a utilização das técnicas de cultura de tecidos, como a micropropagação, que contribui para a produção de mudas que auxiliam na preservação da espécie e além disso, possibilita o emprego de técnicas que promovem o aumento da produção de substâncias de interesse, como o uso de diferentes intensidades e comprimentos de onda de luz, e uso de substâncias químicas como ácido salicílico, pectina, nitrato de prata, etc. Não há relatos sobre o cultivo *in vitro* de *A. othonianum* Rizz, sob elicitación abiótica, assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da elicitación abiótica em plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. Foram utilizados como elicitores, diferentes comprimentos de luz nos espectros branco, azul, verde, vermelho e amarelo. Além destes, o ácido salicílico e o AgNO<sub>3</sub> (nitrato de prata) foram utilizados também como elicitores. Plântulas previamente estabelecidas permaneceram de 30 a 40 dias sob elicitación e foram avaliados o comprimento de parte aérea, o número de folhas, a massa fresca e seca e o teor de cada composto fenólico nas amostras. Para as plântulas submetidas ao tratamento de luzes foi observado maior

comprimento de parte aérea aos 40 dias (5,54 cm) e o maior número de folhas aos 20 e 40 dias (2,46 e 2,86). Os maiores acúmulos de massa fresca e seca foram observados pelas plântulas cultivadas sob as luzes vermelha e amarela, aos 40 dias. Maior teor e rendimento de ácido gálico foram observados em plântulas cultivadas sob luz azul (0,66 mg g<sup>-1</sup> MS e 0,17 µg plântula<sup>-1</sup>). As plântulas cultivadas sob luz vermelha tiveram aumento no teor e rendimento de ácido 3,4-diidroxibenzoico. O teor de amentoflavona aumentou nas plântulas cultivadas sob luz azul. Para as plântulas tratadas com ácido salicílico e AgNO<sub>3</sub>, os teores de ácido gálico diminuíram com os tratamentos utilizados, exceto quando se utilizou SA 60 µM (0,31 mg g<sup>-1</sup>MS). O ácido 3,4-diidroxibenzoico foi aumentado em todos os tratamentos utilizados. O mesmo foi observado nos teores de amentoflavona. Os maiores teores de ácido gálico e amentoflavona foram proporcionados pela luz azul. Para o ácido 3,4-diidroxibenzoico a maior concentração foi proporcionada pela luz vermelha.

**PALAVRAS-CHAVES:** elicitores químicos, qualidade da luz, ácido gálico, amentoflavona, ácido 3,4-diidroxibenzoico.

## ABSTRACT

GAZOLLA, Ana Paula, M.Sc., Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, july, 2014. **Production of phenolic compounds by abiotic elicitation in seedlings of *Anacardium Othonianum* Rizz.** Advisor: Dra. Juliana de Fátima Sales. Coadvisor: Ana Helena Januário and Fabiano Guimarães Silva.

The “Cerrado” is considered one of the areas of highest plant biodiversity in the world, and by being in contact with other biomes, it has a large number of plant species. Among these species, *Anacardium othonianum* Rizz., stands out because in addition to provide products of economic importance, such as sweets, juices, resins, nuts, among others, also has several pharmacological properties. Due to the great potential of this specie, it becomes interesting to use tissue culture techniques such as micropropagation, which contributes to the production of plants and assist in the specie preservation, also, allows the use of techniques that promote increased production of interest substances, such as the use of different intensities and wavelengths of light, and the use of chemicals as salicylic acid, pectin, silver nitrate, etc. There are no reports about the *in vitro* cultivation of *A. othonianum* Rizz under abiotic elicitation, so the purpose of this study was to evaluate the effect of abiotic elicitation on seedlings of *Anacardium othonianum* Rizz. There were used as elicitors, different wavelengths of light spectra in white, blue, green, red and yellow. In addition, salicylic acid and AgNO<sub>3</sub> (silver nitrate) were also used as elicitors. Previously established seedlings remained 30-40 days under elicitation and were evaluated the length of shoots, number of leaves, fresh and dry weight and the content of each phenolic compound in the samples. To seedlings under treatment of lights was observed a longer length of shoots at 40 days (5.54 cm) and the largest number of leaves at 20 and 40 days (2.46 and 2.86). The highest accumulation of

fresh and dry weight were observed for seedlings grown under red and yellow lights at 40 days. The highest content and yield of gallic acid were observed in seedlings grown under blue light (0.66 mg g<sup>-1</sup> DM and 0.17 mg seedling<sup>-1</sup>). The cultivating seedlings under red light increased content and yield of 3,4- dihydroxybenzoic acid. The content of amentoflavone increased in seedlings grown under blue light. To seedlings treated with salicylic acid and AgNO<sub>3</sub>, the levels of gallic acid decreased with the treatments, except when using SA 60 mM (0.31 mg g<sup>-1</sup>DM). The 3,4- dihydroxybenzoic acid increased in all treatments. The same was observed in the levels of amentoflavone. The highest levels of gallic acid and amentoflavone were provided by blue light. For 3,4- dihydroxybenzoic acid the highest concentration was provided by the red light.

**KEY WORDS:** chemical elicitors, light quality, gallic acid, amentoflavone, 3,4- dihydroxybenzoic acid.

## **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL**

Diversas evidências indicam que as plantas medicinais representam a mais antiga forma de medicação (HALBERSTEIN, 2005), e talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JÚNIOR et al., 2006). Estima-se que o conhecimento sobre remédios de plantas se desenvolveu por meio da observação e experimentação, por muitos séculos. As plantas formam a base da medicina tradicional e contribuíram para a descoberta e desenvolvimento de importantes drogas utilizadas atualmente (GURIB-FAKIN, 2006). O isolamento da morfina no início do século XIX e posteriormente da cocaína, codeína, digoxina, e outros usados até hoje na prática médica, alavancou os estudos utilizando plantas na obtenção de substâncias específicas. (DIXON, 2001; PIETERS e VLIETINCK, 2005).

A medicina tradicional é uma importante ferramenta na bioprospecção de produtos naturais (GAUTAM e JACHAK, 2009). Na busca por novos agentes terapêuticos, as investigações etnobotânicas e etnofarmacológicas têm sido as principais abordagens utilizadas como estratégia de seleção de plantas medicinais para posterior estudo. A observação do uso humano de plantas para fins curativos representa uma das principais fontes de estudo de drogas de origem vegetal (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e desenvolvimento de drogas, não só quando usadas diretamente como agentes terapêuticos, mas também como materiais de partida para a síntese de drogas ou como modelos para compostos farmacologicamente ativos, sendo consideráveis fontes de novas drogas e novas substâncias químicas (BALUNAS e KINGHORN, 2005; GAUTAM e JACHAK, 2009; BALLABENI et al., 2009). Entretanto, a realização de testes com extratos brutos destas plantas é uma ferramenta interessante, pois muitas pesquisas mostram que quando uma planta possui uma determinada atividade, ela não

está necessariamente relacionada a uma única substância ativa (PHILLIPSON, 2003). Um estudo demonstrou que o potencial antimalárico da *Artemisia annua* é maior quando esta é administrada na forma de extrato bruto, uma vez que o extrato, além da artemisinina, é constituído também por flavonoides que potencializam a sua atividade (PHILLIPSON, 2001; BILIA et al., 2006).

Assim, observando a importância das plantas medicinais para a cura de enfermidades, utilizar técnicas para o seu cultivo e exploração se torna uma ferramenta importante para garantir o acesso a estas espécies. A técnica de micropropagação vem sendo bastante utilizada, e possui como vantagens a conservação do germoplasma, a produção de mudas homogêneas e de qualidade, e a seleção e melhoramento de genótipos com potencial farmacológico (RAO e RAVISHANKAR, 2002), permitindo o rápido aumento no número de plantas idênticas a partir de plantas previamente selecionadas e possibilitando a produção constante de mudas durante o ano todo com alta qualidade sanitária (SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).

Além das vantagens supracitadas, essa técnica permite a utilização de elicitores bióticos e abióticos que vêm sendo amplamente empregados em cultura de tecidos vegetais, a fim de maximizar a produção de compostos químicos de interesse, porque essas ferramentas têm sido apontadas como estimuladoras da biossíntese de metabólitos secundários como terpenos, flavonoides, alcaloides, fenilpropanoides, entre outros (BHUIYAN; ADACHI, 2003; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

Assim, associar as espécies que tem atividade terapêutica conhecida e técnicas para cultivá-las proporcionando condições para a produção de compostos de maior interesse se torna importante para alavancar a descoberta e produção de novos fármacos.

### **1.1 Caracterização Botânica do *Anacardium othonianum* Rizz**

De acordo com a classificação de RIZZINI in: (JOLY, 1993), o *Anacardium othonianum* Rizz., tem a seguinte posição sistemática:

Divisão: Magnoliophyta,  
Classe: Magnoliopsida,  
Ordem: Sapindales,  
Família: Anacardiaceae,  
Gênero: *Anacardium*.

O *Anacardium othonianum* Rizz distingue-se das demais espécies do gênero por possuir um porte arbóreo. A altura das plantas e o diâmetro da copa variam, em média, de 3 a 4 metros. O pseudofruto tem forma de pera e sua coloração pode variar do amarelo ao vermelho; internamente, os pseudofrutos possuem coloração branco-amarelada. É uma espécie de grande relevância para região, pois além dos frutos (castanha) e pseudofrutos, essa planta fornece também folhas, cascas, flores e resina à área farmacêutica (SILVA et al., 2001a). O *A. othonianum* Rizz é encontrado em altitudes entre 380 e 1100 m, ocorrendo em maiores densidades, em altitudes acima de 790 m (CORREA et al., 2008).

Esta espécie é adaptada à região do Cerrado, possui tolerância a temperaturas elevadas, períodos de secas e solos ácidos (pH 4,5 – 6,5). Este comportamento de preferência por ambientes desfavoráveis associados aos solos com maiores declividades faz com que esta espécie tenha elevado potencial para preservação e manejo de grandes áreas no Cerrado (VIEIRA et al., 2006).

A castanha, fruto verdadeiro, é um aquênio, cujo pedúnculo se desenvolve em pseudofruto, este possui forma de pera e a coloração pode variar do amarelo ao vermelho (Figura 1). Os pseudofrutos possuem de 2 a 4 cm de comprimento por 2 a 3 cm de diâmetro, com massa variando de 5 a 12 g; contém elevado valor nutritivo, relacionado principalmente ao alto teor de vitamina C. Também é fonte de fibras, rico em compostos fenólicos, em especial taninos, que conferem adstringência ao pedúnculo (SILVA et al., 2001a; PAIVA et al., 2003; LIMA et al., 2004).



**Figura 1.** Variabilidade da coloração e forma do pseudofruto de *A. othonianum* Rizz., de frutos oriundos de plantas diferentes com mesmo grau de maturação (A), (B), (C), (D). (Adaptado de ASSIS, K. C, (2008).

Os frutos, que ocorrem entre 200 e 600 por planta, são colhidos entre setembro e outubro, a partir do segundo ou terceiro ano de vida da planta (MENDONÇA et al.,

1998). O pseudofruto rico em vitamina C e ferro é também saboroso, ácido e refrigerante, considerado antissifilítico. Os frutos são oleaginosos, com pericarpo idêntico ao do caju (*Anacardium occidentale* L.) do qual se extrai óleo-resina, bastante utilizado para combater as moléstias cutâneas. A casca do caule é empregada para sanar problemas intestinais e as flores são utilizadas como expectorantes (SILVA et al., 2001).

O *Anacardium othonianum* Rizz. é conhecido popularmente como caju de árvore do cerrado (SILVA et al., 2001). O uso da espécie é bem difundido na medicina popular. O chá da raiz é purgativo e, quando macerado em vinho, é utilizado para tratar diabetes e reumatismo. A casca é estimulante e usada, também, como gargarejo para inflamação da garganta. As folhas e as cascas propõem função antidiarreica e expectorante. As sementes fornecem óleo corrosivo utilizado pelos índios para eliminar manchas e verrugas e o pseudofruto é considerado como antissifilítico. A casca, também, é utilizada como tintorial em curtumes, por causa da grande quantidade de taninos (ALMEIDA et al., 1998). O caule subterrâneo pode armazenar água, característica que confere à planta capacidade de resistência às secas prolongadas. O pedúnculo é rico em vitamina C, fibras e compostos fenólicos. Além do potencial vitamínico, estes compostos conferem potencial antioxidante à polpa do caju. Esta propriedade biológica está associada à prevenção de doenças crônico-degenerativas, como problemas cardiovasculares, câncer e diabetes, que avançam a cada ano, superando estatísticas e preocupando as lideranças governamentais da área da saúde (AGOSTINI-COSTA et al., 2001).

## **1.2 Perfil farmacológico do gênero *Anacardium***

Estudos anteriores apontam propriedades farmacológicas em espécies do gênero *Anacardium* como, por exemplo, o *Anacardium occidentale* L., que segundo Melo (1997) se destaca por ter atividade antibacteriana e anti-inflamatória pela presença de polifenóis, taninos e flavonoides em sua constituição. De acordo com o mesmo autor, tanto a casca quanto as folhas possuem grande quantidade destes polifenóis, principalmente os taninos que conferem essas características farmacológicas à espécie.

Outro trabalho utilizando o extrato da casca do *A. occidentale* L., verificou que a espécie apresenta potencial atividade antifúngica sobre *Candida tropicalis* e *Candida stellatoidea* para todas as leveduras ensaiadas (ARAÚJO et al., 2005).

Aguilar et al., (2012), avaliaram o perfil fitoquímico das folhas de *A. occidentale* L. e verificaram a presença de alcaloides, cumarinas, saponinas, triterpenos, esteroides, quinonas, antocianidinas, fenóis e taninos. A presença de taninos confere ação antidiarreica, anti-inflamatória e adstringente (GIMENO, 2004). Os flavonoides são benéficos pela sua atividade antioxidante, de agregação plaquetária e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (YANK et al., 2000). Também a presença de antocianidinas pode ser positiva em estados inflamatórios por causa da capacidade de estimular o sistema imune. As cumarinas são potentes anticoagulantes e bactericidas (MADUREIRA et al., 2003).

Assim, observa-se que a espécie *Anacardium occidentale* L. é a mais estudada e que o *Anacardium Othonianum* Rizz., ainda não tem investigação química e biológica. Assim, estudar o perfil químico desta espécie se torna relevante visto que a mesma é bastante utilizada popularmente para várias finalidades terapêuticas. Além disso, isolar e identificar moléculas bioativas contribui com a área farmacológica, uma vez que é dessa forma que se iniciam as pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos.

### **1.3 Cerrado Brasileiro**

O Cerrado é considerado um dos domínios de maior biodiversidade vegetal do mundo, constituído de uma área de 204 milhões de hectares, o que corresponde a cerca de 22% do território brasileiro, sendo distribuído pelos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal (SILVA e BATES, 2002).

A localização central confere ao Cerrado o contato com outros biomas, e o mesmo possui grande número de espécies animais e vegetais, se constituindo na mais diversificada flora dentre as savanas do Mundo (KLINK e MACHADO, 2005). Nesta área, são encontradas inúmeras espécies medicinais e frutíferas de importância extrativista para as populações locais (GUSMÃO et al., 2006). Existem muitas espécies nativas consideradas importantes, pois produzem madeira, produtos medicinais, frutos comestíveis, entre outros. Devido a essas características de interesse econômico, essas espécies se tornam muito susceptíveis à exploração (FERRÃO, 1999).

A família Anacardiaceae compreende cerca de 60 a 74 gêneros e 400 a 600 espécies de árvores e arbustos. No gênero *Anacardium*, das 21 espécies descritas, 18 são encontradas no Brasil (PAIVA et al., 2003). As espécies do gênero têm grande potencial

econômico, importância nutricional e medicinal. Dentre essas espécies, o *Anacardium othonianum* Rizz., nativo do Cerrado se destaca pela importância econômica para a região (BARROS, 1995; CAVALCANTI JÚNIOR e CHAVES, 2001; SILVA et al., 2001).

#### 1.4 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são amplamente encontrados nos vegetais, sendo um grupo bastante diversificado de fitoquímicos. Se originam do metabolismo secundário das plantas pela rota metabólica do ácido chiquímico, formados a partir de fenilalanina e tirosina (Figura 2) e são essenciais para o crescimento e reprodução. Além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, fermentos e radiações ultravioleta (NACZK e SHAHIDI, 2004). Englobam desde moléculas simples até aquelas com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998).

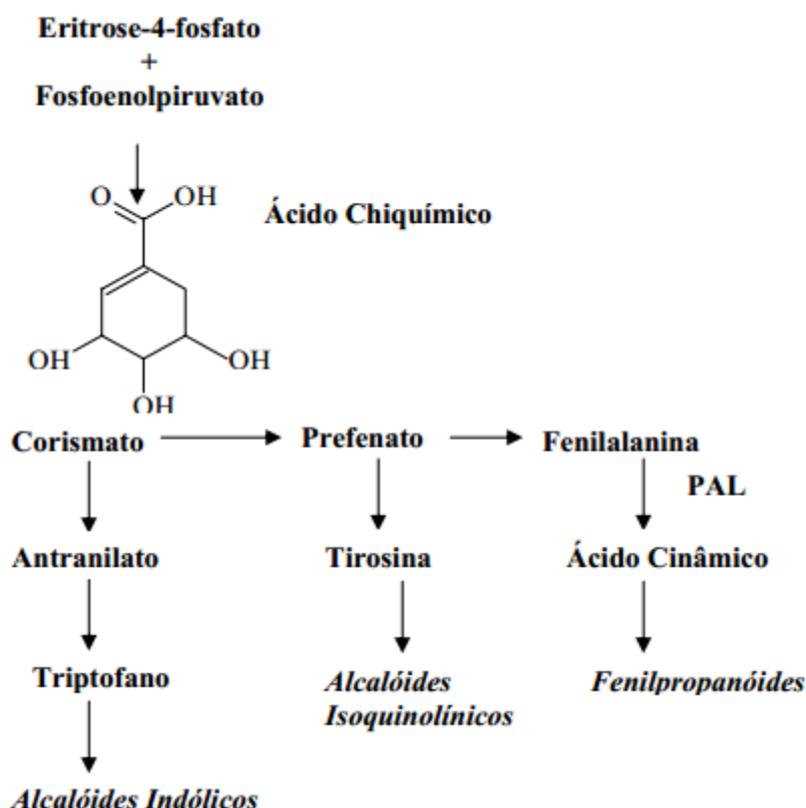


Figura 2. Via do Ácido Chiquímico - rota biossintética de compostos fenólicos.

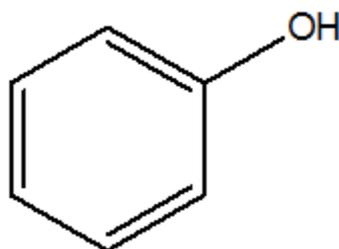
Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005), e por possuírem estrutura variável, são multifuncionais (SHAHIDI e NACZK, 1995).

A formação do ácido chiquímico procede dos precursores de três e quatro átomos de carbono, o fosfoenolpiruvato (PEP) e a eritrose-4-fosfato, respectivamente, através de uma série de etapas. A reação do ácido chiquímico com fosfoenolpiruvato conduz a formação do chiquimato 3-fosfato, que sob a influência da enzima corismato sintase, sofre a perda de ácido fosfórico produzindo o corismato. O corismato através da ação da enzima corismato mutase, sofre um rearranjo de Claisen para gerar o prefenato. Finalmente, a aminação redutiva do prefenato forma a fenilalanina, que é um aminoácido importante na construção de outras substâncias naturais, tais como as proteínas, alcalóides e o ácido cinâmico (substância com esqueleto C6-C3). O ácido cinâmico é formado a partir da fenilalanina, pela ação da enzima L-fenilalanina amônia liase (PAL), que é capaz de catalisar a remoção da amônia (MANN, 1987).

O ácido cinâmico e seus derivados ácido para-hidroxicinâmico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sináptico são constituintes naturais e prováveis genitores de outras substâncias contendo o esqueleto do tipo C6-C3 (DEWICK, 2001).

Ribéreau-Gayon (1968) classificou os compostos fenólicos como: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

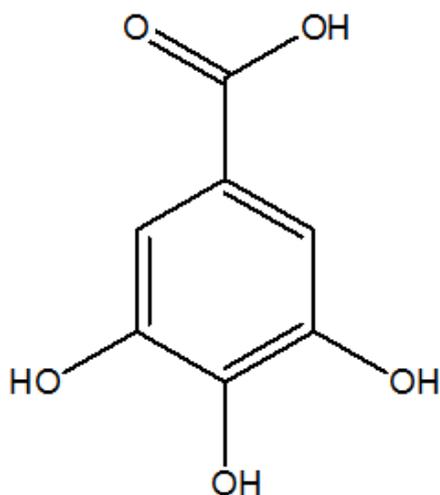
No grupo dos pouco distribuídos na natureza estão os fenóis simples (Figura 2), como o pirocatecol, a hidroquinona, o resorcinol e os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, que são constituintes dos óleos essenciais.



**Figura 3.** Estrutura fundamental dos fenóis simples.

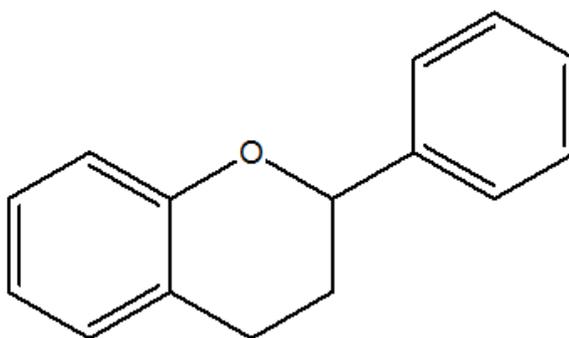
Na forma de polímeros estão os taninos e as ligninas. Os taninos (Figura 3) são compostos de alto peso molecular, que conferem a sensação de adstringência, e se classificam em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os hidrolisáveis

apresentam um núcleo central de glicose ou um álcool poliidrico, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. Os condensados são polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina.



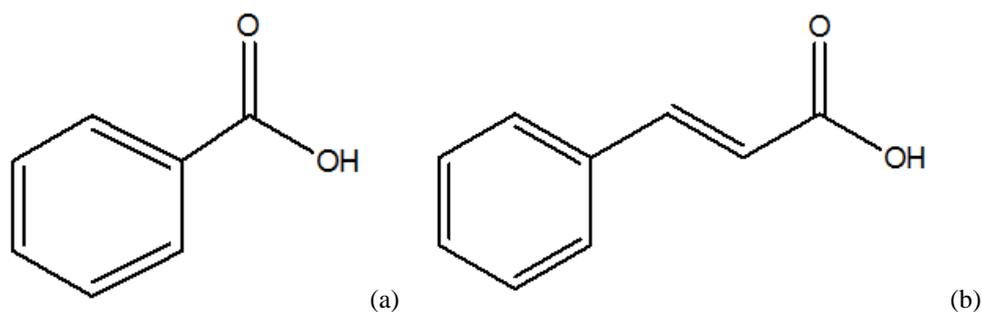
**Figura 4.** Estrutura fundamental dos fenóis simples.

Já os fenólicos largamente distribuídos na natureza, são encontrados geralmente em todo o reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em uma só planta. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os flavonoides (Figura 4) e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados) e as cumarinas. Os flavonoides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo, encontram as antocianidinas, flavonas.



**Figura 5.** Estrutura química fundamental dos flavonoides.

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos (Figura 5). O primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1), e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3).



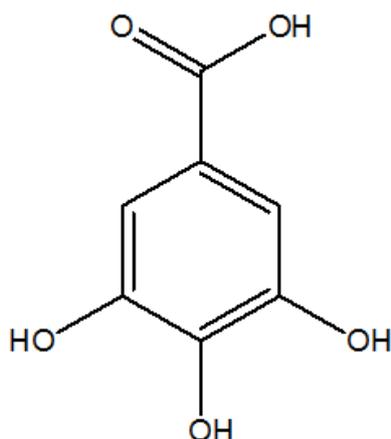
**Figura 6.** Estrutura básica dos ácidos benzoicos (a) e ácidos cinâmicos (b).

Os compostos fenólicos vêm atraindo a atenção dos pesquisadores pelo seu potencial como antioxidantes naturais (KURKIN, 2003). Os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis são os mais comuns antioxidantes fenólicos de origem natural (KING e YONG, 1999).

Estas moléculas combatem os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (SOKMEN et al., 2005), contribuindo na prevenção de doenças que envolvam a ação de radicais livres e a oxidação de lipoproteínas, como problemas cardiovasculares, arteriosclerose e trombose (WANG e ZHANG, 2005).

#### 1.4.1 Ácido Gálico

O ácido gálico é um polifenol (Figura 6) derivado da rota biossintética do ácido chiquímico. Possui efeitos farmacológicos como antioxidante e anti-inflamatório (KIM et al., 2002). Foi reconhecido como indutor de apoptose células de cancro (YEN et al., 2002). O ácido gálico tem diversos efeitos sobre vários tipos de tumores diferentes, em níveis moleculares. Sua atividade anticancerígena torna esta molécula importante para usos terapêuticos. O ácido gálico demonstrou citotoxicidade seletiva para células cancerosas, além disso, possui muito menos efeitos tóxicos para as células normais (CHIA et al., 2010).

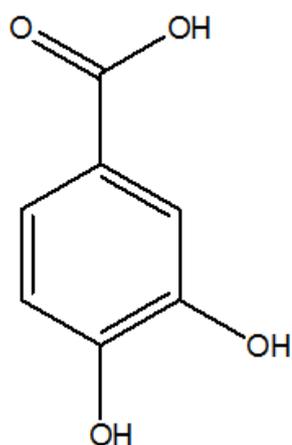


**Figura 7.** Estrutura química do ácido gálico.

Esta substância também é capaz de proteger as células contra danos induzidos por UV-B ou radiação ionizante (SAWA et al., 1999). Além disso, demonstrou propriedade antibacteriana contra diversas agentes microbianos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* (VAQUERO et al., 2007). Pode ser utilizado no tratamento de albuminúria e diabetes, também demonstrou atividades antifúngica e antiviral, controle adstringente em casos de hemorragia interna e pode também utilizado para tratar a psoríase e hemorroidas externas (LAN et al., 2007).

#### 1.4.2 Ácido 3,4-diidroxibenzoico

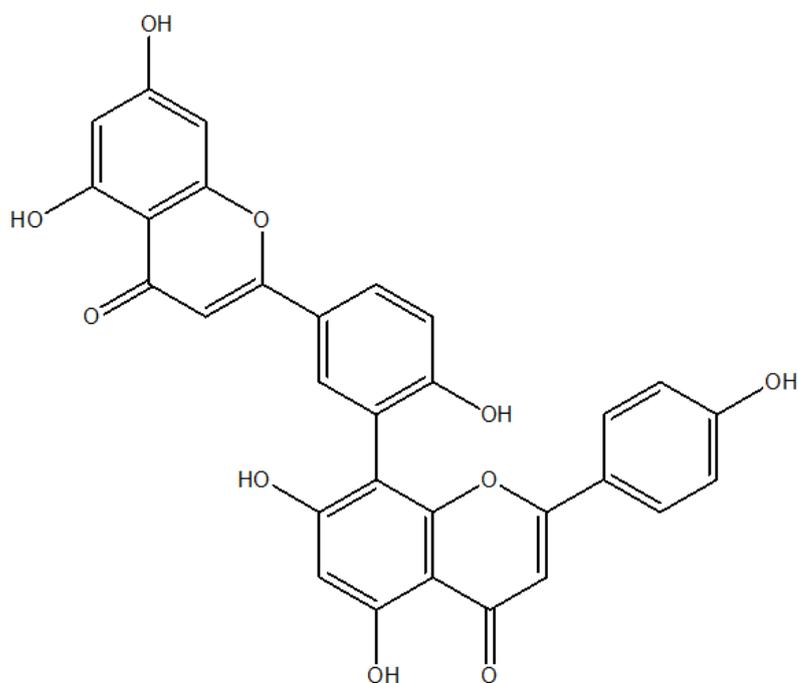
O ácido 3,4-di-hidroxibenzoico (ácido protocatecuico), é um composto fenólico (Figura 7) derivado da rota metabólica do ácido chiquímico. É um constituinte de lignina e, portanto, é universal nas plantas angiospermas. São encontrados principalmente em vinho, chá verde e preto, e medicamentos à base de plantas (YEN e HSIEH, 2000). Estudos mostraram que o 3,4-DHBA possui efeito anti-inflamatório, antitumoral e antioxidante (LIU et al., 2002). É uma substância relevante para a terapia de doenças neurodegenerativa, por causa de sua atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (AN et al., 2006).



**Figura 8** Estrutura química do ácido 3,4-diidroxibenzoico.

### 1.4.3 Amentoflavona

Dentre o grupo dos biflavonoides a amentoflavona (Figura 9) é a mais comum e tem atividades biológicas de antioxidante (SHI et al., 2008), anticancerígena (GURUVAYOORAPPAN e KUTTAN 2007), anti-inflamatório (WOO et al., 2005), antimicrobiana (WOO et al., 2005; JUNG et al., 2007) e analgésica (SILVA et al., 2001b). O primeiro isolamento desta substância no gênero *Anacardium* foi na espécie *A. occidentale* (ARYA et al., 1989).



**Figura 9.** Estrutura química da amentoflavona.

A amentoflavona também tem demonstrado atividade antiviral (LIN et al., 1999) antioxidante, antidepressivo, anti-inflamatória e analgésica (SILVA et al., 2001).

Outros estudos, ainda, revelaram a possível relação entre a amentoflavona e a atividade antidepressiva observada na utilização de algumas plantas medicinais com essa finalidade terapêutica. Essa ação estaria relacionada à capacidade moduladora negativa da amentoflavona e outros biflavonoides sobre os receptores GABA A (HANRAHAN, 2003). Há também estudos que evidenciam a atividade inibitória da amentoflavona na biossíntese de PGE2, COX-2 mRNA e a expressão de proteínas relacionadas (O'LEARY et al., 2004), e evidências que a amentoflavona também pode inibir a biossíntese de FLA2, pertencente a uma família de funções celulares diversas (CHEN et al., 2006)

### **1.5 Cultivo *in vitro* e elicitação**

Várias técnicas de propagação, como a cultura de tecidos *in vitro*, têm sido utilizadas para melhorar a produção de compostos vegetais de interesse, incluindo a seleção de linhagens, a otimização das condições de cultivo, o uso de elicitores e o emprego da engenharia metabólica (CHEN e CHEN, 2000).

A técnica de cultura de células e tecidos vegetais é de grande aplicação, pois permite a produção de mudas, a manipulação de material vegetal para melhoramento de culturas, a produção de calos, a produção de metabólitos dotados de bioatividade, ou ainda para o estudo de rotas metabólicas (TROMPE, 2007). Além disso, permite ainda utilizar elicitores (agentes químicos, físicos e biológicos), para alterar as rotas metabólicas afetando qualitativamente e quantitativamente as moléculas produzidas (DJILIANOV et al., 2005).

Elicitores bióticos e abióticos vêm sendo empregados em cultura de tecidos vegetais, com o intuito de maximizar a produção de compostos químicos de interesse, como estimulador da biossíntese de metabólitos secundários incluindo terpenos, flavonoides, alcaloides, betacianinas e fenilpropanoides, entre outros (BHUIYAN e ADACHI, 2003; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005). Isso ocorre pela alteração das rotas metabólicas que afeta o tipo e a concentração das moléculas bioativas produzidas (DJILIANOV et al., 2005).

O efeito dos elicitores nas plantas depende de muitos fatores ligados ao cultivo, tais como: a concentração utilizada, o tempo de elicitação e o estágio de crescimento da cultura (DÖRNENBURG e KNORR, 1996).

De acordo com as condições em que se encontram as células em cultura e dos estímulos recebidos (bióticos ou abióticos), estas passarão a produzir, em maior ou menor escala, produtos do seu metabolismo secundário. Como os metabólitos secundários vegetais apresentam grande valor farmacológico e econômico, diversas estratégias têm sido empregadas a fim de aumentar os valores de produtividade de determinados compostos no cultivo de células e tecidos vegetais, bem como alterar características de desenvolvimento como acúmulo de biomassa, maior formação de raízes dentre outros (MARASCHIN et al., 2002).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de elicitação abiótica em plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz cultivadas *in vitro*, bem como quantificar ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona na parte aérea das plântulas.

## 1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T. da S.; FARIA, J. P.; NAVES, R. V.; VIEIRA, R. F. Cajus do Cerrado. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Ed.) **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. cap. 8, p.136-151, 2001.

AGUILAR, Y. M.; YERO, O. M.; ARIAS, A.E.; RODRÍGUEZ, F.S.; MAVARRO, M.V. Composición química y tamizaje fitoquímico del polvo de hojas y retoños del *Anacardium occidentale* L. (marañón). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 17, n.1, p. 1-10, 2012.

ALBUQUERQUE, U.P; HANAZAKY, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v16, p.678-689, 2006.

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1998. 464 p

AN, L. J.; GUAN, S.; SHI, G.F.; BAO, Y.M.; DUAN, T.L.; JIANG, B. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP+-induced neurotoxicity in PC 12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 436–443, 2006.

ARAÚJO, C.R.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, J.V.; MARTINS, A.B. Atividade antifúngica *in vitro* da casca do *Anacardium occindentale* Linn. sobre leveduras do gênero *Candida*, **Arquivos em Odontologia de Belo Horizonte**, v.41, n.3, p.193-272, 2005.

- ARYA, R.; BABU, V.; ILYAS, M. Phytochemical examination of the leaves of *Anacardium occidentale*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v.66, p: 67-68, 1989.
- BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; GIORGIO, C.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. Essential oil: *in vitro* and *in vivo* investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, v. 81, n. 4, p.289-295, 2009.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R. Melhoramento Genético do Cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P. e SILVA, V. V. **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção**. EMBRAPA-CNPAT, Fortaleza, 1995. p. 73-96.
- BHUIYAN, N.H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v.160, p.1117-1124, 2003.
- BILIA, A.R.; MELILO DE MAGALHÃES, P.; BERGONZI, M.C.; VINCIERI, F.F. Simultaneous analysis of artemisin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. **Phytomedicine**, v.13, o.487-493, 2006.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317-333, 1998.
- CAVALCANTI JÚNIOR, A.T.; CHAVES, J.C.M. Produção de mudas de cajueiro. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 42, 43p.).
- CHEN, H.; CHEN, F. Effects of yeast elicitor on the grown and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. **Process Biochemistry**, v.35, p.837-840, 2000.
- CHIA, Y.C.; RAJBANSHI, R.; CALHOUN, C.; CHIU, R.H. Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. **Molecules**, v.15, p. 8377–8389, 2010
- COOK, J.D.; REDDY, M.B.; HURRELL, R.F. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p.800–804, 1995.
- CORREA, G. de C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R. da; CHAVES, L. J.; BORGES, J. D. Determinações Físicas em frutos e sementes de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), Cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**, n. 4, v. 24, p. 42-47, 2008.
- CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v.854, p.435-442,1998.

DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p.843-847, 2001.

DJILIANOV, D.; GENOVA, G.; PARVANOV, D.; ZAPRYANOVA, N.; KONSTANTINOVA, T.; ATANASSOV, A. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.115-118, 2005.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Science**, v.15, p.141-168, 1996.

FERRÃO, J. E. M. Fruticultura Tropical: Espécies com frutos comestíveis. Lisboa: **Instituto de Investigação Científica Tropical**, v. 1, p. 75-84, 1999.

GAUTAM, R.; JACHAK, S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, v.29, n.5, p.767-820, 2009.

GIMENO, C.E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. **Offarm**, v. 23, p. 80-84, 2004.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.1-93, 2006.

GURUVAYOORAPPAN, C.; KUTTAN G. Amentoflavone, a biflavonoid from *Biophytum sensitivum* augments lymphocyte proliferation, natural killer cell and antibody dependent cellular cytotoxicity through enhanced production of IL-2 and IFN-gamma and restrains serum sialic acid and gamma glutamyl transpeptidase production in tumor - bearing animals. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 6, n.4, p.285-95, 2007.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F.A.; FONSECA, E.M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex. A. Juss). **Cerne**, Lavras, v.12, n.1, p.84-91, 2006.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v15, p. 686-699, 2005.

HURRELL, R.F.; REDDY, J.M.. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages, **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 289–295, 1999.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia Vegetal**, 2ed. São Paulo: Nacional, 1993. 739p.

JUNG, H. J.; SUNG, W. S.; YEO, S. H. Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, p.746-751, 2007.

JÚNIOR, A. T.; CHAVES, J. C. M. **Produção de mudas de cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 43 p. (Documento 42).

KIM, D.O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3713–3717, 2002.

KING A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v.50, n.2, p.213-218, 1999.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. **A Conservação do Cerrado Brasileiro**. Belo Horizonte, Megadiversidade, v.1, n.1, p.148-155, jul, 2005

KURKIN, V. A. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v.39, n.2, p.123-153, 2003.

LAN, H.C.; CHARN, L.Y.; CHIN, Y.G.; YIN, C.H. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against  $\alpha$ -dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. **Food Chemistry**, v. 103, p. 528–535, 2007.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.131-137, 2005.

LIMA, A. C.; GARCIA, N. H. P.; LIMA, J. R. **Obtenção e caracterização dos principais produtos do caju**. Boletim CEPPA, v. 22, n. 1, p. 133-144, 2004.

LIN, Y.M.; FLAVIN, M.T.; SCHURE, R.; CHEN, F.C.; SIDWELL, R.; BARNARD, D.L.; HUFFMAN, J.H.; KERN, E.R. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, v. 65, n. 2, p.120-125, 1999.

LIU, C.L.; WANG, J.M.; CHU, C.Y.; CHENG, M.T.; TSENG, Y.H. *In vivo* protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, 635–641, 2002.

MADUREIRA, A. M.; ASCENSO, J. R.; VALDEIRA, L.; DUARTE, A.; FRADE, J. P.; FREITAS, G. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. **Natural Product Research**. n, 17, p. 375-80, 2003.

MARASCHIN, M.; SUGUI, J.A.; WOOD, K.V.; BONHAN, C.; BUCHI, D.F.; CANTAO, M. P.; CAROBREZ, S.G.; ARAUJO, P. S.; PEIXOTO, M. L.; VERPOORTE, R.; FONTANA, J.D. Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical approach in *Mandevilla velutina* cultured cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.633-643, 2002.

MELO, D. M.F.F. **Memento Fitoterápico**, João Pessoa: Editora Universitária/ UFPB, 1997, 205.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; RESENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa - CPAC, 1998. p. 89 - 168.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, 15: 473-479, 1962.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.95-111, 2004.

PAIVA, J. R.; CRISOSTOMO, J. R.; BARROS, L. M. **Recursos Genéticos do cajueiro: coleta, conservação, caracterização e utilização**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 2003. 43 p. (Documentos, 65).

PHILLIPSON, J.D. 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medica**, v 69, p. 491-495, 2003)

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p.237-243, 2001.

PIETERS, L., VLIETINCK, A.J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.57–60, 2005.

RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, p.101-153, 2002.

RIBÉREAU-GAYON, P. Les Composés Phénoliques des Végétaux. Paris: Dunod, p. 254, 1968.

SAWA, T.; NAKAO, M.; AKAIKE, T.; ONO, K.; MAEDA, H. J. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 397-402, 1999.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2001. p.25-75.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic**; 1995. 331p.

SHI, S.; LARSON, K.; GUO, D.; LIM, S.J.; DUTTA, P.; YAN, S.J.; LI, W.X. Drosophila STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. **Nature Cell Biology**, v.10, n.4, p.489-496, 2008.

SILVA, D.B. da; SILVA, J.A.da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.de. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, p.179, 2001a.

SILVA, J. M. C. e BATES, J.M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, v.52, p.225-233, 2002.

SILVA, K.L.; SANTOS, A.R.; MATTOS, P.E.; YUNES, R.A.; DELLEMONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. **Therapie**, v. 54, n.4, p. 431-434, 2001b.

SOKMEN, M.; ANGELOVAB, M.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEN, A.; SERKEDJIEVA, J. *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. **Life Sciences**, v.76, p.2981–2993, 2005.

TROMPE, T.A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v.37, n.2, p.80-169, 2007.

VAQUERO, M.J.R.; ALBERTO, M.R.; MANCA, M.C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, p. 93-101, 2007.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, p.326-337, 2006.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S.; SILVA, D. B. da; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 320, 2006.

WANG, L.; ZHANG, H. A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin. **Bioorganic Chemistry**, v.33, p.108-115, 2005.

WOO, E.R.; LEE, J.Y.; CHO, I.J.; KIM, S.G.; KANG, K.W. Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF-KB activation in macrophages. **Pharmaceutical Research**, v.51, p.539-546, 2005.

YANK, K.; LAMPRECHET, S.A.; SHINOZAK, H.; FAN, K.; LEUNG, D.; NEUMARK, H.; STEELE, V.E.; KELLOF, G.J., LIPKIN, M. I. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**. v.21, n. 9, p. 1655-60, 2000.

YEN, G.C.; DUH, P.D.; TSAI, H.L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, p. 307–313, 2002.

YEN, G.C.; HSIEH, C.L. Reactive oxygen species scavenging activity of *Duzhong* (*Eucommia ulmoides* Oliv.) and its active compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3431–3436, 2000.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1ª ed. Chapecó: Argos. p. 47 - 71. 2001.

YUNES, R.A. E FILHO, V.C. Breve análise histórica da química da Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**.Chapecó: Argos, p. 17-44, 2001.

ZHAO, J.T.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.23, p.283-333, 2005.

## **CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA LUZ NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLÂNTULAS *in vitro* DE *Anacardium othonianum* RIZZ.**

**Ana Paula Gazolla<sup>1</sup>, Juliana de Fátima Sales<sup>2</sup>, Fabiano Guimarães Silva<sup>2</sup>, Ana Helena Januário<sup>3</sup>, Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro Hara<sup>4</sup>, Alan Carlos Costa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Mestranda, Ciências Agrárias - Agronomia, IF Goiano; <sup>2</sup>Prof. Dr. IF Goiano/Rio Verde – GO; <sup>3</sup>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Universidade de Franca/Franca – SP; <sup>4</sup>Dr.<sup>a</sup> Bolsista PNPd/FINEP.

### **RESUMO**

O *Anacardium othonianum* Rizz, conhecido popularmente como caju de árvore do cerrado, é amplamente utilizado na medicina popular, por causa de suas propriedades terapêuticas como, antioxidante, anti-inflamatório, antidiarreico, dentre outras. O objetivo deste trabalho foi avaliar os teores de compostos fenólicos em plântulas cultivadas *in vitro* de *A. othonianum* Rizz sob luz branca, azul, verde, vermelha e amarela, sob irradiância de 47 a 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h. Aos 0, 20 e 40 dias de cultivo nos diferentes ambientes, as plântulas foram avaliadas por meio das características de comprimento da parte aérea e número de folhas, e adicionalmente aos 40 dias a massa fresca e seca da parte aérea e o teor de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona. De posse destes resultados, foi calculado o rendimento destes compostos por plântula. O maior comprimento de parte aérea foi observado aos 40 dias (5,54 cm) e o maior número de folhas aos 20 e 40 dias (2,46 e 2,86), respectivamente, independente do comprimento de onda utilizado. Maiores acúmulos de massa fresca e seca foram observados em plântulas cultivadas sob luz vermelha e amarela, respectivamente 325,5 e 335,1 mg (massa fresca), e 83,3 e 84,5 mg (massa seca). Maior teor e rendimento de ácido gálico foi observado em plântulas cultivadas sob luz azul, respectivamente 0,66 mg  $\text{g}^{-1}$  MS e 0,16  $\mu\text{g plântula}^{-1}$ . As plântulas cultivadas sob luz vermelha tiveram aumento em relação ao teor e rendimento de ácido 3,4-diidroxibenzoico, respectivamente 8,21 mg  $\text{g}^{-1}$  MS e 6,78  $\mu\text{g plântula}^{-1}$ . O teor e rendimento de amentoflavona aumentaram nas plântulas cultivadas sob luz azul, sendo 1,41 mg  $\text{g}^{-1}$  MS e 0,88  $\mu\text{g plântula}^{-1}$ , respectivamente.

**PALAVRAS-CHAVE:** ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico, amentoflavona, cultura de tecidos, comprimento de onda.

## **CAPTER 2 – INFLUENCE OF LIGHT QUALITY IN THE PRODUCTION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN SEEDLINGS *in vitro* OF *Anacardium othonianum* RIZZ.**

**Ana Paula Gazolla<sup>1</sup>, Juliana de Fátima Sales<sup>2</sup>, Fabiano Guimarães Silva<sup>2</sup>, Ana Helena Januário<sup>3</sup>, Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro Hara<sup>4</sup>, Alan Carlos Costa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduate Student, Agricultural Science - Agronomy, IF Goiano; <sup>2</sup>Prof. DSc. IF Goiano/Rio Verde – GO; <sup>3</sup>Prof. Dsc. Universidade de Franca/Franca – SP; <sup>4</sup>DSc. Grantee PNPd/FINEP.

### **ABSTRACT**

*Anacardium othonianum* Rizz, popularly known as caju de árvore do cerrado is widely used in folk medicine due to its therapeutic properties as antioxidant, anti-inflammatory, anti-diarrheal, among others. The aim of this study was to evaluate the levels of phenolic compounds in *in vitro* seedlings of *A. othonianum* Rizz under white, blue, green, red and yellow light, under irradiance of 47-50 micromol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> and a photoperiod of 16 h. At 0, 20 and 40 days of cultivation in different environments, the seedlings were evaluated by means of the characteristics of shoot length and leaf number, and additionally at 40 days by fresh and dry mass of shoots and the content of gallic acid, 3,4- dihydroxybenzoic and amentoflavone. With these results, yields of these compounds were calculated per plant. Increased length of shoot was observed at 40 days (5.54 cm) and the largest number of leaves at 20 and 40 days (2.46 and 2.86), respectively, independent of the wavelength used. Higher accumulation of fresh and dry weight were observed in seedlings grown under red and yellow light, respectively 325.5 and 335.1 mg (fresh weight), and 83.3 and 84.5 mg (dry mass). Higher content and yield of gallic acid was observed in seedlings grown under blue light, respectively 0.66 mg g<sup>-1</sup> DM and 0.16 mg of seedling<sup>-1</sup>. The cultivating seedlings under red light were increased in relation to content and yield of 3,4- dihydroxybenzoic respectively 8.21 mg g<sup>-1</sup> DM and 6.78 mg seedling<sup>-1</sup>. The content and yield of amentoflavone increased in seedlings under blue light, being 1.41 mg g<sup>-1</sup> DM and 0.88 mg seedling<sup>-1</sup>, respectively.

**KEY WORDS:** gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, amentoflavone, tissue culture, wavelength light.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O *Anacardium othonianum* Rizz. conhecido popularmente como caju de árvore do Cerrado (SILVA et al. 2001), é bastante utilizado na medicina popular. O chá da raiz possui propriedade purgativa e, quando macerado em vinho, é utilizado para tratar diabetes e reumatismo. A casca é estimulante e usada também para inflamação da garganta. As folhas e as cascas propõem função antidiarreica e expectorante. As sementes fornecem óleo utilizado para eliminar manchas e verrugas e o pseudofruto é considerado antissifilítico. O pedúnculo é rico em vitamina C, fibras e compostos fenólicos. Além do potencial vitamínico, estes compostos conferem potencial antioxidante à polpa do caju, propriedade biológica que está associada à prevenção de doenças crônico-degenerativas, como problemas cardiovasculares, câncer e diabetes, que avançam a cada ano, superando estatísticas e preocupando as lideranças governamentais da área de saúde (AGOSTINI-COSTA et al., 2006).

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos.

Existem cerca de 8.000 compostos fenólicos diferentes, e de acordo com sua estrutura química, são divididos em três classes: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Dentre as classes de compostos fenólicos presentes em plantas e reconhecidos como componentes da dieta estão principalmente os flavonoides e os ácidos fenólicos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Estes compostos se formam em condições de estresse, como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outras (NACZK e SHAHIDI, 2006).

As plantas cultivadas *in vitro* possuem grande dependência das fontes de açúcar contidas no meio de cultivo para garantir energia suficiente ao seu desenvolvimento, entretanto a luz é um importante regulador do desenvolvimento das mesmas (ECONOMOU e READ, 1987).

A ação da luz em plantas ocorre principalmente em dois aspectos. Primeiro, a luz fornece a fonte de energia exigida pela planta através da fotossíntese. Em segundo lugar, a luz é um sinal recebido por fotorreceptores para regular o crescimento, a diferenciação e o metabolismo vegetal (WANG, et al 2001).

De acordo com o comprimento de onda de luz, por mais discreto que seja, a planta desencadeia repostas específicas. A luz azul (400-500 nm) pode controlar o fototropismo, a expansão foliar, o crescimento do caule e o acúmulo de antocianinas. Já a luz vermelha (660 nm) controla germinação, o cloroplasto, o crescimento de caule e pecíolo, e ambos os comprimentos exercem influência na floração e na expressão de genes (CARVALHO e FLOTA, 2014).

A luz influencia a biossíntese de metabólitos secundários, podendo causar o aumento (COELHO et al., 2007) ou a diminuição do acúmulo destes (ZAVALA e RAVETTA, 2001) de acordo com a intensidade da luz que as plantas recebem. Coelho et al. (2007), verificaram que o teor de metilxantina nas folhas de *Ilex paraguariensis* St. Hill aumentou, bem como Zavala e Ravetta (2001) notaram a diminuição de resina em *Grindelia chiloensis* Corn.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da qualidade da luz na síntese dos compostos fenólicos.

## **2.2 METODOLOGIA**

O cultivo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, e as avaliações químicas foram conduzidas no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UNIFRAN – Universidade de Franca – SP.

### **2.2.1 Material Vegetal e Cultivo *in vitro***

As sementes utilizadas foram obtidas de frutos coletados de árvores nativas da região do município de Montes Claros de Goiás (16°10'8"S, 51°27'12"W, 412 m altitude). A exsicata está depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás, *Campus* Jataí, sob o número 3793.

Após a coleta foi feita a despolpa, lavagem, secagem e tratamento das sementes com o fungicida Vitavax-Thiram® [Ingrediente ativo (carboxina + tiram): 200 + 200 g.L<sup>-1</sup>] na dosagem de 300 mL para 100 kg de sementes, sendo posteriormente armazenadas em câmara fria (18 °C ± 3) até a semeadura.

A germinação foi feita em bandejas plásticas (53 x 37 x 8 cm) contendo areia grossa lavada e peneirada como substrato (Figura 1) e, mantidas em sala de crescimento

com temperatura média de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ . O controle fitossanitário das plântulas foi realizado com pulverizações de solução fungicida sistêmica de Derosal<sup>®</sup> a 0,2% do produto comercial. Quinzenalmente, foram irrigadas com solução nutritiva composta por 50 % dos sais do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Após 30 dias da semeadura, segmentos nodais foram coletados e utilizados como fonte de explante para os experimentos.



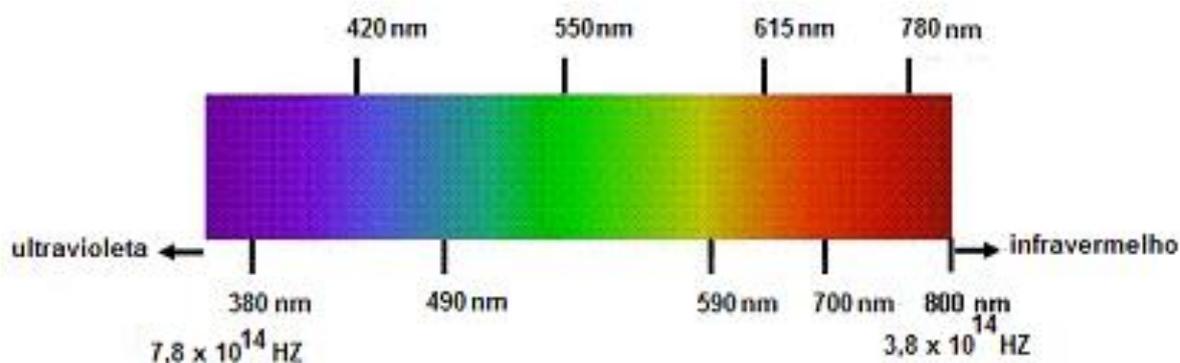
**Figura 1.** Semeadura de *A. othonianum* Rizz em bandejas plásticas contendo areia como substrato (A); Plântulas de *A. othonianum* Rizz. com 30 dias após semeadura (B).

Foi realizada a pulverização com o fungicida sistêmico Derosal<sup>®</sup> (0,2%), 12 horas antes da coleta dos segmentos nodais. Depois de coletados estes permaneceram em recipientes com água corrente e três gotas de detergente neutro por 30 minutos. Posteriormente, foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, seguido de solução de hipoclorito de sódio (20%) durante 20 minutos. Após esse período foram lavados, em câmara de fluxo laminar, por três vezes com água destilada e autoclavada.

Segmentos nodais, com aproximadamente 2 cm e duas gemas, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultivo. O meio utilizado foi o MS contendo a metade da concentração dos sais (MS 50%), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativo e 30 μM de BAP (6-Benzilaminopurina). O pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,3$  antes da adição do agente geleificante, e o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C. Os tubos inoculados, contendo um explante cada, foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante 30 dias, metodologia definida por ASSIS (2011).

As plântulas estabelecidas *in vitro* foram subcultivadas aos 30 dias utilizando o mesmo meio de cultivo, visando à multiplicação de brotos. Foram feitos três subcultivos até se obter o número de plântulas suficiente para a instalação dos experimentos.

As plântulas foram subcultivadas permanecendo por 15 dias nas mesmas condições de cultivo, para se reestabelecerem e posteriormente foram transferidas para ambientes iluminados com diferentes lâmpadas coloridas (Figura 3A), que emitiam as cores a luz, verde, vermelha e amarela na região do espectro visível (Figura 2) que tiveram a composição espectral dividida nas classes apresentadas (Tabela 1 e Figura 3B), fornecidos lâmpadas da marca Taschibra® TP 40w, numa irradiância de 47 a 50  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ , sob fotoperíodo de 16 h. As plântulas permaneceram nestes ambientes por 40 dias.

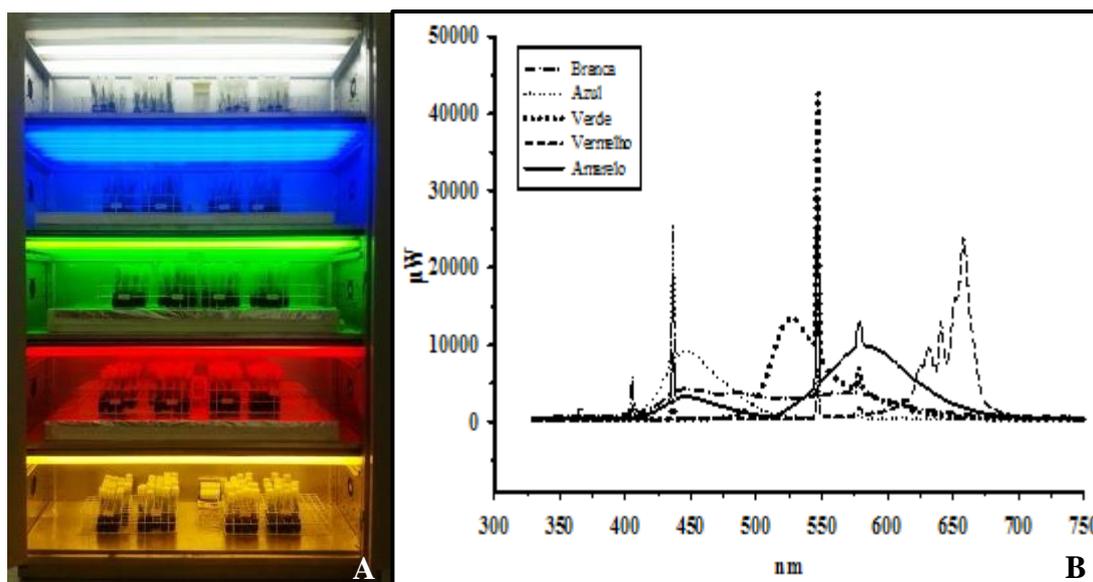


**Figura 2.** Espectro de luz visível.

**Tabela 1.** Classes de comprimento de onda.

Classe	Comprimento de onda
UV-A	330 - 400 nm
Azul	400 - 450 nm
Amarela	565 - 590 nm
Verde	450 - 530 nm
Vermelha	600 - 700 nm
Vermelho Distante	700 - 750 nm

Fonte: TAIZ e ZEIGER, 2013.



**Figura 3.** Lâmpadas e distribuições de energia espectral das fontes de luz utilizadas.

Foi feita a vedação no armário de luzes utilizado, com tecido preto a fim de se evitar interferência das luzes entre si e/ou entre o ambiente externo.

### 2.2.2 Crescimento das plântulas

Foram avaliados o número de folhas expandidas e o comprimento de parte aérea aos 0, 20 e 40 dias de exposição. Aos 40 dias também foram avaliadas a massa fresca e seca. Ao final do período, as plântulas foram removidas dos tubos e imediatamente pesadas para se obter a massa fresca de cada plântula. Em seguida, estas foram secas em estufa de ventilação forçada a 35 °C até atingirem massa constante, sendo posteriormente pesadas para a obtenção de massa seca. Para o cálculo do rendimento, a média de matéria seca por plântula foi multiplicada pelo teor de cada substância quantificada.

O material seco foi armazenado em ambiente seco e fresco para posterior análise química.

### 2.2.3 Constituição química dos extratos vegetais

#### 2.2.3.1 Preparo das soluções estoque e construção da curva dos padrões externos

Para obtenção da curva padrão de calibração, foram utilizados os padrões ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona, isolados de *A. Othonianum* Rizz.

(folha) do campo, pelo grupo de pesquisa em Produtos Naturais da Unifran (CURADO et al., 2013). Todos os padrões foram preparados da mesma maneira.

Foram pesados 1 mg de todos os padrões utilizados e adicionados 2000  $\mu\text{L}$  de metanol-HPLC a fim de se obter a solução estoque de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para diluição foram retiradas alíquotas de 1000  $\mu\text{L}$  da solução e adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de metanol até se obter soluções de concentrações 0,25; 0,125 e  $0,0625 \text{ mg mL}^{-1}$ . Uma última solução foi diluída em 10 vezes utilizando 200  $\mu\text{L}$  da última diluição e 1800  $\mu\text{L}$  de metanol HPLC, obtendo-se ao final solução de concentração  $0,00625 \text{ mg mL}^{-1}$ .

As soluções diluídas nas diferentes concentrações foram transferidas ( $\sim 1 \text{ mL}$ ) para frascos do tipo vial em triplicata, para subsequente corrida em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo SHIMADZU Proeminence-LC-20AD. Os dados das áreas dos picos de interesse de cada padrão foram registrados em tabelas para a construção da curva de calibração.

### **2.2.3.2 Obtenção dos extratos brutos**

Foram utilizadas partes aéreas das plantas de *A. othonianum* Rizz cultivadas *in vitro*, secas em estufa de ventilação forçada a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  até estabilização da massa. Após maceração e pesagem de 200 mg deste material, fez-se a extração adicionando 4 mL de metanol-HPLC, e banho em ultrassom por 30 min. Posteriormente, foi realizada a filtragem dos extratos com algodão e em filtro com membrana (Advantec HP020AN – 20  $\mu\text{m}$ ). Alíquotas de 1000  $\mu\text{L}$  foram pipetadas, com auxílio de pipeta automática, para frascos do tipo vial e levadas para análise em aparelho de cromatografia líquida. As amostras foram analisadas em triplicata.

### **2.2.3.3 Análise cromatográfica**

Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, de sistema binário SHIMADZU Proeminence-LC-20AD, equipado com injetor automático SIL-20A HT, acoplado ao detector: UV-VIS modelo SPD-M20A com arranjo de diodo. A coluna analítica usada foi da Phenomenex Phase GEMINI, (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), C18, equipada com pré-coluna de mesmo material, e forno CTO-20A. O volume injetado foi de 20  $\mu\text{L}$ , fluxo foi de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  e  $\lambda$  254 nm. A temperatura permaneceu constante em  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . A análise foi efetuada em 60 min com eluente em gradiente linear:

CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (5:94,9:0,1 v/v/v), CH<sub>3</sub>OH 100% em 30 min, 10 min em MeOH 100% e 20 min para retornar a condição inicial. Foram empregados solventes metanol para HPLC e solução de ácido acético 0,1% preparada em água Milli-Q. Foram utilizados como padrões externos o ácido gálico, o ácido 3,4-diidroxibenzoico e a amentoflavona. A aquisição de dados foi realizada através de um microcomputador.

#### **2.2.4 Delineamento Experimental**

Para as variáveis de crescimento (comprimento de parte aérea e número de folhas) o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x3 (5 tipos de luzes x 3 tempos de avaliação) e cada tratamento continha 4 repetições, constituída por 20 tubos de ensaio. Para matéria fresca e seca foram 5 tipos de luzes x 1 tempo de avaliação (40 dias). Para as análises químicas, as amostras foram feitas em triplicatas. Os dados numéricos obtidos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

### **2.3 RESULTADOS**

#### **2.3.1 Composição Espectral do Ambiente de cultivo**

Ambientes de cultivo com lâmpadas branca e azul proporcionaram maiores teores de UV-A (330-400 nm), azul (400-450 nm) e verde (450-530 nm), sendo este último também encontrado em maiores valores em ambientes iluminado com luz verde (Tabela 2). Por outro lado, ambientes iluminados com luz vermelha ou amarela, proporcionaram maiores percentuais de vermelho (600-700 nm).

Foi observado que as lâmpadas que emitiam maior espectro na faixa do vermelho distante proporcionaram maior acúmulo de matéria fresca e seca.

**Tabela 2.** Composição espectral, em porcentagem, dos comprimentos de onda das fontes de luz utilizadas.

Ambiente de cultivo (lâmpada)	Composição espectral (%)				
	UV-A (330-400)	Azul (400-450)	Verde (450-530)	Vermelho (600-700)	Vermelho Distante (700-750)
Branca	5,66	18,19	30,11	14,15	3,31
Azul	6,60	38,26	39,48	5,83	2,93
Verde	2,38	2,33	32,70	9,26	1,72
Vermelha	2,80	2,24	3,80	80,49	2,56
Amarela	2,68	9,10	11,40	27,37	1,98

## 2.3.2 Crescimento

### 2.3.2.1 Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas

Os resultados para comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas expandidas não foram influenciados pela interação luz *versus* época de avaliação. Aos 40 dias de cultivo, as plântulas se apresentaram com maior comprimento de parte aérea (5,54 cm), com aumento de 1,7 vezes. Quanto ao número médio de folhas expandidas aos 20 e 40 dias ocorreram os maiores valores (2,46 e 2,86 cm respectivamente), ocorrendo o aumento de 1,45 e 1,7 vezes. (Tabela 2). Plântulas de *A. othonianum* Rizz aos 0, 20 e 40 dias de tratamento podem ser observadas na Figura 4.

**Tabela 2.** Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas expandidas de plântulas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes tempos de avaliação.

Épocas de avaliação (dias)	Comprimento médio de parte aérea (cm)	Número médio de folhas expandidas
0	3,82 <sup>z</sup> C	1,69 B
20	4,89 B	2,46 A
40	5,54 A	2,86 A

<sup>z</sup>Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).



**Figura 4.** Plântulas de *A. othonianum* Rizz. aos 0 (A), 20 (B) e 40 (C) dias. (T1 = Luz branca; T2 = Luz azul; T3 = Luz verde; T4 = Luz vermelha; T5 = Luz amarela).

### 2.3.2.2 Matéria Fresca e Matéria Seca

Maior acúmulo de matéria fresca e seca foi observado em plântulas que foram cultivadas sob luz vermelha e amarela, com o aumento proporcional de 1,08 e 1,15 vezes em relação ao tratamento de luz branca (controle). Os demais comprimentos de onda de luz não diferiram entre si (Tabela 3).

**Tabela 3.** Acúmulo de matéria fresca e seca de plântulas de *A. othonianum* Rizz aos 40 dias após exposição aos diferentes comprimentos de onda de luz.

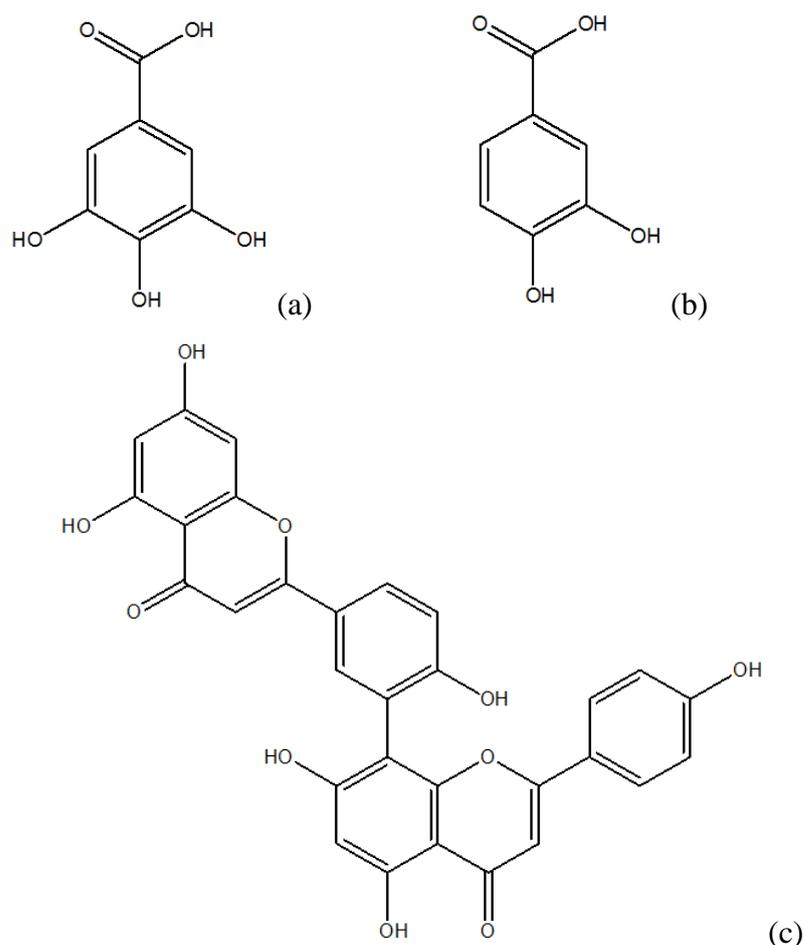
Tratamento	MF	MS
	mg	
Luz Branca	300,4b <sup>2</sup> ± 0,101	71,0b ± 0,019
Luz Azul	310,2b ± 0,069	72,5b ± 0,018
Luz Verde	318,4b ± 0,069	82,8b ± 0,016
Luz Vermelha	325,5a ± 0,034	83,3a ± 0,012
Luz Amarela	335,1a ± 0,026	84,5a ± 0,080

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05). MF= matéria fresca; MS=matéria seca; mg=miligramas.

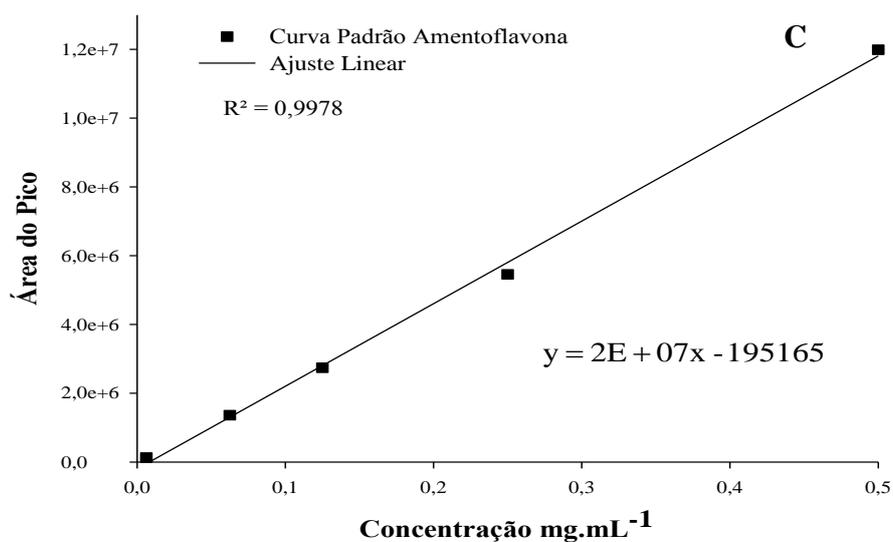
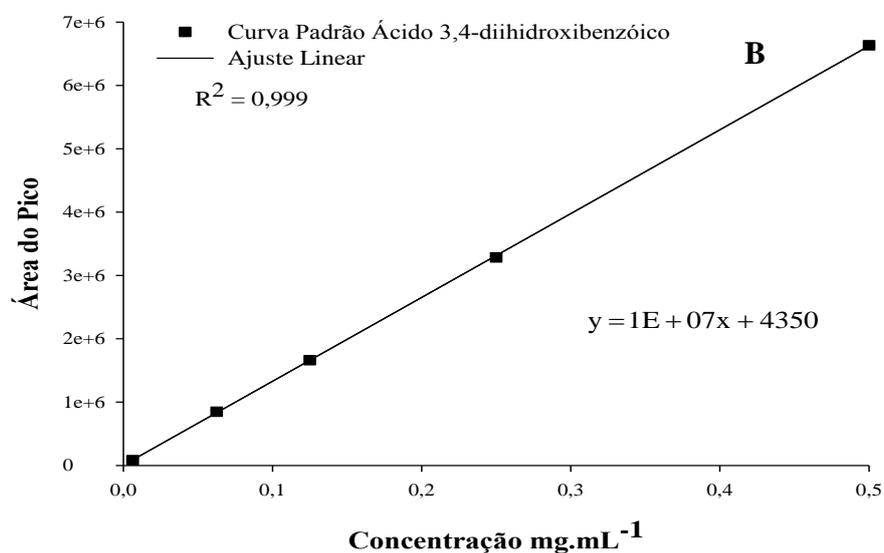
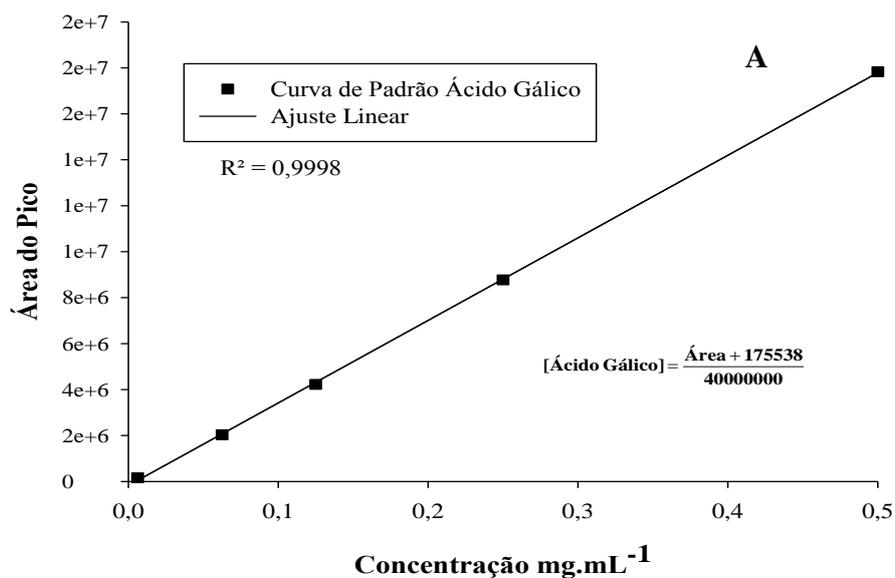
### 2.3.3 Análise Quantitativa por CLAE-DAD do ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e amentoflavona

#### 2.3.3.1 Curva padrão de calibração

A curva de calibração, bem como os parâmetros inerentes a ela, os coeficientes angular, linear e de correlação  $R^2$ , foram obtidos com auxílio do *software* Excel 2010. Esses parâmetros são imprescindíveis para a criação da equação da reta que será utilizada para a determinação das concentrações de cada substância. A estrutura molecular destas três substâncias pode ser observada na figura 5. Pela figura 6 é possível observar que os pontos apresentam boa linearidade e isso pode ser confirmado pelos valores dos coeficientes de correlação linear, sendo  $R^2 = 0,998$ ,  $0,9999$  e  $0,9978$ , respectivamente (Figura 6). De posse dos coeficientes angular e linear foi possível criar as equações para quantificação dos teores de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona nas amostras estudadas.

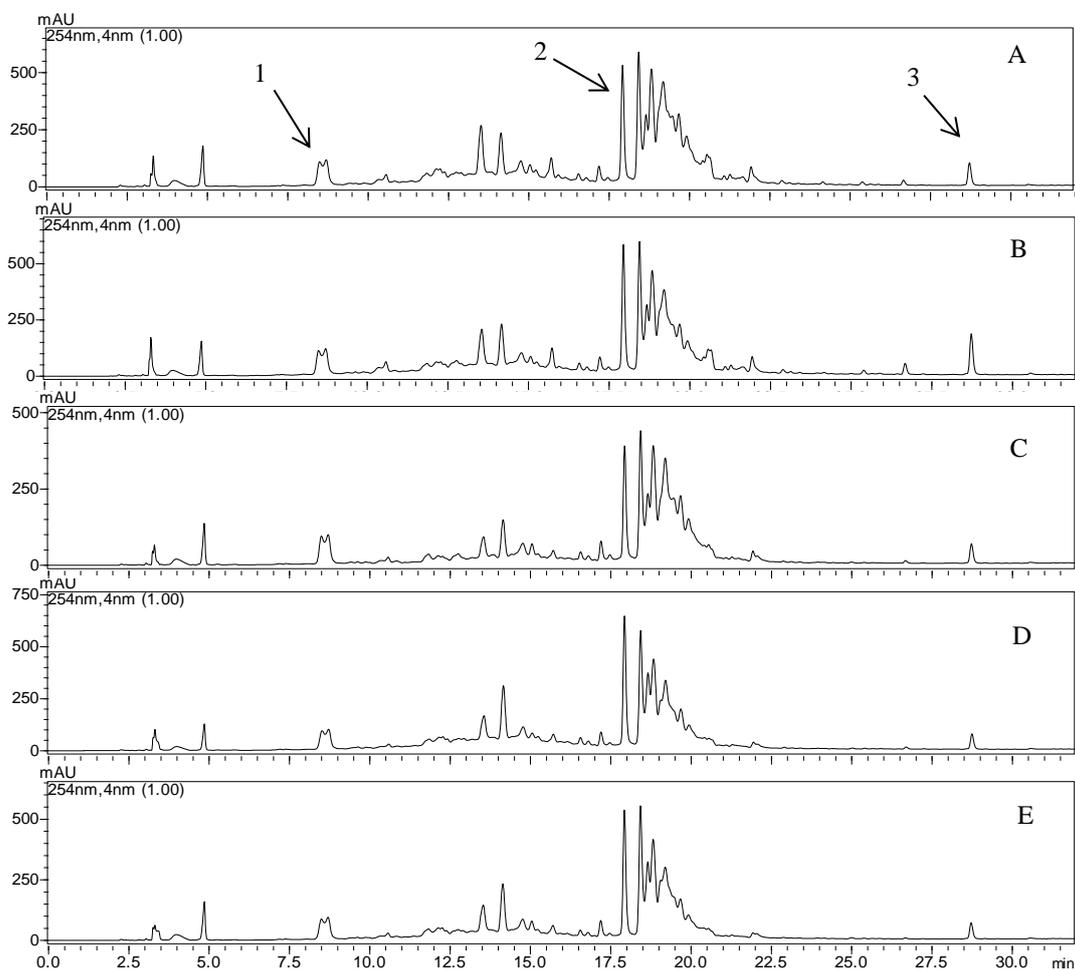


**Figura 5.** Estruturas moleculares dos padrões utilizados para a curva padrão (ácido gálico (a), ácido 3,4-diidroxibenzoico (b) e amentoflavona (c)).

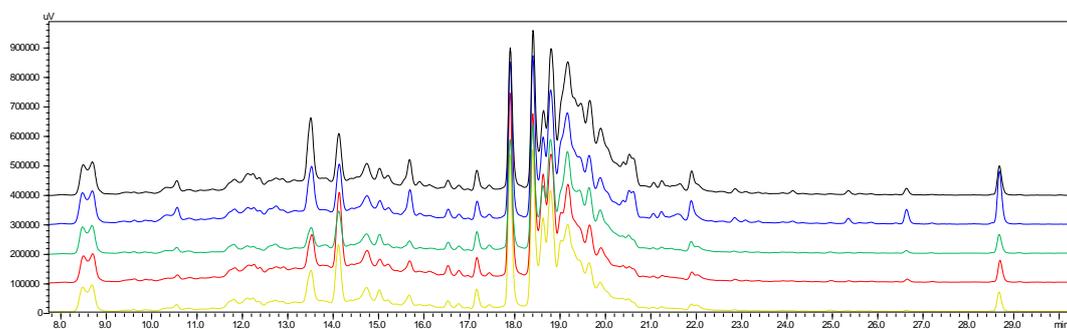


**Figura 6.** Curvas padrão de calibração dos padrões ácido gálico (A), ácido 3,4-dihidroxi benzoico (B) e amentoflavona (C), plotadas através da área do pico versus concentração em mg mL<sup>-1</sup>.

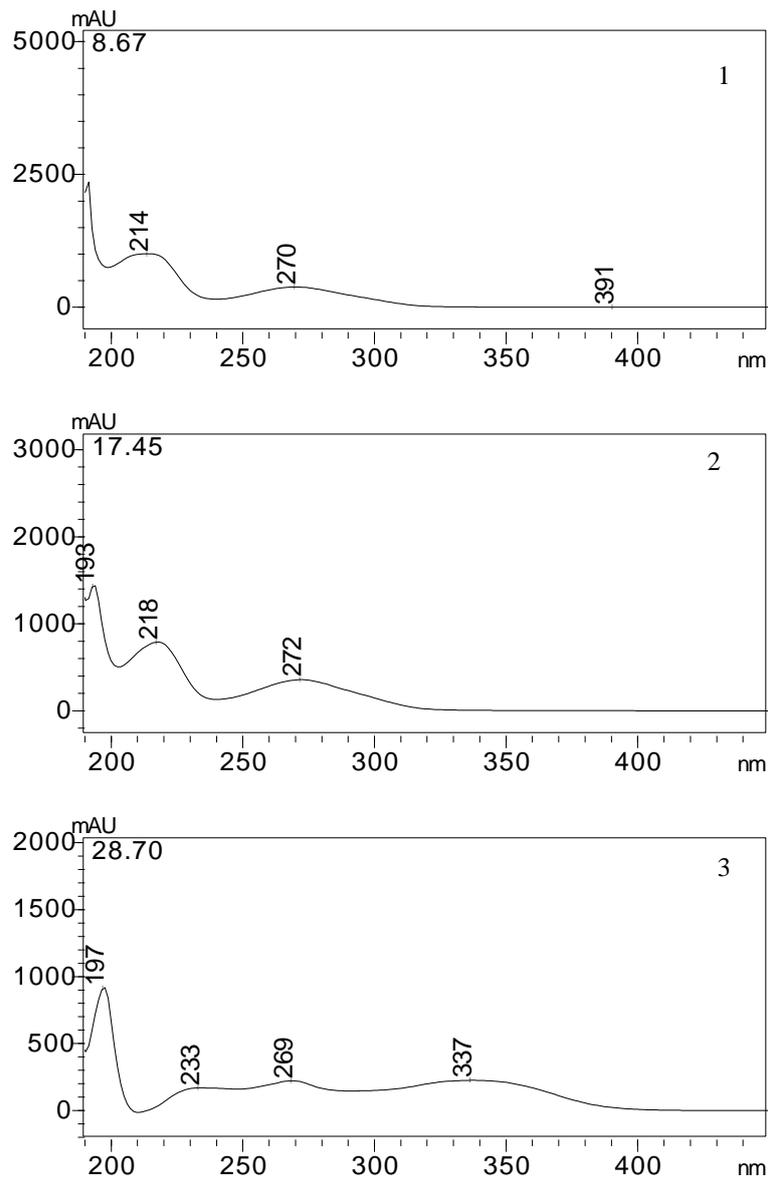
Os cromatogramas com o tempo de retenção e os espectros de UV de cada substância quantificada podem ser observados nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico com destaque para as melhores bandas cromatográficas associadas ao ácido gálico (1), ácido 3,4-diidroxibenzoico (2) e amentoflavona (3), obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de *A. othonianum* Rizz. cultivadas sob luz branca (A), azul (B), verde (C), vermelha (D) e amarela (E).



**Figura 8.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir dos extratos metanólicos de *A. othonianum* Rizz. cultivados sob luz branca, azul, verde, vermelha e amarela (sentido de cima para baixo).



**Figura 9.** Espectros de UV do ácido gálico (1), ácido 3,4-diidroxibenzoico (2) e amentoflavona (3).

Após a obtenção da curva de calibração, foram obtidos os valores das áreas dos picos correspondentes a cada substância a ser quantificada nas amostras analisadas. Utilizando as equações e substituindo os valores das áreas foi possível determinar a concentração do ácido gálico, do ácido 3,4-diidroxibenzoico e da amentoflavona em cada uma das amostras.

O acúmulo de ácido gálico foi afetado negativamente pelo tratamento de luz amarela ( $0,47 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ). Os teores de ácido gálico encontrados em plântulas cultivadas sob luz verde e vermelha não diferiram em relação aos constatados sob luz branca, apresentando teores de  $0,56$ ,  $0,58$  e  $0,55 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ , respectivamente. O maior

teor de ácido gálico foi observado em plântulas sob luz azul ( $0,66 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Figura 10).

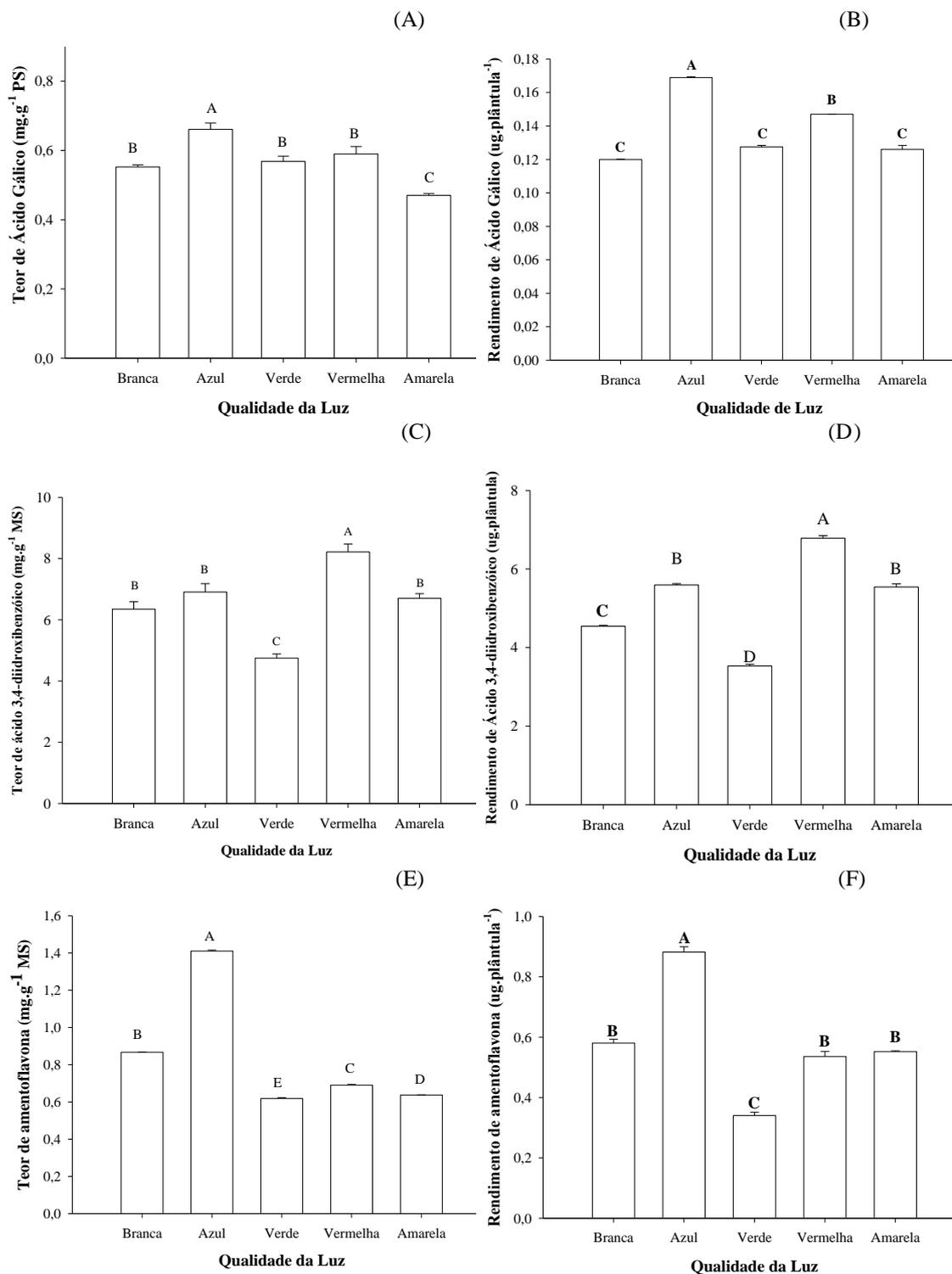
Maiores rendimentos de ácido gálico ocorreram quando as plântulas foram cultivadas sob luz azul ( $0,16 \text{ } \mu\text{g plântula}^{-1}$ ), seguido pelo valor médio das plântulas cultivadas sob luz vermelha ( $0,14 \text{ } \mu\text{g plântula}^{-1}$ ). Já para as plântulas cultivadas sob a luz verde e amarela o rendimento não diferiu em relação ao controle, com valores médios de  $0,12$ ;  $0,12$  e  $0,13 \text{ } \mu\text{g plântula}^{-1}$ , respectivamente.

Diferentemente do ácido gálico, maiores teores de ácido 3,4-diidroxibenzoico foram encontrados quando as plântulas foram cultivadas sob luz vermelha ( $8,22 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ), seguido por plântulas cultivadas em luz branca, azul e amarela, que não diferiram entre si, e por último, em plântulas cultivadas sob luz verde ( $4,75 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Figura 10).

De forma semelhante, os maiores rendimentos de ácido 3,4-diidroxibenzoico ocorreram em plântulas cultivadas sob luz vermelha ( $6,78 \text{ } \mu\text{g plântula}^{-1}$ ), seguido por plântulas cultivadas sob luz azul ( $5,57 \text{ } \mu\text{g plântula}^{-1}$ ). Já para plântulas cultivadas sob luz verde, o rendimento foi menor em relação ao controle, com valores médios de  $3,53 \text{ } \mu\text{g plântula}^{-1}$  (Figura 10).

Assim como observado para o ácido gálico, plântulas cultivadas sob luz azul apresentaram maiores teores de amentoflavona ( $1,41 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Figura 8). Porém, diferentemente do ácido gálico, plântulas cultivadas sob luz verde, vermelha e amarela apresentaram redução no teor de amentoflavona, comparado às plântulas cultivadas sob luz branca ( $0,61$ ;  $0,69$  e  $0,63 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ).

Seguindo o padrão encontrado para o teor, plântulas cultivadas sob luz azul produziram maiores rendimentos de amentoflavona ( $0,88 \text{ } \mu\text{g plântula}^{-1}$ ), porém, plântulas cultivadas sob luz amarela ou vermelha não diferiram das plântulas cultivadas sob luz branca, como o ocorrido para o teor. Plântulas cultivadas sob luz verde apresentaram menores rendimentos de amentoflavona ( $0,34 \text{ } \mu\text{g plântula}^{-1}$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Teores e rendimento de ácido gálico (A e B), ácido 3,4-dihydroxybenzoico (C e D) e amentoflavona (E e F) em plântulas de *A. othonianum* Rizz, submetidas a diferentes comprimentos de onda de luz. MS = Matéria seca

Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*As barras verticais representam o erro padrão da média das triplicatas.

## 2.4 DISCUSSÃO

Macedo et al (2011), verificaram que a luz azul induziu maior número de folhas por planta e luz vermelha aumentou o peso fresco e peso seco das folhas de *Alternanthera brasiliana* Kuntze, nenhum dos diferentes comprimentos de onda foram capazes de aumentar o número de folhas, entretanto foi obtido o aumento de massa fresca e seca nas plântulas sob o tratamento de luz vermelha e amarela.

Nishimura et al. (2007) também encontraram aumento de peso seco em plantas de *Hypericum perforatum* cultivadas sob luz azul, entretanto esse efeito foi obtido a partir da irradiância de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 10 vezes maior que a utilizada neste trabalho.

Ahmed (2012), em cultura de calos da espécie *G. sylvestre*, observou que a luz vermelha reduziu o crescimento do calo e o acúmulo de biomassa do mesmo. O tamanho da célula de calo foi maior em luz azul que em luz vermelha, seguida pela luz verde. A luz azul causa estímulo na clorofila, que leva à síntese de carotenoides e aumento na atividade da fenilalanina-liase de amônio (aminoácido precursor do ácido cinâmico).

O mesmo autor ainda verificou que o teor máximo de ácido gimnêmico foi obtido nos calos cultivados sob o tratamento de luz azul, seguido pelo de luz vermelha e de luz verde, que foi observado também no presente trabalho utilizando folhas de *A. othonianum* Rizz. Este resultado demonstra que o uso de luz azul se mostrou como promissora ferramenta para a produção de ácido gálico em maior escala utilizando a espécie em questão.

Hou, et al. (2010) sugerem que o aumento nas concentrações de ácido glicirrízico em *G. uralensis*, possui correlação com a diminuição da acumulação de biomassa pelo estresse, que desencadeou uma resposta de defesa em condições de pouca luz. E ainda, que se a planta for capaz de suportar ambiente de pouca intensidade de luz ou um déficit de luz adequada, esta pode ser a medida alternativa viável para aumentar o conteúdo de metabólitos secundários, pois este resultado foi observado com o cultivo de *G. uralensis*.

Além disso, Bussotti (2008) observou que a capacidade de resistência ao estresse pela espécie *Phyllirea latifolia* L. levou à produção de compostos de defesa, em que a manutenção da maior defesa química nas plantas ocorre sob baixa tensão de luz, mesmo em redução da biomassa.

Em folhas de *Ligustrum vulgare*, flavonoides foram largamente acumulados com a irradiação de luz de emissão máxima a 575 nm (faixa da luz vermelha) e ocorreram com escassez em tecido paliçádico exposto a 552 nm (faixa da luz verde) (TATTINI et al, 2004).

## 2.5 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados demonstram que a qualidade espectral da luz influencia a biomassa e a o teor de compostos fenólicos produzidos pelas plântulas *in vitro* de *A. othonianum* Rizz. A luz vermelha e a luz amarela estimularam o acúmulo de MS em plântulas. Os teores e rendimentos de ácido gálico e amentoflavona foram aumentados na presença de luz azul. A luz vermelha estimulou os teores e o rendimento de ácido 3,4-diidroxibenzoico. E, por fim a luz verde inibiu o teor e o rendimento do ácido 3,4-diidroxibenzoico. Alterações na produção destes compostos eram esperadas pelos tratamentos utilizados, e supõe-se que estas tenham ocorrido pela indução e inibição da rota metabólica dos ácidos chiquímico e cinâmico, precursores das moléculas estudadas.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. B. A.; RAO, A. S.; RAO, M. V.;TAHA, R. M. Different wavelengths light to induce physiological changes callus for the biosynthesis of gymnemic acid in *Gymnema sylvestre*. **Agrofood industry hi-tech**, v. 23, n 3, 2012.

AGOSTINI-COSTA, T. da S.; FARIA, J. P.; NAVES, R. V.; VIEIRA, R. F. Cajus do Cerrado. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Ed.) **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.136-151, 2006.

ASSIS, K. C.; PEREIRA, F. D.; SANTOS, S. C.; SILVA, F. G.; SILVA, A. F.; MENEZES, C. C. E. Rendimento de explantes e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Anacardium othonianum* rizz., oriundos de sementes armazenadas por diferentes períodos. **Global Science and Technology**, v. 04 n. 01, p.01– 07, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants andagri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BUSSOTTI, F. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. **Global Change Biology**, v. 14, p. 2727–2739. 2008.

CARVALHO, S.D.; FOLTA, K.M. Sequential light programs shape kale (*Brassica napus*) sprout appearance and alter metabolic and nutrient content. **Horticulture Research**, v. 8, p. 1-13, 2014.

COELHO, G.C., RACHWAL, M.F.G., DEDECEK, R.A., CURCIO, G.R., NIETSCHKE, K., SCHENKEL, E.P. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p.75–80, 2007.

CURADO, F.M.L.M.J.; ALVARENGA, T. A.; ALBERTO, P.S.; MAGALHÃES, L.G.; SILVA, F.G.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; JANUÁRIO, A.H.; PAULETTI, P.M. *In vitro* schistosomicidal activity of amentoflavone isolated from *Anacardium othonianum* rizz. In: International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto-SP, 2013, CD-ROM.

ECONOMOU, A.S., READ, P.E. Light treatment to improve efficiency of in vitro propagation systems. **HortScience**, v.22, p.751–754, 1987.

FERREIRA, D.F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2011.

HOU, J; LI, W; ZHENG, O; WANG, W; XIAO, B; XING, D. Effect of low light intensity on growth and accumulation of secondary metabolites in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 160–168, 2010.

KOPSELL, D. A.; SAMS, C. E. Increases in Shoot Tissue Pigments, Glucosinolates, and Mineral Elements in Sprouting Broccoli after Exposure to Short-duration Blue Light from Light Emitting Diodes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 138, n.1, p. 31–37, 2013.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum*) and thyme leaves (*Thymes vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

MACEDO, A.F.; LEAL-COSTAB, M.V.; TAVARESB, E. S.; LAGEC, C.L.S.; ESQUIBELC, M.A. The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, p.43–50, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-479, 1962.

NACZK, M; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523- 154, 2006.

NISHIMURA, T., ZOBAYED, S.M.A., KOZAI, T., GOTO, E. Medicinally important secondary metabolites and growth of *Hypericum perforatum* L. plants affected by light quality and intensity. **Environment Control Biology**, v. 45, p. 113–120, 2007.

SILVA, D.B. da; SILVA, J.A.da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.de. Frutas do cerrado. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológica**, p. 179, 2001.

TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; MASSAI, R.; REMORINI, D.; AGATI, A. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v. 163, p. 547–561, 2004.

WANG, Y. C.; ZHANG, Z. X.; ZHAO, X .F.; YUAN, X. F. Improved growth os *Artemisia annua* L. hairy roots and artemisin production under red light condicions, **Biotechnology Letters**, v. 23, p.1971-1973, 2001.

ZAVALA, J.A., RAVETTA, D.A. Allocation of photoassimilates to biomass, resin and carbohydrates in *Grindelia chiloensis* as affected by light intensity. **Field Crops Research**, v.69, p.143–149, 2001.

## **CAPÍTULO 3 – USO DE ELICITORES ABIÓTICOS NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS *in vitro* EM *Anacardium othonianum* RIZZ**

**Ana Paula Gazolla<sup>1</sup>, Juliana de Fátima Sales<sup>2</sup>, Fabiano Guimarães Silva<sup>2</sup>, Ana Helena Januário<sup>3</sup>, Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro Hara<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Mestranda, Ciências Agrárias - Agronomia, IF Goiano; <sup>2</sup>Prof. Dr. IF Goiano/Rio Verde-GO; <sup>3</sup>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Universidade de Franca/Franca – SP; <sup>4</sup>Dr.<sup>a</sup> Bolsista PNPd/FINEP (IF Goiano – *Campus* Rio Verde, GO)

### **RESUMO**

O *Anacardium othonianum* Rizz., espécie nativa do Cerrado brasileiro, conhecido popularmente como caju de árvore do cerrado. É uma espécie de grande relevância para região por possuir propriedades medicinais e amplo aproveitamento alimentar. O uso de elicitores, bióticos ou abióticos, é uma estratégia que pode ser utilizada para aumentar a produção de metabólitos secundários de interesse em diversas espécies de plantas. Dessa forma, o vegetal pode produzir maior quantidade de substâncias de atividade farmacológica, que aumenta o seu valor terapêutico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da elicitação abiótica com ácido salicílico (SA) e nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) em plântulas *in vitro* de *A. othonianum* Rizz, bem como quantificar o teor de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona na parte aérea. As plântulas tiveram seu crescimento avaliado aos 15 e 30 dias, sendo que neste último tempo, tiveram os teores de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona quantificados por CLAE-DAD. O ácido 3,4-diidroxibenzoico e o biflavonoide, tiveram seus teores aumentados, em contraste o teor de ácido gálico diminuiu com os tratamentos utilizados, exceto, quando se utilizou SA 60 µM (0,3068 mg.g<sup>-1</sup>MS).

**PALAVRAS-CHAVE:** cultura de tecido, ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico, amentoflavona, elicitor.

## CHAPTER 3 – USE OF ABIOTIC ELICITORS IN THE PRODUCTION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN *in vitro* *Anacardium othonianum* RIZZ

Ana Paula Gazolla<sup>1</sup>, Juliana de Fátima Sales<sup>2</sup>, Fabiano Guimarães Silva<sup>2</sup>, Ana Helena Januário<sup>3</sup>, Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro Hara<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduate Student, Agricultural Science - Agronomy, IF Goiano; <sup>2</sup>Prof. DSc. IF Goiano/Rio Verde-GO; <sup>3</sup>Prof. DSc. University of Franca/Franca – SP; <sup>4</sup>DSc. Grantee PNPd/FINEP

### ABSTRACT

The *Anacardium othonianum* Rizz., is a native specie from the Brazilian Cerrado, popularly known as caju de árvore do cerrado. It is a specie of great relevance to the region because of its medical properties and ample food utilization. The use of elicitors, biotic or abiotic, is a strategy that can be used to increase production of secondary metabolites of interest in various plant species. Thus, the plant may produce a igher amount of substances having a pharmacological activity, which enhances its therapeutic value. The aim of this study was to evaluate the effect of abiotic elicitation with salicylic acid (SA) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) in *in vitro* seedlings of *A. othonianum* Rizz and quantify the 3,4- dihydroxybenzoic acid, gallic acid and amentoflavone in shoots. Seedlings had growth assessed at 15 and 30 days, and in this last time, had the contents of gallic acid, 3,4- dihydroxybenzoic and amentoflavone quantified by HPLC-DAD. The 3,4- dihydroxybenzoic and biflavonóide acid had increased their levels, in contrast the content of gallic acid decreased with the treatments, except when using 60 mM SA (0.3068 mg g<sup>-1</sup> MS).

**KEY WORDS:** culture tissue, gallic acid, 3,4- dihydroxybenzoic acid, amentoflavone, elicitor.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O *Anacardium othonianum* Rizz. é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, conhecido popularmente como caju de árvore do cerrado. É uma espécie de grande relevância para região por possuir propriedades medicinais e amplo aproveitamento alimentar. No entanto, sua exploração geralmente é de caráter extrativista e muitas vezes de forma predatória (SILVA et al., 2001).

A técnica de cultura de células e tecidos vegetais é de grande aplicação, permitindo a produção de mudas, a manipulação de material vegetal melhorado geneticamente e a produção de metabólitos dotados de bioatividade (TROMPE, 2007). Os meios de cultivo, além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro* (TORRES et al., 2001). O emprego de elicitores abióticos no cultivo é muito utilizado como estratégia para a produção de metabólitos secundários, sendo esta produção relacionada à indução de genes que ativam a via dos metabólitos secundários (QIAN et al., 2006). Apresenta efeito sobre a produção dos compostos provenientes do metabolismo secundário, uma vez que este elicitor opera em vias de sinalização nas plantas, e respondem a estresses bióticos e abióticos (NAMEDO, 2007).

O ácido salicílico é um fitohormônio pertencente ao grupo dos compostos fenólicos, sintetizado pela via fenilpropanoide, a partir da L-fenilalanina, que, por ação da fenilalanina amônio-liase (PAL), origina o ácido trans-18 cinâmico. A aplicação do ácido salicílico pode inibir a germinação e o crescimento da planta, interferir na absorção das raízes, reduzir a transpiração, causar a abscisão das folhas, alterar o transporte de íons, induzindo a rápida despolarização das membranas, ocasionando um colapso no potencial eletroquímico (KERBAUY, 2008), e ainda desencadear a produção de compostos como alcaloides e polifenóis (YAO; TIAN, 2005).

Os metais pesados podem influenciar parcialmente células vegetais através da indução de vias de sinalização relacionadas com ácido jasmônico. Isso acontece por causa da síntese de proteínas semelhante ao mecanismo de defesa relacionados com o patógenos e respostas de hipersensibilidade (SANTIAGO et al., 2000; MAKSYMIEC et al., 2005). O nitrato de prata é conhecido como potente inibidor de ação de etileno sendo utilizado em cultura de tecidos. Sua fácil disponibilidade, solubilidade em água, a especificidade e estabilidade tornam muito úteis para várias aplicações na exploração de plantas regulação do crescimento e morfogênese *in vivo* e *in vitro*. O íon prata parece

estar envolvido na via de etileno, e desempenha papel crucial papel na regulação de processos fisiológicos (KUMAR et al., 2009).

Os compostos fenólicos, ou fenilpropanoides, são amplamente encontrados em plantas, sendo um grupo muito diversificado de fitoquímicos, originados do metabolismo secundário das plantas (NACZK e SHAHIDI, 2004). Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e vêm atraindo a atenção dos pesquisadores pelo seu potencial como antioxidantes naturais (KURKIN, 2003; KOSAR et al., 2004), recebendo destaque os flavonoides, os ácidos fenólicos.

O ácido gálico (GA, ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) é um polihidroxifenol encontrado em espécies vegetais estando presente ou na forma livre ou, mais comumente, como ingrediente de taninos (NIEMET e GROSS, 2001). GA e seus derivados possuem alta atividade antioxidantes, que sendo capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio (POLEWSKI et al., 2002; KIM, 2007) e também possuem atividade farmacológica como indutores de apoptose de células cancerosas (SERRANO, et al., 1998).

Entre os polifenóis o ácido 3,4-diidroxibenzoico (ácido protocatecuico) é amplamente encontrado em muitos alimentos. É um constituinte da lignina sendo encontrado nas angiospermas (CLIFFORD, 2000). Por possuir dois grupos hidroxila, demonstra uma atividade antioxidante (LODOVIC, 2001). Syafni et al., (2012), ao utilizar esta substância isolada da espécie *Trichomanes chinense*, verificaram sua atividade antimicrobiana *in vitro*, contra o crescimento de *Vibrio colera*. E o extrato bruto, que apresentou inibição contra *Escherichia coli*, pode ser utilizado contra diarreias.

Muciarelli et al (2000), trabalhando com plântulas micropropagadas de tabaco e associando o ácido 3,4-diidroxibenzoico com ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e ácido-indolacético (AIA) verificaram que essas substâncias alteram o potencial de membrana das células radiculares numa interação não específica, interferindo no desenvolvimento das raízes.

Dentre o grupo dos biflavonoides a amentoflavona é a mais comum e tem atividades biológicas de antioxidante (SHI et al., 2008), anticancerígena (GURUVAYOORAPPAN e KUTTAN 2007), anti-inflamatório (WOO et al., 2005),

antimicrobiana (WOO et al., 2005; JUNG et al., 2007) e analgésica (SILVA et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e ácido salicílico (SA) em plântulas de *A. othonianum* Rizz *in vitro*, bem como a quantificação de ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e amentoflavona na parte aérea.

## 3.2 METODOLOGIA

O cultivo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, e as avaliações químicas foram conduzidas no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UNIFRAN – Universidade de Franca – Franca – SP.

### 3.2.1 Material Vegetal e cultivo *in vitro*

As sementes utilizadas foram obtidas de frutos coletados de árvores nativas da região do município de Montes Claros de Goiás (16°10' S de latitude, 51°27' W de longitude, a 412 m de altitude). A exsicata está depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás, *Campus* Jataí, sob o número 3793.

Após a coleta foi feita a despolpa, lavagem, secagem e tratamento das sementes com o fungicida Vitavax-Thiram<sup>®</sup> [Ingrediente ativo (carboxina + tiram): 200 + 200 g/L] na dosagem de 300 mL para 100 kg de sementes, sendo posteriormente armazenadas em câmara fria (18 °C ± 3) até a semeadura.

A germinação foi feita em bandejas plásticas (53x37x8 cm) contendo areia grossa lavada e peneirada como substrato e, mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25 °C ± 3. O controle fitossanitário das plântulas foi realizado com pulverizações de solução fungicida sistêmica de Derosal<sup>®</sup> a 0,2% do produto comercial. Quinzenalmente, foram irrigadas com solução nutritiva composta pelos sais do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Após 30 dias da semeadura, segmentos nodais foram retirados destas e utilizados como fonte de explante.

Foi realizada a pulverização com o fungicida sistêmico Derosal<sup>®</sup> a 0,2%, 12 horas antes da coleta dos segmentos nodais. Depois de coletados estes permaneceram em recipientes com água corrente e três gotas de detergente neutro por 30 minutos.

Posteriormente, foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (20%) durante 20 minutos, e em seguida lavados, em câmara de fluxo laminar, por três vezes com água destilada e autoclavada.

Segmentos nodais, com aproximadamente 2 cm e duas gemas, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultivo. O meio utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), contendo a metade da concentração dos sais (MS 50%), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativo e 30 µM de BAP (6-Benzilaminopurina). O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,3 antes da adição do agente geleificante. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C. Os segmentos nodais inoculados foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de 25 ± 3°C, durante 30 dias (ASSIS, 2011). As plântulas estabelecidas *in vitro* foram subcultivadas aos 30 dias utilizando o mesmo meio, visando a multiplicação de brotos. Três subcultivos foram realizados para se obter o número de plantas suficiente para a instalação dos experimentos.

Os elicitores abióticos testados foram o ácido salicílico (SA) e o nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), ambos nas concentrações de 30 e 60 µM. Para esse procedimento meio de cultivo semelhante ao utilizado para o cultivo, foi preparado e aditivado com os elicitores supracitados.

As plântulas estabelecidas foram subcultivadas para meio fresco permanecendo por 15 dias para se reestabelecerem. Posteriormente, as mesmas foram transferidas para meio fresco contendo os elicitores, permanecendo neste por 30 dias. As plantas do tratamento controle foram transferidas para um meio fresco, sem a adição de elicitores. As avaliações do número de folhas expandidas e o comprimento de parte aérea foram realizadas aos 15 e 30 dias de elicitação.

Ao final do período de elicitação, as partes aéreas foram colhidas e foi obtida a massa fresca de cada plântula. Em seguida, estas foram secas em estufa de ventilação forçada a 35 °C até atingirem massa constante, sendo posteriormente pesadas para a obtenção de massa seca. O material seco foi armazenado em ambiente seco e fresco para posterior análise química.

### 3.2.2 Constituição química dos extratos vegetais

#### 3.2.2.1 Preparo das soluções estoque e construção da curva dos padrões externos

Para obtenção da curva padrão de calibração, foram utilizados os padrões ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona, seguindo o mesmo preparo para todos.

Foram pesados 1 mg de todos os padrões utilizados e adicionados 2000  $\mu\text{L}$  de metanol-HPLC a fim de se obter uma solução estoque de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para diluição foram retiradas alíquotas de 1000  $\mu\text{L}$  da solução e adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de metanol até se obter soluções de concentrações 0,25, 0,125 e  $0,0625 \text{ mg mL}^{-1}$ . Uma última solução foi diluída em 10 vezes utilizando 200  $\mu\text{L}$  da última diluição e 1800  $\mu\text{L}$  de metanol HPLC, obtendo ao final a solução de concentração  $0,00625 \text{ mg mL}^{-1}$ .

As soluções diluídas nas diferentes concentrações foram transferidas ( $\sim 1 \text{ mL}$ ) para frascos do tipo vial em triplicata, para subsequente corrida em cromatógrafo líquido de alta eficiência. Os dados das áreas dos picos de interesse de cada padrão foram registrados em tabelas para a construção da curva de calibração.

A curva de calibração, bem como os parâmetros inerentes a ela, dos quais se pode citar, os coeficientes angular, linear e de correlação  $R^2$ , foram obtidos com auxílio do *software* Excel 2010. Esses parâmetros são imprescindíveis para a criação da equação da reta que será utilizada para a determinação das concentrações de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona nas amostras avaliadas.

#### 3.2.2.2 Obtenção dos extratos brutos

Foram utilizadas partes aéreas das plantas de *A. othonianum* Rizz cultivadas *in vitro*, secas em estufa de ventilação forçada a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  até estabilização da massa. Após maceração e pesagem de 200 mg deste material, fez-se a extração adicionando 4 mL de metanol-HPLC, e banho em ultrassom por 30 min. Posteriormente, foi realizada a filtragem dos extratos com algodão e em filtro com membrana (Advantec HP020AN). Alíquotas de 1000  $\mu\text{L}$  foram pipetadas, com auxílio de pipeta automática, para frascos

do tipo vial e levadas para análise em aparelho de cromatografia líquida. As amostras foram analisadas em triplicata.

Para as análises, foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência, de sistema binário SHIMADZU Proeminence-LC-20AD, equipado com injetor automático SIL-20A HT, acoplado ao detector: UV-VIS modelo SPD-M20A com arranjo de diodo. A coluna analítica usada foi da Phenomenex Phase GEMINI, (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), C18, equipada com pré-coluna de mesmo material, e forno CTO-20A. O volume injetado foi de 20  $\mu$ L, fluxo foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e  $\lambda$  254 nm. A temperatura permaneceu constante em 40 °C. A análise foi efetuada em 60 min com eluente em gradiente linear: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (5:94,9:0,1 v/v/v), CH<sub>3</sub>OH 100% em 30 min, 10 min em MeOH 100% e 20 min para retornar a condição inicial. Foram empregados solventes metanol para HPLC e solução de ácido acético 0,1% preparada em água Milli-Q. Foram utilizados como padrões externos o ácido gálico, o ácido 3,4-diidroxibenzoico e a amentoflavona. A aquisição de dados foi realizada através de um microcomputador.

### **3.2.3 Delineamento Experimental**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 3 x 3 (3 elicitores x 3 tempos de exposição x 3 concentrações) e cada tratamento continha 4 repetições, constituída por 20 tubos de ensaio. Para as análises químicas, as amostras foram analisadas em triplicata. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

## **3.3 RESULTADOS**

### **3.3.1 Crescimento**

O comprimento médio de parte aérea e o número médio de folhas expandidas, não foram influenciados pela interação tripla. Já a interação elicitores *versus* tempo de exposição foi significativa para comprimento médio de parte aérea. Aos 15 dias de elicitação, as plântulas cultivadas na presença de AgNO<sub>3</sub> e SA tiveram maiores médias (4,90 e 4,73 cm, respectivamente), em relação ao controle. Aos 30 dias observou-se o mesmo resultado, em que tanto para plântulas cultivadas na presença de AgNO<sub>3</sub>, quanto

de SA alcançaram os maiores comprimentos (4,92 e 4,96 cm, respectivamente) (Tabela 1).

Independente do elicitor utilizado, aos 15 e 30 dias foram obtidas as maiores médias de comprimento de parte aérea (Tabela 1), demonstrando que o AgNO<sub>3</sub> e o SA não prejudicaram o crescimento das plântulas.

**Tabela 1.** Comprimento médio de parte aérea de plantas de *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro* em diferentes tipos de elicitores e tempos de exposição.

Elicitores	Tempo de exposição (dias)		
	0	15	30
	Comprimento médio de parte aérea (cm)		
Nitrato de Prata (AgNO <sub>3</sub> )	3,51 Bb	4,90 Aa	4,92 Aa
Ácido Salicílico (SA)	4,03 Ab	4,73 Aa	4,96 Aa
Controle	3,83 Cb	4,13 Ba	4,47 Ba

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os elicitores na coluna e minúscula entre as épocas de avaliação na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Para o número médio de folhas expandidas, a interação elicitores *versus* tempo de exposição também foi significativa. As plântulas cultivadas na presença de AgNO<sub>3</sub> e SA apresentaram o maior número médio de folhas expandidas aos 30 dias (2,57 e 2,71, respectivamente), entretanto até os 15 dias de elicitação não ocorreu diferença entre os valores obtidos (Tabela 2).

Já entre os tempos de exposição, as plântulas cultivadas com AgNO<sub>3</sub> e SA, obteve-se os maiores valores de folhas expandidas (2,57 e 2,71) aos 30 dias (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número médio de folhas expandidas de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro* em diferentes tipos de elicitores e tempos de exposição.

Elicitores	Tempo de exposição (dias)		
	0	15	30
	Número médio de folhas expandidas		
Nitrato de prata (AgNO <sub>3</sub> )	1,52 Ac	1,91 Ab	2,57 Aa
Ácido Salicílico (SA)	1,68 Ab	1,88 Ab	2,71 Aa
Controle	1,43 Ab	1,96 Aa	1,92 Ba

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os elicitores na coluna e minúscula entre as épocas de avaliação na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

As diferentes concentrações utilizadas, quando avaliadas isoladamente também proporcionaram maior número médio de folhas expandidas, em que as plântulas

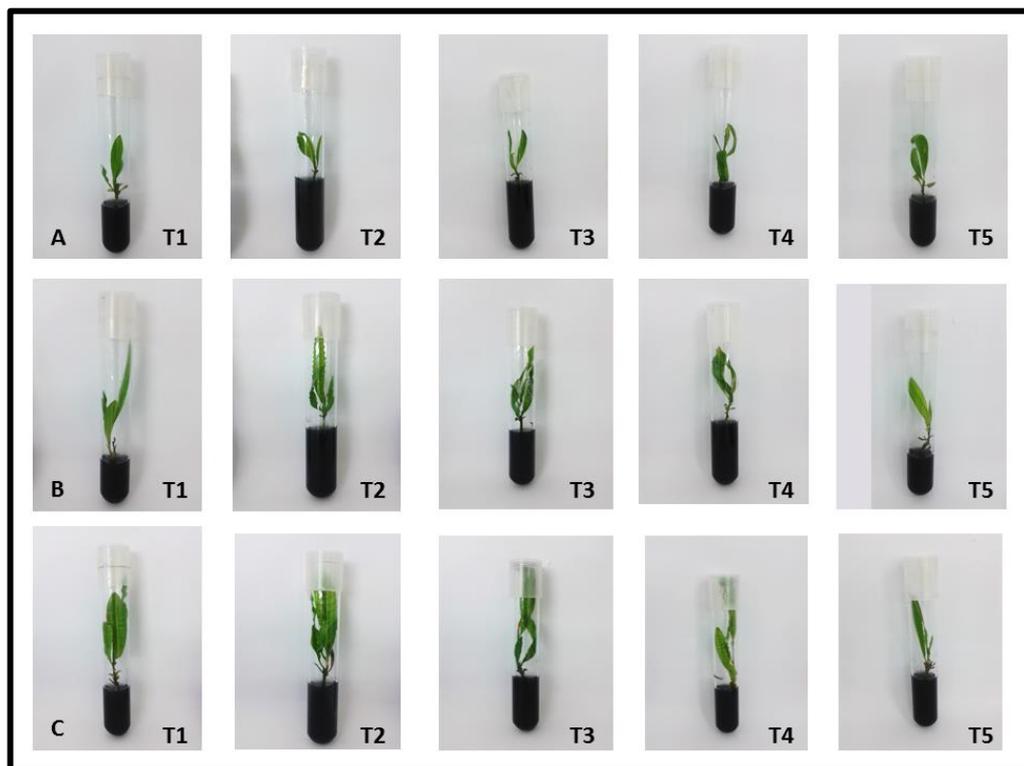
cultivadas sob concentração de 30  $\mu\text{M}$  para ambos elicitores, obtiveram maior valor médio (2,02) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Número médio de folhas expandidas de plantas de *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro* em diferentes concentrações de elicitores ( $\text{AgNO}_3$  ou SA) .

Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	Número médio de folhas expandidas
30	2,02 A
60	1,89 B

<sup>z</sup>Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Foram constatados maiores acúmulos de massa fresca aos 30 dias de cultivo apenas quando as plântulas foram cultivadas na presença de 60  $\mu\text{M}$  de SA (383 mg) (Tabela 4). Já para a massa seca, os maiores valores observados foram em plântulas cultivadas com  $\text{AgNO}_3$  60  $\mu\text{M}$ , SA 30  $\mu\text{M}$  e SA 60  $\mu\text{M}$ , sendo 0,082, 0,083 e 0,085 mg, respectivamente. As plântulas de *A. othonianum* Rizz. podem ser observadas na Figura 1.



**Figura 1.** Plântulas de *A. othonianum* Rizz., aos 0 (A), 15 (B) e 30 (C) dias. (T1 = controle; T2 =  $\text{AgNO}_3$  30  $\mu\text{M}$ ; T3 =  $\text{AgNO}_3$  60  $\mu\text{M}$ ; T4 = SA 30  $\mu\text{M}$ ; T5 = AS 60  $\mu\text{M}$ ).

**Tabela 4.** Médias dos valores obtidos de matéria fresca e matéria seca de plântulas de *A. othonianum* Rizz aos 30 dias após exposição aos diferentes elicitores.

Tratamento	MF	MS
	mg	
Controle	225 b <sup>z</sup>	0,06 b
AgNO <sub>3</sub> 30 µM	252 ab	0,07 ab
AgNO <sub>3</sub> 60 µM	294 ab	0,08 a
SA 30 µM	304 ab	0,08 a
AS 60 µM	383 a	0,08 a

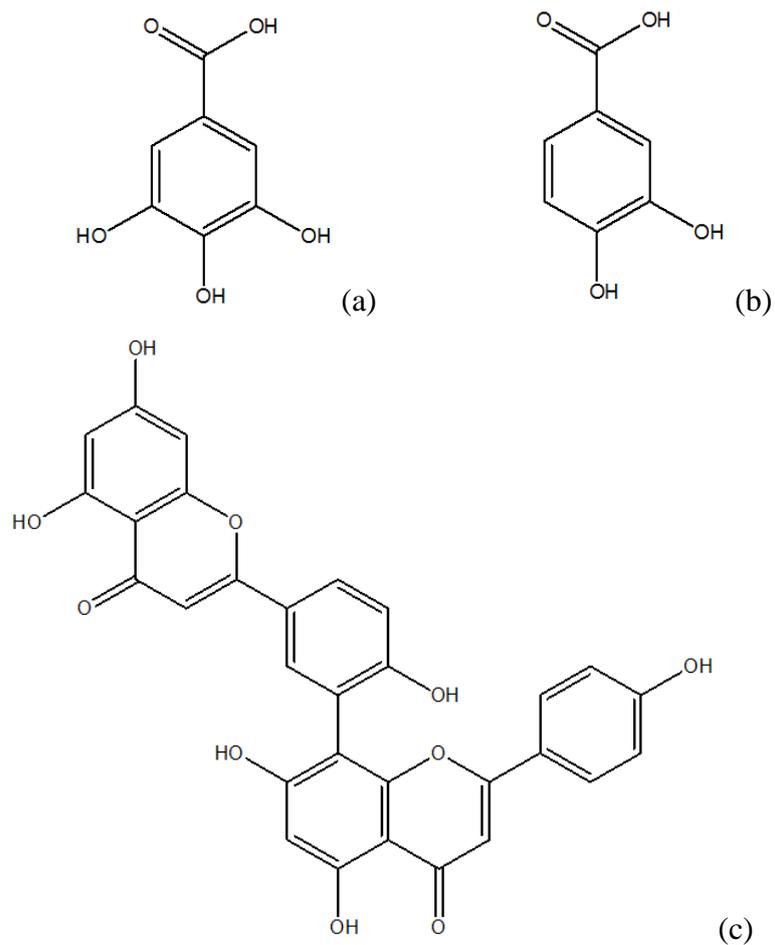
<sup>z</sup>Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

### 3.3.2 Análise da constituição química dos extratos vegetais

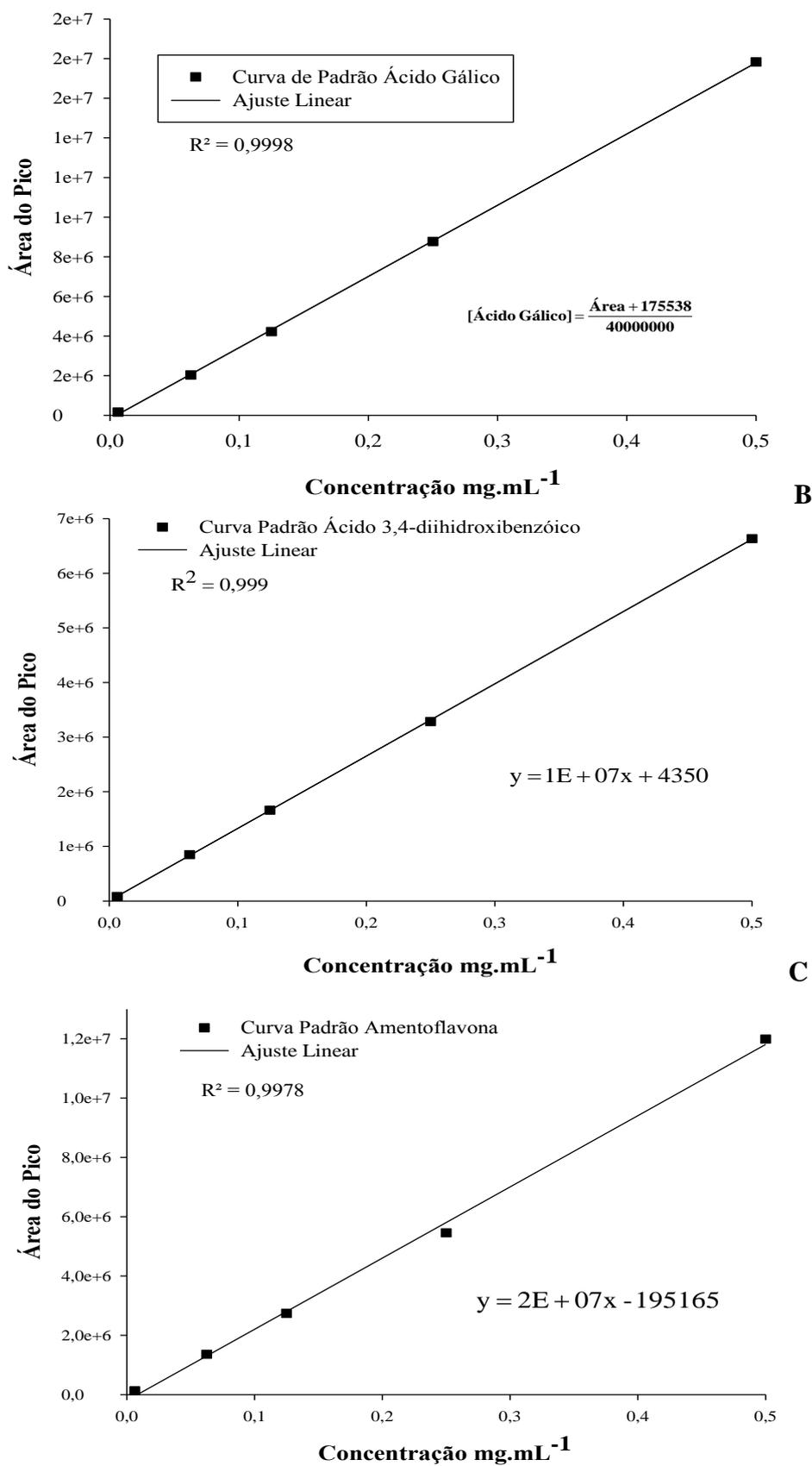
### 3.3.3 Curva padrão de calibração

Pela Figura 1 é possível observar que os pontos apresentam uma boa linearidade e isso pode ser confirmado pelos valores dos coeficientes de correlação linear, sendo  $R^2 = 0,998$ ,  $0,9999$  e  $0,9978$ , respectivamente. De posse dos coeficientes angular e linear foi possível criar as equações para quantificação dos teores de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona nas amostras estudadas.

A curva de calibração, bem como os parâmetros inerentes a ela, os coeficientes angular, linear e de correlação  $R^2$ , foram obtidos com auxílio do *software* Excel 2010. Esses parâmetros são imprescindíveis para a criação da equação da reta que será utilizada para a determinação das concentrações de cada substância. A estrutura molecular destas três substâncias pode ser observada na figura 4. Pela figura 5 é possível observar que os pontos apresentam boa linearidade e isso pode ser confirmado pelos valores dos coeficientes de correlação linear, sendo  $R^2 = 0,998$ ,  $0,9999$  e  $0,9978$ , respectivamente (Figura 4). De posse dos coeficientes angular e linear foi possível criar as equações para quantificação dos teores de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona nas amostras estudadas.



**Figura 1.** Estruturas moleculares dos padrões utilizados para a curva padrão (ácido gálico (a), ácido 3,4-diidroxibenzoico (b) e amentoflavona (c)).

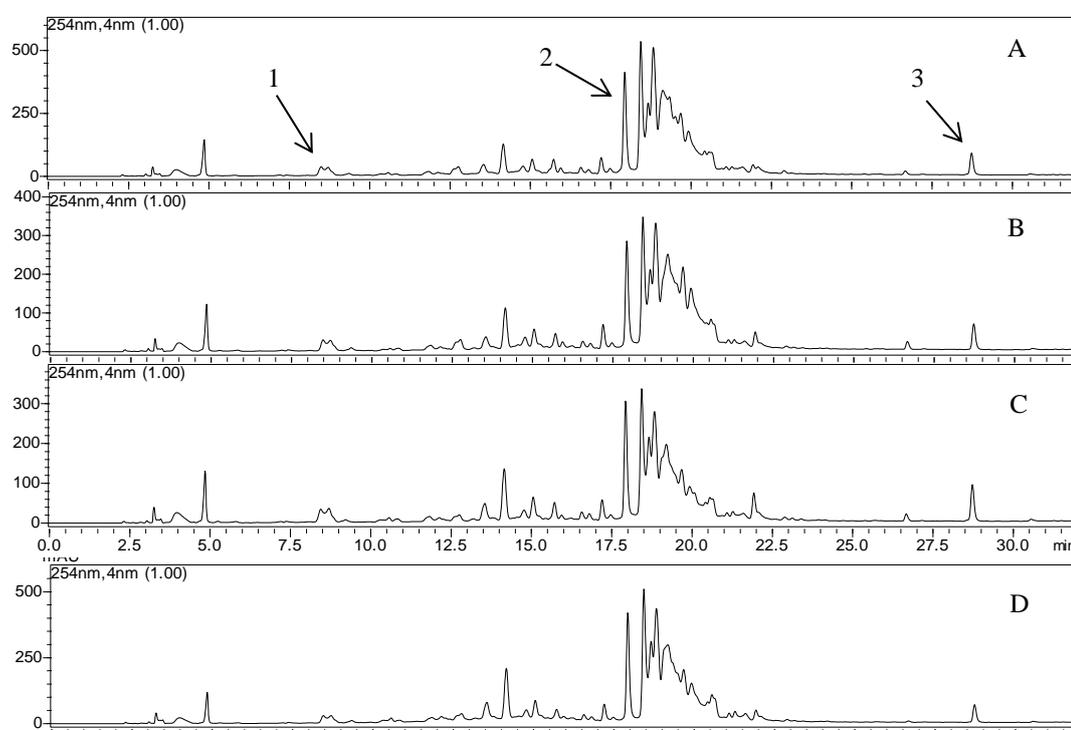


**Figura 2.** Curvas padrão de calibração dos padrões ácido gálico (A), ácido 3,4-dihidroxi benzoico (B) e amentoflavona (C), plotadas através da área do pico *versus* concentração em mg mL<sup>-1</sup>.

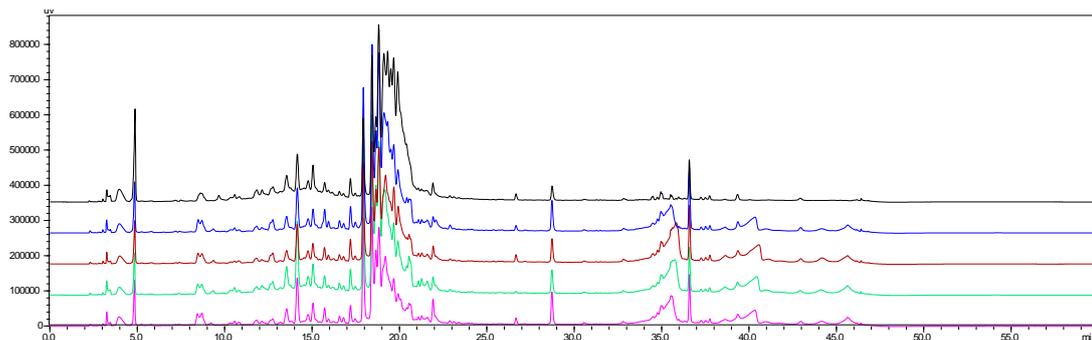
Após a obtenção da curva de calibração, foram obtidos os valores das áreas dos picos correspondentes a cada substância a ser quantificada nas amostras analisadas. Utilizando as equações 1, 2 e 3 e substituindo os valores das áreas foi possível determinar a concentração do ácido gálico, do ácido 3,4-diidroxibenzoico e da amentoflavona em cada uma das amostras.

### 3.3.4 Quantificação de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona

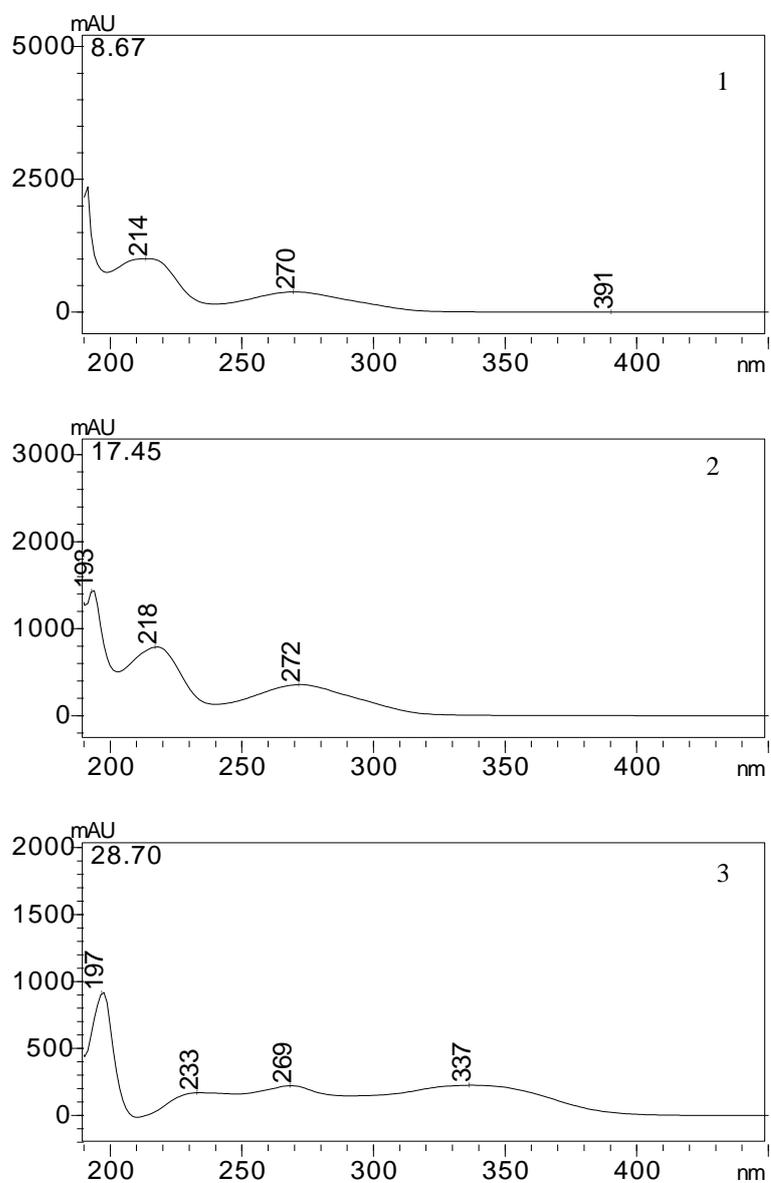
Os cromatogramas com o tempo de retenção e os espectros de UV de cada substância quantificada podem ser observados nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente.



**Figura 3.** Perfil cromatográfico do ácido gálico (1), ácido 3,4-diidroxibenzoico (2) e amentoflavona (3), obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de *A. othonianum* Rizz. cultivadas sob  $\text{AgNO}_3$  30  $\mu\text{M}$  (A),  $\text{AgNO}_3$  60  $\mu\text{M}$  (B), SA 30  $\mu\text{M}$  (C), SA 60 $\mu\text{M}$  (D).



**Figura 4.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir dos extratos metanólicos de *A. othonianum* Rizz. cultivados sob ausência de elicitor,  $\text{AgNO}_3$  30  $\mu\text{M}$ ,  $\text{AgNO}_3$  60  $\mu\text{M}$ , SA 30  $\mu\text{M}$  e SA 60 $\mu\text{M}$ .



**Figura 5.** Espectros de UV do ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e amentoflavona.

Os teores médios de ácido gálico em plântulas cultivadas com 60  $\mu\text{M}$  de AS não diferiram em relação ao controle, com valores médios de 0,30 e 0,30  $\text{mg g}^{-1}$  MS. Foi constatada a redução no teor desta substância quando as plântulas foram cultivadas com 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$ , apresentando a média de 0,27  $\text{mg g}^{-1}$  MS. Já para as plântulas cultivadas com o mesmo elicitor na concentração de 60  $\mu\text{M}$  e para o AS 30 $\mu\text{M}$ , o teor desta substância foi ainda menor observando os valores médios de 0,25 e 0,25  $\text{mg g}^{-1}$  MS (Figura 6A).

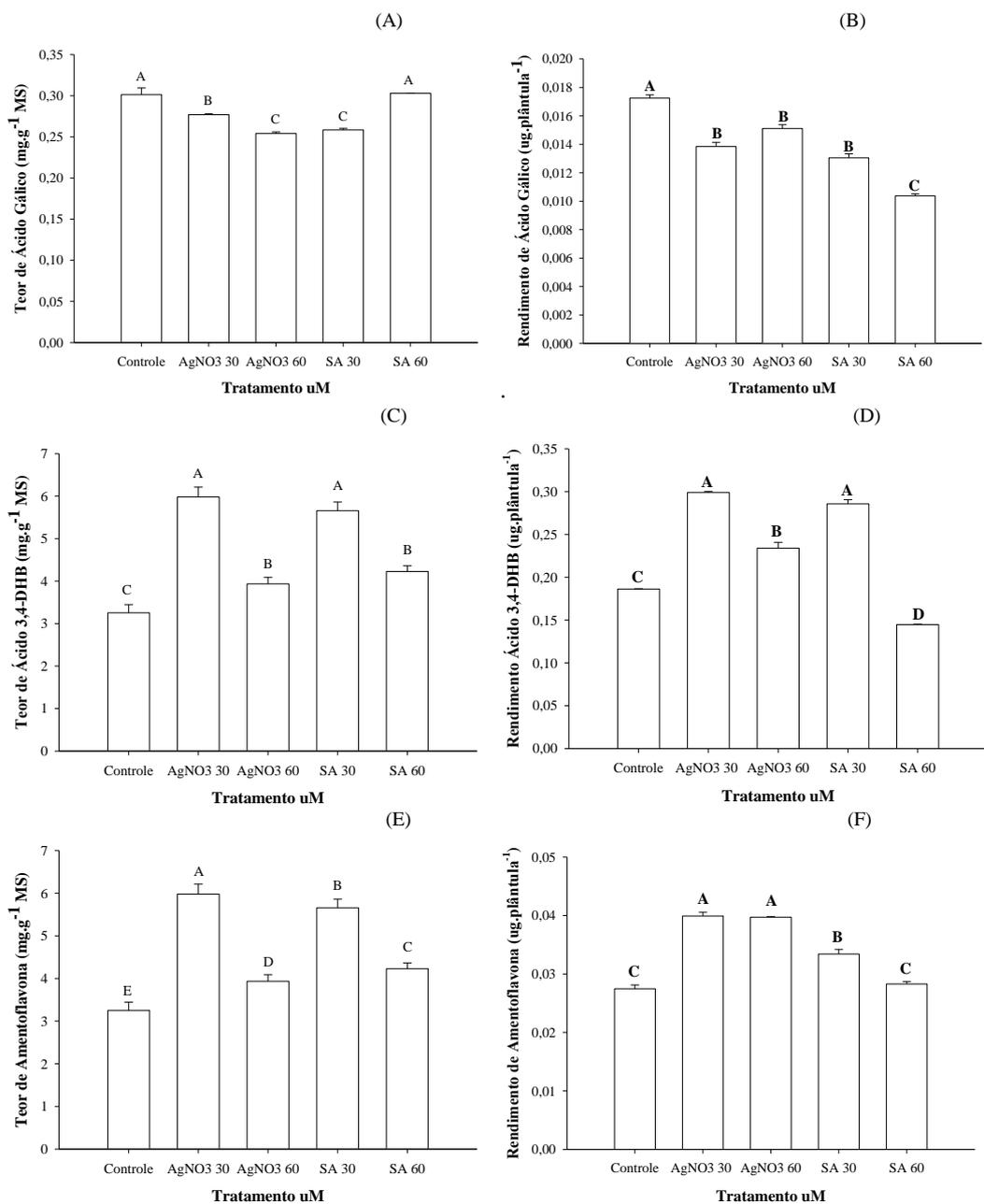
Para o rendimento de ácido gálico, houve diminuição desta substância nas plântulas cultivadas na presença de  $\text{AgNO}_3$  independente da concentração estudada, e SA 30  $\mu\text{M}$  que não se diferiram entre si, apresentando valores médios de 0,01, 0,01 e 0,01  $\text{mg g}^{-1}$ . Os menores rendimentos foram observados nas plântulas cultivadas na presença de  $\text{AgNO}_3$  60 $\mu\text{M}$  (0,01  $\text{mg g}^{-1}$ ) (Figura 6B).

Plântulas cultivadas na presença de 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  e SA obtiveram aumento na produção do ácido 3,4-diidroxibenzoico, apresentando valores médios de 5,98 e 5,65  $\text{mg g}^{-1}$  MS. Os teores desta substância nas plântulas sob tratamento com 60  $\mu\text{M}$  de SA e  $\text{AgNO}_3$  também aumentaram em relação ao controle, apresentando teores intermediários, 3,93 e 4,22  $\text{mg g}^{-1}$  MS, respectivamente. O menor teor de ácido 3,4-diidroxibenzoico foi observado nas plântulas cultivadas sem a presença de elicitores (controle) com um valor médio de 3,25  $\text{mg g}^{-1}$  MS (Figura 6C).

Maiores rendimentos de ácido 3,4-diidroxibenzoico foram constatados em plântulas cultivadas na presença de  $\text{AgNO}_3$  independente da concentração estudada ou SA 30  $\mu\text{M}$ , em relação controle com valores médios, que foi intermediário, 0,29, 0,23, 0,28 e 0,18  $\text{mg g}^{-1}$  MS respectivamente. O SA 60  $\mu\text{M}$ , causou redução neste rendimento em relação ao controle, com um valor médio de 0,14  $\text{mg g}^{-1}$  (Figura 3D).

Plântulas cultivadas na presença de  $\text{AgNO}_3$  ou SA, independente da concentração avaliada tiveram os teores de amentoflavona aumentados, apresentando valores médios de 0,82, 0,79, 0,66, 0,66  $\text{mg g}^{-1}$  MS, respectivamente. As plântulas cultivadas na ausência de elicitores apresentaram o menor valor médio observado (0,42  $\text{mg g}^{-1}$  MS) (Figura 6E).

Plântulas cultivadas na presença de  $\text{AgNO}_3$  ou SA apresentaram elevação no rendimento de amentoflavona comparado ao controle, exceto quando foram cultivadas com a presença de SA 60 $\mu\text{M}$ , que não diferiu deste (Figura 6F).



**Figura 6.** Teor e rendimento de ácido gálico (A e B), ácido 3,4-dihidroxi benzoico (C e D) e amentoflavona (E e F) em plântulas de *A. othonianum* Rizz, submetidas a diferentes concentrações de AgNO<sub>3</sub> e SA. MS = matéria seca. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*As barras verticais representam o erro padrão da média das triplicatas

### 3.4 DISCUSSÃO

Coste et al. (2011) em trabalho com espécies de *Hypericum* sp. *in vitro*, utilizando concentrações de 0, 100 e 200  $\mu$ M de ácido salicílico e jasmônico, observaram que a biomassa da parte aérea das plantas tratadas não foi afetada com as concentrações utilizadas. Isto demonstra que a elicitação é um processo que depende de

muitos fatores tais como a concentração do elicitador, a fase de crescimento da cultura no momento da adição do elicitador e o tempo de contato da cultura com o elicitador. Além disso, a resposta ao determinado agente elicitador pode variar de espécie para espécie e é crucial determinar as concentrações adequadas para otimizar a produção dos metabólitos de interesse (NAMEDO, 2007).

Brandão (2012) observou decréscimo de 81% no crescimento das plântulas de *Alternanthera tenella* Colla, quando comparou os tratamentos com SA de 0 e 400  $\mu\text{M}$ . Este resultado não foi observado neste estudo, em que as plântulas de *A. othonianum* Rizz, não tiveram menor comprimento em relação ao controle quando tratadas com SA. Este resultado demonstra que a redução no crescimento das plântulas foi a alta dosagem do elicitador utilizado, uma vez que foram utilizadas doses de 30 e 60  $\mu\text{M}$ , que correspondem a 7,5 e 15 % da dose considerada tóxica pelo autor mencionado.

Outro fator a ser observado em relação ao trabalho do mesmo autor, foi o momento da elicitação, e o mesmo inoculou os explantes diretamente no meio contendo o elicitador. No presente trabalho, as plântulas foram reestabelecidas sendo subcultivadas para um meio fresco sem a presença de elicitador por 15 dias, antes da elicitação. Depois desse período a plântula já havia expandido folhas e retomado seu crescimento e foi realizada a elicitação, transferindo-a para meio fresco contendo os elicitores, sem causar cortes em sua estrutura. Assim, a possível toxicidade pode ter sido reduzida ou evitada, pois a plântula não estava debilitada.

De acordo com Yu et al. (2006), esse aumento vem acompanhado pela indução de enzimas relacionadas a síntese de fenilpropanoides e regulação da expressão de genes relacionados a defesa das plantas. No entanto, altas concentrações de ácido salicílico acabam apresentando efeito negativo para a produção dos compostos fenólicos, como observado no trabalho de Brandão et al (2012), em que a concentração de 400  $\mu\text{M}$  prejudicou o desenvolvimento de *Alternanthera tenella* Colla. Kovacik et al. (2009) utilizaram a concentração de 250  $\mu\text{M}$  e observaram efeito tóxico, atribuindo ao aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase. Este efeito tóxico não foi observado no presente trabalho, pois as plântulas se desenvolveram normalmente.

Um maior acúmulo de ácido palmítico e esteárico foi observado ao cultivar *Lemna paucicostata* em meio contendo metil jasmonato e  $\text{AgNO}_3$ , principalmente aos 35 dias de cultivo (SUH, et al, 2013). Resultado semelhante ao presente estudo, em que a dosagem de 30 $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  causou maior acúmulo de ácido 3,4-diidroxibenzoico.

A elicitação com  $\text{AgNO}_3$  causou maior acúmulo de sakuranetina (5,4'-dihidroxi-7-metilflavonona) quando se pulverizou a solução de 1% nas folhas de arroz (LUM, 2009). A mesma concentração causou maior acúmulo de risitina em tomate (CHIEW e LUM, 2008).

Bhuvanewari et al., (2012) observaram aumento nos teores de ácido cinâmico em *Gymnema sylvestre* ao realizar o cultivo de suspensão de células em meio contendo 1 mM de  $\text{AgNO}_3$ .

Suh et al., (2013) observaram que os teores de compostos fenólicos, como o ácido cinâmico, ácido cafeico, ácido fumárico e ácido málico foram significativamente maiores nas plantas cultivadas na ausência de elicitores. Estes resultados sugerem que plantas elicitadas com  $\text{AgNO}_3$  podem reduzir a atividade das vias biossintéticas dos compostos fenólicos.

### 3.4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram que os elicitores possuem a capacidade de alterar os teores dos compostos quantificados. A elicitação com  $\text{AgNO}_3$  e SA não aumentaram os teores de ácido gálico, entretanto promoveram aumento nos teores de ácido 3,4-diidroxibenzoico, principalmente quando utilizada a concentração de 30  $\mu\text{M}$  para ambos. Para os teores de amentoflavona houve o aumento com todos os tratamentos utilizados, sendo observados os melhores resultados com o  $\text{AgNO}_3$ .

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHUVANESWARI, C.; KIRANMAYEE, R.; SURYAKALA, G.; ARCHANA, G. Abiotic elicitation of gymnemic acid in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.741–747, 2012.

CHIEW, S. L.; LUM, M. S. Accumulation of rishitin in tomato after elicited by silver nitrate. In: The 1 st International Conference on Plant Secondary Metabolism – Malaysia. p. 1, 2008.

COSTE, A.; VLASE, L.; HALMAGYI, A.; DELIU, C.; COLDEA, G. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.106, p.279-288, 2011.

GURUVAYOORAPPAN C, KUTTAN G. Effect of amentoflavone on the inhibition of pulmonary metastasis induced by B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice. **Integrative Cancer Therapies** 6 (2): 185-197, 2007.

JUNG, H.J.; PARK, K.; LEE, I.S.; KIM, H.S.; YEO, S.H.; WOO, E.R.; LEE, D.G. SPhase accumulation of *Candida albicans* by anticandidal effect of amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 30 (10): 1969-1971, 2007.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Guanabara: Koogan, 2008. 452 p.

KIM, Y.J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.30 p. 1052-5, 2007.

KOVÁČIK, J.; GRÚZ, J.; BACKOR, M.; STRNAD, M.; REPCÁK, M. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. **Plant Cell Reports**, v.28, p.135-143, 2009.

KUMAR, V; PARVATAM, G; RAVISHANKAR, G.A. AgNO<sub>3</sub> - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 12, n. 12. 2009.

LUM, M. S. Quantification of Sakuranetin in Paddy Leaves and Stem after Elicitation with Abiotic Elicitors (UV, AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>). **Modern Applied Science**, p. 210-216, 2009.

MUCCIARELLI, M.; SACCO, S.; GALLINO, M.; MAFFEI, M. Effects of 3,4-dihydroxybenzoic acid on root membrane potential in micropropagated tobacco plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 3–10, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol**, v. 15, p.473-479, 1962.

NAMEDO, A.G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. **Pharmacognosy Reviews**, v.1, p.69–79, 2007.

NIEMETZ, R.; GROSS, G.G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2001-11, 2005.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SLAWINSKA, D. Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. **Current Topics on Biophysics**, v. 26, p.217-27, 2002.

QIAN, Z.G.; ZHAO, Z.J.; XU, Y.; QIAN, X.; ZHONG, J.J. Novel chemically synthesized salicylate derivative as an effective elicitor for inducing the biosynthesis of plant secondary metabolites. **Biotechnology Progress**, v.22, p.331–333, 2006.

SANTIAGO, L.J.M.; LOURO, R.P.; OLIVEIRA, D.E. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Annals Botany*, v. 86, p.1023–1032, 2000.

SERRANO, A.; PAPACIOS, C.; ROY, G.; CESPON, C.; VILLAR, M.L.; NOCITO, M.; GONZALEZ-PORQUE, P. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 350, p. 49-54, 1998.

SHI, S.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; HUANG, K. Hyphenated HSCCC-DPPH for rapid preparative isolation and screening of antioxidants from *Selaginella moellendorffii*. **Chromatographia**, v. 68, p.173-178, 2008.

SILVA, D.B. da; SILVA, J.A. da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.de. Frutas do cerrado. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológica**, p. 179, 2001.

SILVA, K.L.; SANTOS, A.R.; MATTOS, P.E.; YUNES, R.A.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. **Therapie**, v. 56, p. 431-434, 2001.

SYAFNI, N.; PUTRA, D. P.; ARBAIN, D. 3,4-dihydroxybenzoic acid and 3,4-dihydroxybenzaldehyde from the fern *Trichomanes chinense* L.; isolation, antimicrobial and antioxidant properties. **Indonesian Journal of Chemistry**, vol. 12, n.3, p. 273-278, 2012.

SUH, H.W.; HYUN, S.; KIM, S.; LEE, S.; CHOI, H. Metabolic profiling and enhanced production of phytosterols by elicitation with methyl jasmonate and silver nitrate in whole plant cultures of *Lemna paucicostata*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1581–1586, 2013.

TORRES A. C.; BARBOZA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília-DF, (Circular Técnica, n. 24), p. 19, 2001.

WOO, E.R.; POKHAREL, Y.R.; YANG, J.W.; LEE, S.Y.; KANG, K.W. Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation by 2',8"-biapigenin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 5, p.976-980, 2006.

YU, Z.Z.; FU, C.X.; HAN, Y.S.; LI, Y.X.; ZHAO, D.X. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. **Biotechnology Letters**, v.28, p.1027-1031, 2006.

## CONCLUSÃO GERAL

Plântulas de *Anacardium Othonianum* Rizz, quando cultivadas sob elicitación física e química têm sua composição fenólica afetada. A luz azul proporcionou aumento na concentração de ácido gálico e amentoflavona, e a luz vermelha aumentou a concentração de ácido 3,4-diidroxibenzoico. O AgNO<sub>3</sub> e SA não aumentaram os teores de ácido gálico, entretanto causaram aumento nos teores de ácido 3,4-diidroxibenzoico, principalmente quando utilizada a concentração de 30 µM para ambos. Os teores de amentoflavona aumentaram com todos os tratamentos utilizados, sendo observados os melhores resultados com o AgNO<sub>3</sub>. Dentre todos os tratamentos e compostos estudados conclui-se que a utilização de luz azul na produção de ácido gálico é a elicitación de maior interesse, uma vez que este composto é muito visado na farmacologia principalmente por ter atividade anticancerígena.

Trabalhos utilizando plantas com atividade farmacológicas são importantes pois alavancam a descoberta de novos fármacos, e utilizar a elicitación é interessante porque através desta é possível alterar as vias metabólicas aumentando a produção *in vitro* de compostos de maior interesse. Este foi o primeiro trabalho com elicitación abiótica em plântulas de *Anacardium Othonianum* Rizz *in vitro*, e pôde-se observar que a espécie em questão se mostra promissora na produção de moléculas bioativas.

Além disso, utilizar outras técnicas para o cultivo como o uso de suspensão celular e calos também devem ser estudados, uma vez que alguns trabalhos comparando a fonte de explante utilizados mostraram diferenças na composição química e no teor dos compostos quantificados.