

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE ALCALÓIDES ESTEROIDAIIS
E COMPOSTOS FENÓLICOS EM ESPÉCIES NATIVAS DO
GÊNERO *SOLANUM*, COM ÊNFASE EM
Solanum pseudocapsicum L.**

LUCIANA BAVARESCO ANDRADE TOUGUINHA

CAXIAS DO SUL
2009

LUCIANA BAVARESCO ANDRADE TOUGUINHA

**PRODUÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE ALCALÓIDES ESTEROIDAIIS
E COMPOSTOS FENÓLICOS EM ESPÉCIES NATIVAS DO
GÊNERO *SOLANUM*, COM ÊNFASE EM
Solanum pseudocapsicum L.**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, visando a obtenção de grau de Doutor em
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientador: Dr. Horácio Heinzen

CAXIAS DO SUL
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

T722p Touguinha, Luciana Bavaresco Andrade
Produção *in vivo* e *in vitro* de alcalóides esteroidais e compostos
fenólicos em espécies nativas do gênero *Solanum*, com ênfase em *Solanum*
pseudocapsicum L. [recurso eletrônico] / Luciana Bavaresco Andrade
Touguinha. – 2009.
Dados eletrônicos.
Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, 2009.
Orientação: Sergio Echeverrigaray.
Coorientação: Horácio Heinzen.
Modo de acesso: World Wide Web
Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>
1. Biotecnologia. 2. Fenóis. 3. Compostos químicos. I. Echeverrigaray,
Sergio, orient. II. Heinzen, Horácio, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 60

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

LUCIANA BAVARESCO ANDRADE TOUGUINHA

Produção *in vivo* e *in vitro* de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em espécies nativas do gênero *Solanum*, com ênfase em *Solanum pseudocapsicum* L.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientador: Prof. Dr. Horácio Heinzen

TESE APROVADA EM 26 DE NOVEMBRO DE 2009

~~Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray~~

~~Prof. Dr. Arthur Fett-Neto~~

~~Prof. Dra. Verônica Cesio~~

~~Prof. Dra Adriana Del Carmen Escalona Gower~~

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender
nem tão pequeno que não possa ensinar”*

Esopo

Dedico

A meus pais, **Manolo** e **Gema**, pelo exemplo, amor e apoio incondicionais com os quais contei toda a minha vida.
Se não fosse por vocês jamais chegaria aqui.

A meu marido **Ricardo**, companheiro e amor.
A meu filho **Lucas** razão da minha vida.

Vocês são meu verdadeiro tesouro e minha real vitória.
Muito Obrigada! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pela vida e por estar sempre a meu lado em todos os momentos da minha vida.
- Ao resto da minha pequena família, Fernando e Flávia, Nestor e Laura e Cely pela torcida e incentivo.
- A Universidade de Caxias do Sul pelo desconto concedido e oportunidade de realização desse trabalho.
- Ao Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray pela confiança, orientação e liberação para a execução desse doutorado. Obrigada chefe!
- Ao Prof. Dr. Horácio Heinzen pelas análises químicas realizadas, co-orientação à distância e momentos muito agradáveis passados em Montevideu.
- A mis amigas de Uruguai Cláudia, Maria Fernanda y Tia Teresa por su amistad de tantos años. Mi agradecimiento y cariño!
- Ao Prof. Dr. Maurício da Silveira, pelo exemplo e apoio. Minha extrema estima e admiração.
- Aos professores Aldo Dillon e Adriana Gowe pelas importantes observações e sugestões durante a execução desse trabalho.
- Aos professores do curso do CPGB da Universidade de Caxias do Sul pelas disciplinas cursadas durante este trabalho, pela amizade e pelos valiosos conhecimentos adquiridos.
- Aos funcionários da Universidade de Caxias do Sul em especial a Claudete Salvador, Fabiana Agostini, Luciana Rota e Ana Cristina pelo apoio e amizade.
- Ao Laboratório de Óleos Essenciais e o Laboratório de Farmacognosia & Produtos Naturais da Faculdade de Química da República Oriental del Uruguay pelas análises químicas, aprendizado e apoio a esse trabalho.
- Aos amigos que fiz durante esses anos de doutorado no laboratório, em especial: Rosane Carrer, Liane Ártico, Roberta Basso, Bernardete Carelli, Felipe Graziotin, Gustavo Agostini, Daniel Gatti, Fernanda Cattani e a todos os atuais colegas do LBVEMA.
- A meus parceiros e amigos da Cultura de Tecidos Morgana Isotton, Débora Montezano, Maurício Santini pela incansável torcida e apoio, em especial a Valquíria Tavares e Marina Felippi pela grande ajuda no fechamento desta tese, Muito Obrigada!
- A minha amiga-irmã Manuela Figueiró. Te amo muito!

- As minhas grandes amigas Lélis e Janice pela torcida, força e exemplo.
- E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

vii

Lista de Tabelas

ix

vii

Lista de Figuras	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aspectos Gerais da Família Solanaceae e Gênero <i>Solanum</i>	4
2.2. Metabolismo Secundário	9
2.3. Aspectos Gerais dos Alcalóides	12
2.3.1. Alcalóides Esteroidais	14
2.3.1.1. Ocorrência dos Alcalóides Esteroidais	15
2.3.1.2. Biossíntese dos Alcalóides Esteroidais	16
2.3.1.3. Classificação dos Alcalóides Esteroidais	19
2.3.1.4. Propriedades Biológicas dos Alcalóides Esteroidais em plantas	26
2.3.1.5. Farmacologia dos Alcalóides Esteroidais	27
2.3.2. Métodos de Detecção e Obtenção de Alcalóides Esteroidais	29
2.4. Compostos Fenólicos em Plantas	30
2.5. Cultura de Tecidos Vegetais Aplicada a Produção de Metabólitos Secundários	33
2.6. Transformação Genética via <i>Agrobacterium</i>	40
	viii

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. Capítulo 1 – A survey of steroid alkaloids and phenolic content in <i>Solanum</i> species from South Brazil.	48
3.2. Capítulo 2 – <i>In vitro</i> propagation of <i>Solanum pseudocapsicum</i> L.: an emergin ornamental and medicinal plant.	65
3.3. Capítulo 3 – Conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em cultivos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Solanum pseudocapsicum</i> L.	77
3.4. Capítulo 4 – Identificação e quantificação de alcaloides esteroidais em plantas transformadas de <i>Solanum pseudocapsicum</i> L.	99
4. CONCLUSÕES	117
5. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes e exemplos de Metabólitos Secundários.....	9
---------------------------------------------------------------------	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa da distribuição mundial da família Solanaceae.	4
Figura 2.	Mapa da distribuição mundial do gênero <i>Solanum</i> .	5
Figura 3.	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.	11
Figura 4.	Mecanismo de incorporação do nitrogênio na biossíntese de alcalóides esteroidais. HOP: fosfato ou pirofosfato.	16
Figura 5.	Exemplo de alcalóides esteroidais obtidos a partir do colesterol.	17
Figura 6.	Hidroxilação primária do grupo metil 26 ou 27 determina a configuração final no carbono 25.	18
Figura 7.	Rota para formação dos anéis E e F em alcalóides esteroidais.	18

Figura 8. Exemplos de alcalóides do tipo aminopregnano.	21
Figura 9. Exemplos de alcalóides do tipo espirosolanos.	22
Figura 10. Exemplos de alcalóides do tipo solanidanos.	23
Figura 11. Exemplos de alcalóides do tipo solanocapsinas.	24
Figura 12. Exemplos de alcalóides do tipo piperidilpregnanos simples.	24
Figura 13. Exemplos de alcalóides de <i>Veratrum</i> .	25
Figura 14. Exemplos de alcalóides de <i>Buxus</i>	25
Figura 15. Representação esquemática de um plasmídeo Ti típico do tipo octopina e sua respectiva região de T-DNA.	42

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo a avaliação do conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em plantas nativas e exóticas do gênero *Solanum*, assim como o cultivo *in vitro* e a transformação de *S. pseudocapsicum* e sua influência na produção de alcalóides e fenóis. Os resultados obtidos mostraram alta variação no conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em plantas do gênero *Solanum* comumente encontradas no sul do Brasil. O maior conteúdo de alcalóides foi constatado em tecidos aéros, particularmente folhas jovens, de *S. pseudocapsicum* sendo o seu alcalóide majoritário identificado com solanocapsina. Elavada taxas de multiplicação foi obtida no cultivo *in vitro* de *S. pseudocapsicum* em meio MS com 4.4 µM BA e intenso enraizamento foi constatado em meio MS com 2.46 µM IBA or 5.71 µM IAA. Em cultivo

in vitro foi evidenciada ação estimulante de concentrações de até 4.4 μ M BA sobre a produção de biomassa vegetal e conteúdo de alcalóides esteroidais, atingindo concentrações superiores às evidenciadas em folhas apicais de plantas *in vivo*. A transformação genética de *S. pseudocapsicum* por *A. rhizogenes* é eficiente, ocorrendo regeneração direta de plantas com características fenotípicas alteradas. Análise de extratos de partes aéreas e raízes de plantas transformantes mostraram conteúdo médio de alcalóides esteroidais semelhante a plantas não transformadas. Porém, um transformante apresentou um aumento de 56% no conteúdo de alcalóides, indicando que a obtenção e seleção de transformantes pode contribuir para o incremento da produção destes compostos. Análise dos extratos permitiu constatar alterações no padrão de substituições no anel esteroidal em plantas transformantes, indicando que as alterações metabólicas decorrentes da transformação afetam direta ou indiretamente o processo de ciclização.

ABSTRACT

The objectives of this work were to evaluate the content of steroid alkaloids and phenolic compounds in native and exotic plants of the genus *Solanum*, as well as the *in vitro* culture and transformation of *S. pseudocapsicum* and their influence on the production of alkaloids and phenolics. The results showed high variability in steroid alkaloids and phenolics among *Solanum* species currently found in south Brazil. The highest alkaloid content was determined in the aerial parts, particularly young leaves, of *S. pseudocapsicum*, with solanocapsine identified as the main alkaloid. High *in vitro* multiplication rates of *S. pseudocapsicum* were obtained on MS medium supplemented with 4.4 μ M benzyladenine, and abundant rooting was observed on MS medium with 2.46 μ M indolebutyric acid or 5.71 μ M indoleacetic acid. Plant biomass and steroid alkaloid content was stimulated by benzyladenine concentration up to 4.4 μ M, attaining alkaloid concentrations significantly higher than those evidenced in young leaves of *in vivo* plants. *S. pseudocapsicum* genetic

transformation with *A. rhizogenes* was efficient, with spontaneous regeneration of transformed plants that exhibited typical phenotypic traits. The mean alkaloid content of transformed and non-transformed plants was similar. However, one transformant exhibited a 56% increase in alkaloid content, indicating that the selection of transformants can contribute to enhance the production of these compounds. The analysis of the extracts allowed identifying modifications on the substitution patterns on the steroidal ring in transformed plants, indicating that metabolic modification produced by transformation affect the cyclization process.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecidamente um dos maiores centros de biodiversidade do mundo. A Floresta Amazônica, a Mata Atlântica e o Cerrado recebem atenção especial tanto de instituições nacionais quanto internacionais. Estes biomas, são considerados uma importante reserva de plantas com potencial biotecnológico, além de apresentarem uma parte da sua biodiversidade ainda desconhecida e constantemente sujeita a ação antrópica.

A região sul do Brasil possui características próprias de transição entre o clima tropical e temperado sendo considerada centro de origem de diversas plantas e animais. Dessa forma, o estudo de plantas nativas dessa região torna-se relevante do ponto de vista de conservação e também tecnológico.

Algumas plantas produtoras de metabólitos secundários de interesse são utilizadas em aplicações industriais e quando associadas às técnicas de cultivo *in vitro*, contribuem em alguns casos, com valores significativos no que se refere à quantidade e qualidade quando comparadas à produção tradicional desses produtos naturais, podendo estas, serem utilizadas como condimentos, aromas e fragrâncias, biocombustíveis, plásticos, enzimas, preservativos, cosméticos, pigmentos naturais, medicamentos e

produtos de interesse na agroindústria. Porém, ainda é necessário um maior conhecimento da maioria das funções desses metabólitos secundários, e possíveis ações sinérgicas entre moléculas, locais de biossíntese na planta, rotas desses metabólitos secundários e enzimas envolvidas no processo, assim como a ação de agentes bióticos e abióticos como elicitores ou inibidores da produção desses metabólitos *in vivo* e *in vitro*.

As plantas consideradas com potencial biotecnológico são, em grande parte das vezes, fontes exclusivas desses importantes compostos. Uma das classes de compostos que vem despertando crescente interesse são os alcalóides, em especial os alcalóides esteroidais, devido à sua importância como precursores do colesterol e de hormônios esteroidais.

Em busca da otimização na produção desses metabólitos de interesse, torna-se necessário um estudo onde se possam avaliar agentes envolvidos na biossíntese e produção desses compostos em plantas *in vivo* assim como possíveis agentes envolvidos no cultivo *in vitro*, aliados ou não ao uso da transformação genética.

Sendo assim o presente estudo objetivou a quantificação de metabólitos secundários de interesse biotecnológico, dando ênfase na: (1) identificação e quantificação de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em espécies do gênero *Solanum*, (2) a avaliação da influência de reguladores de crescimento e fontes de carbono no cultivo *in vitro* e (3) a produção desses metabólitos e em raízes e plantas de *Solanum pseudocapsicum* transformadas via *Agrobacterium rhizogenes*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tamanha a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (Guerra & Nodari, 2001).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (Dias, 1996) de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Em vista dessa grande diversidade, são delimitadas áreas e subdivisões em biomas, conhecidos como: Amazônia, Caatinga, Campos do Sul, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Zona Costeira e de Transição.

A região sul do Brasil é coberta por parte da Mata Atlântica, a qual possui características próprias de clima tropical e temperado, sendo centro de origem de diversas plantas e animais.

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Wall & Wani, 1996).

A exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa através da extração direta nos ecossistemas tropicais (extrativismo) tem levado a reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, ou pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação dessas espécies (dos Reis & Marlot, 2001), colocando em risco de extinção inúmeras espécies nativas, ocasionando distúrbios ecológicos e o desaparecimento de germoplasmas valiosos, cujo potencial farmacológico e químico se quer foi estudado (França, 2001; Mulabagal & Tsay, 2004).

O estudo de plantas no Brasil tem se tornado relevante no que se refere ao descobrimento, monitoramento e classificação de inúmeras espécies em vista da sua conservação, potencial agroindustrial, ornamental e biotecnológico.

Dentre as inúmeras famílias de plantas de interesse presentes no Brasil e mais especificamente na região Sul está a Família Solanaceae, onde o gênero *Solanum*, é considerado de grande importância.

2.1. Aspectos Gerais da Família *Solanaceae* e Gênero *Solanum*

A família Solanaceae é considerada cosmopolita, sendo os centros de diversidade de suas espécies a América Central e América do Sul, assim como a Austrália e África e com menor frequência a Europa e Ásia. (Edmonds & Chweya, 1997) (Fig 1).

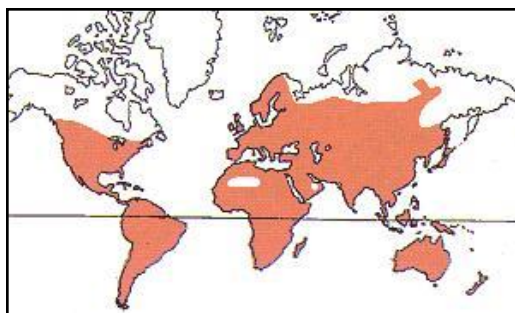


Figura 1. Mapa da distribuição mundial da família Solanaceae (Fonte: Site The Solanaceae Source – acesso em 10.03.09)

Estima-se que a família Solanaceae possua 96 gêneros e de 2000 a 3000 espécies com grande variedade no que diz respeito a sua morfologia e ecologia, sendo agrupadas em 6 subfamílias, Cestroidea, Juanulloideae, Solannoideae, Salpiglossoideae, Schizanthoideae e Anthorceridoideae (Hunziker, 2001).

Muitas solanáceas são endêmicas no Brasil e amplamente pesquisadas devido a sua importância econômica, tendo como principais representantes: a batata (*Solanum tuberosum*) (Kodamatani, *et al.*, 2005; Friedman, 2004); a berinjela (*S. melongena* L.) (Gonçalves *et al.*, 2006); o tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Friedman, 2004); joá-bravo (*S. aculeatissimum*); erva-moura (*S. americanum*); o tomatinho (*S. diflorum*); pimentas verdes e vermelhas (*Capsicum* spp.); inclusive plantas ornamentais como as petúnias (*Petunia* spp.) e os jasmims (*Solanum jasminoides*). O tabaco, também uma Solanaceae (*Nicotiana* spp.) - é uma das plantas mais nocivas, porém economicamente mais importantes do mundo - juntamente com muitas outras plantas de valor toxicológico e medicinal como a beladona (*Atropa belladonna* L.) (Edmonds & Chweya, 1997).

O gênero *Solanum* é considerado um dos maiores e mais complexos gêneros nas Angiospermas. Possui mais de 1500 espécies e cerca de 5000 epítetos descritos (Nee, 1999) com ampla distribuição por todo o mundo. Entre os gêneros mais próximos, estão o gênero *Cyphomandra* Sendtn., *Lycianthes* Dunal Hassler e *Lycopersicon* Mill (Mentz & Oliveira, 2004).

Sua distribuição mundial abrange espécies presentes em quase todos os continentes (Fig 2). Este gênero é bem representado no Brasil, sendo amplamente distribuído de Norte a Sul em regiões fitogeográficas diversas (Silva *et al.*, 2006)



Figura 2. Mapa da distribuição mundial do gênero *Solanum* (Fonte: Site The Solanaceae Source – acesso em 10.03.09)

No Sul do Brasil, o gênero *Solanum* possui em torno de 93 espécies nativas, distribuídas em três subgêneros de acordo com Nee (1999): *Bassovia* com 13 espécies, *Solanum* com 56 espécies e *Leptostemonum* com 31 espécies (comunicação pessoal, Mentz) (Miz *et al.*, 2008).

O nome do gênero *Solanum* deriva do latim *solari* - consolar ou aliviar – referente aos efeitos calmantes ou sedativos associados a muitas de suas espécies (Edmonds & Chweya, 1997), efeitos esses associados a ação dos metabólitos secundários, principalmente alcalóides.

***Solanum pseudocapsicum* L.**

O *Solanum pseudocapsicum* (Sinonímias: *Solanum diflorum* Vell.; *Solanum eremanthum* Dunal) é conhecido popularmente como laranjinha-do-mato, laranjinha (Pio Correa, 1926-1984), peloteira, tomatinho e “Jerusalem Cherry”.

As plantas de *S. pseudocapsicum* são subarbustos ou arbustos de 0,3-1m de altura, em regra com caule inferior definido, ramificado acima de 0,1-0,2m, com ramos apicais glabros ou cobertos de tricomas simples, bifurcados ou dendríticos, com pedicelo bem desenvolvido. As suas folhas são geminadas, raramente solitárias. Os

pecíolos apresentam de 0,3-0,8cm de comprimento, com tricomas iguais aos dos ramos. As lâminas das folhas maiores são elípticas a lanceoladas, com ápice agudo, base aguda e em regra assimétricas, margem inteira ou ondulada, membranosas, com 2,4-10cm de comprimento e 0,9-3,5cm de largura. As lâminas das folhas menores são ovaladas a suborbiculares. A face adaxial das folhas é glabra ou com tricomas simples, bifurcados ou dendríticos esparsos, em regra restritos às nervuras, às vezes densamente cobertas de tricomas dendríticos, misturados a simples ou bifurcados. Já a face abaxial é raramente glabra, em regra com tricomas iguais aos da face adaxial, às vezes densamente coberta de tricomas dendríticos. As inflorescências são cimosas, fasciculadas, opostas às folhas ou pouco extra-axilares, com 2-4 flores, apenas 1-2 férteis, subsésseis, e com pedicelos de até 0,6cm de comprimento. O cálice floral apresenta lacínias profundamente partidas, estreito-lanceoladas, de até 0,5 cm de comprimento, sendo glabro ou coberto na face adaxial e abaxial por tricomas simples ou dendríticos. A corola é branca ou levemente amarelada, com até 0,9 cm de diâmetro, com lacínias profundamente partidas, lanceoladas, reflexas na antese, cobertas abaxialmente por papilas ou tricomas simples ou bifurcados. As anteras são oblongas, amarelas e amarelo-alaranjadas, de 0,2-0,3 cm de comprimento. O ovário é globoso-ovóide, glabro, e o estilete mais longo do que os estames. O fruto é globoso, glabro, alaranjado, amarelo-avermelhado ou vermelho quando maduro, com 0,8-1,3 cm de diâmetro (Mentz & Oliveira, 2004).

Esta espécie é encontrada em todas as formações vegetais do sul do Brasil, em campos, bordas e clareiras de matas, no interior de matas nebulares, e como ruderal em pastos, capoeiras e beiras de estradas, em altitudes de até 1800 m, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; na Região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e São Paulo, além de ser mencionada para outros estados. Ocorre também no

Paraguai, Argentina, Uruguai e outros países da América do Sul, encontrando-se assilvestrada em outros continentes (Mentz & Oliveira, 2004).

S. pseudocapsicum tem despertado interesse mundial por apresentar atividade antitumoral, anti-viral (Thieme et al, 2007), hepatoprotetora, antimicrobiana, anti-hipertensiva, antiespasmódica, anticancerígena (Vijayan et al, 2002, 2003, 2004; Shrishailappa et al., 2003, Mitscher et al.,1976, Van Den Berghe et al.,1987) e antioxidante (Badami et al, 2005) associada a presença de alcalóides esteroidais.

Além de sua utilização como planta ornamental, tem sido relatado na medicina popular para o tratamento de dores abdominais agudas (Boericke, 1927), cura de furúnculos e como tônico masculino (Batten & Bokelmann, 1966), no entanto, estudos farmacológicos e toxicológicos tem associado alcalóides presentes em seus frutos a causa de enfermidades como a síndrome anti-colinérgica central (Ceha et al.,1997; Parisi & Farancia, 2000), sendo em alguns casos, considerados fatais para homens e animais (Friedman & McDonald, 1997; Parisi & Farancia, 2000; Watson et al., 2004).

Aliero et al (2005) avaliaram em frutos de *S. pseudocapsicum* uma predominância da presença de alcalóides, hidrocarbonetos, ácidos graxos, álcoois e derivados de ácidos carboxílicos assim como a presença de componentes como a dopamina e fluoxetina potentes psicoestimuladores em humanos.

2.2. Metabolismo Secundário

As plantas produzem uma ampla gama de compostos orgânicos conhecidos como metabólitos secundários. Essas substâncias não apresentam ação direta no crescimento, constituição e desenvolvimento quando comparadas as substâncias do

metabolismo primário, porém as mesmas são essenciais na garantia de sobrevivência e perpetuação das espécies, conferindo proteção contra herbívoros, patógenos e auxiliando na dispersão de pólen e sementes.

Presentes em concentrações bem inferiores aos metabólitos primários, os metabólitos secundários incluem uma série de compostos que podem ser classificados de acordo com suas similaridades estruturais, vias biossintéticas ou tipo de plantas onde estão presentes. Segundo Craik *et al.* (2002) podemos dividir os metabólitos secundários em três grandes classes, baseados no sistema de classificação da via biossintética: terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Tabela 1).

Tabela 1. Classes e exemplos de Metabólitos Secundários (Adaptado Craik *et al.*, 2002)

Classes/subclasses	Tipo de Composto	Exemplos
Terpenóides		
Monoterpenóides	Monoterpeno Lactonas	Nepetolactonas
Sesquiterpenóides	Sesquiterpeno lactonas	Artemisinas
Diterpenóides	Giberelinas	Ácido Giberélico
Triterpenóides	Saponinas	Diosgenina
	Esteróides	Sitosoterol
Tetraterpenóides	Carotenóides	Licopeno
Terpenóides Ésteres	Piretróides	Piretrina
Compostos Fenólicos		Hidroquinonas
Fenóis	Ácidos Hidroxicinâmicos	Ácido Cafêico
Fenilpropanóides	Hidroxicumarinas	Umbeliferona
	Fenilpropanóides	Eugenol
	Lignanos	Pinoresinol
Flavonóides	Antocianinas	Cianidina
	Flavonóides	Caenferol
	Flavonas	Luteolina

	Glicoflavonas	Orientina
Compostos Nitrogenados	Benzilisoquinolinas	Morfina
Alcalóides	Bisindole	Vincristina
	Diterpenóides	Aconitina
	Indóis	Serpentina
	Indolizidinas	Inosina
	Piridinas	Nicotina
	Pirrolizidinas	Senecionina
	Esteroidais	Solanina
	Tropanos	Atropina
	Quinolinas	Quinina
	Quinolizidinas	Anagirina
		Canavanina
Aminoácidos Tóxicos		Prumasin
Glicosídeos Cianogênicos		Glucocaparina
Glucosinolatos		Pipericida
Amidas		Mescalina
Amidas Aromáticas		

O balanço entre as atividades do metabolismo primário e secundário é considerado dinâmico, fato esse que pode ser analisado observando-se o próprio ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Figura 3) em que alterações no primário podem afetar profundamente o secundário e, embora o reverso não seja considerado totalmente verdadeiro, em alguns casos os metabólitos secundários são convertidos em primários. Além disso, muitos metabólitos secundários são formados por sequências de relações análogas àquelas do metabolismo primário, portanto a linha divisória entre metabolismo secundário e primário ainda não foi completamente compreendida.

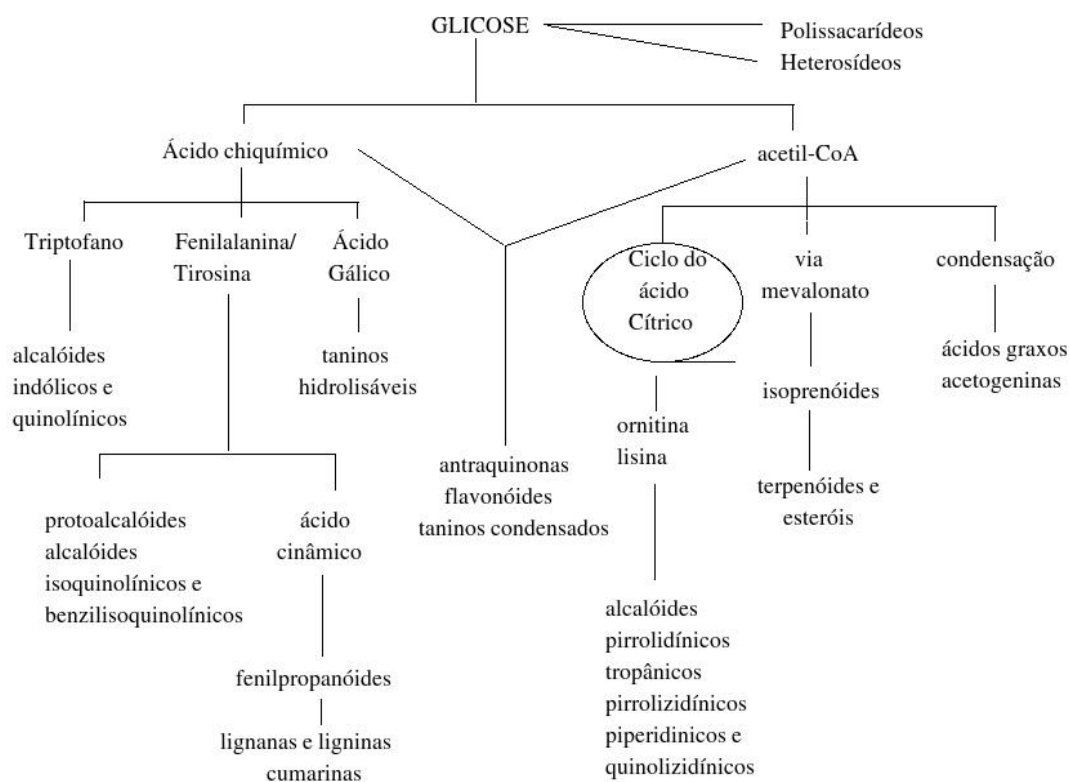


Figura 3: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Estudos relacionados a metabólitos secundários em plantas aumentaram significativamente nos últimos 50 anos. Moléculas oriundas do metabolismo secundário são conhecidas como sendo o maior modelo na adaptação de plantas para seu ambiente, mas também representam uma importante fonte farmacêutica (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002).

As plantas medicinais são, na sua maioria, fontes exclusivas de importantes compostos medicinais ou de valor industrial para grande parte da população mundial. Compostos bioativos atualmente extraídos de plantas são utilizados como aditivos de

comidas, pigmentos, corantes, inseticidas, cosméticos, perfumes e química fina (Balandrin & Klocke, 1988).

Levando em consideração a descoberta de diferentes compostos derivados de plantas, Verpoorte (1998), estimou a quantia de 100.000 compostos e em torno de 4000 novos compostos sendo descobertos a cada ano. Cerca de 40% ou mais dos medicamentos comumente utilizados nos países ocidentais são de derivados de plantas. O mercado de fitofármacos e fitoterápicos segundo Tyler (1994), é da ordem de US\$ 9 a 11 bilhões/ano, sendo que mais de 13.000 plantas são mundialmente usadas como fonte de fármacos.

2.3. Aspectos Gerais dos Alcalóides

Alcalóides (termo derivado da palavra árabe *al-quali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originada e obtida), são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos.

Os alcalóides contendo um átomo de nitrogênio básico em um anel heterocíclico são chamados de alcalóides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. As substâncias com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são denominados protoalcalóides. Compostos nitrogenados com ou sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcalóides (Henriques *et al.*, 2001).

Estes compostos constituem um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, comparável à dos terpenóides, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (Henriques *et al.*, 2001). Como substâncias naturais já

isoladas e de amplo conhecimento podemos citar a morfina, stricnina, escopolamina, cocaína, cafeína, nicotina, entre muitas outras.

Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá acúmulo preferencial dessas substâncias. Esse acúmulo ocorre principalmente em quatro tipos de tecidos ou células: (i) tecidos com crescimento ativo; (ii) células epidérmicas e hipodérmicas; (iii) bainhas vasculares e (iv) vasos lactíferos. Com relação à sua localização intracelular, os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, dessa maneira, não aparecem em células jovens antes de ocorrer à formação dessas estruturas (Henriques *et al.*, 2001).

O local de estoque dos alcalóides frequentemente é diferente daquele no qual são sintetizados, um exemplo disso é a nicotina, formada nas raízes das plantas de tabaco e translocada para as folhas nas quais é armazenada, já os alcalóides do tipo lupina são sintetizados nos ramos do vegetal e posteriormente transportados para as raízes (Henriques *et al.*, 2001).

Várias hipóteses tem sido levantadas na tentativa de explicar a produção de alcalóides em plantas. Uma primeira hipótese é a sua função na defesa contra ataques de animais e insetos, porém não se justifica apenas para essa função, pois estariam extintas as plantas que não as possuíssem. Uma segunda hipótese seria a de participarem de detoxificação de substâncias nocivas do metabolismo primário o que não é compatível com a complexidade metabólica das mesmas. E ainda, é sugerida sua função como reserva de nitrogênio, ou como reguladores de crescimento provavelmente inibindo a germinação ou protegendo contra a irradiação UV (Henriques *et al.*, 2001).

Alcalóides são encontrados em representantes de todos os grupos vegetais, apresentando distribuição restrita nas talófitas, pteridófitas e gimnospermas. Sua maior ocorrência é verificada nas angiospermas (Henriques, *et al.*, 2001). Dentre os grupos vegetais que destacam-se pela presença de alcalóides está a família Solanaceae.

As plantas da família Solanaceae são ricas fontes de metabólitos secundários bioativos, produzindo uma ampla variedade desses metabólitos tais como alcalóides do tipo tropano (Griffin, 2000) e piridínicos, vitanolidas (Dinan, *et al.*, 2001), ecdisteróides, sesquiterpenos, diterpenos, glicoalcalóides (Friedman, 2004), alcalóides esteroidais (Usubillaga *et al.*, 1997; Weissenberg, 2001; Ripperger, *et al.*, 1997), alcalóides do tipo pirrol (Sayed *et al.*, 1998), flavonóides (Esteves-Souza *et al.*, 2002; Cornelius, 2004), esteróides (Saez *et al.*, 1998), saponinas (Zhou *et al.*, 2006), sapogeninas esteroidais (Usubillaga *et al.*, 1987; Weissenberg, 2001), alcanidas (Silva *et al.*, 2002), glicosídeos esteroidais (Yoshimitsu *et al.*, 2003) e até mesmo antraquinonas encontradas em menor quantidade (Wink, 2003).

2.3.1. Alcalóides Esteroidais

Derivam biogeneticamente do acetato através da rota do isopentenilpirofosfato. São encontrados livres na natureza ou como glicosídeos, em cujo caso são denominados glicoalcalóides esteroidais (Chiesa & Moyna, 2001).

2.3.1.1. Ocorrência dos Alcalóides Esteroidais

Os alcalóides esteroidais compartilham, em geral, das propriedades de outros grupos de alcalóides, ou seja, são compostos naturais básicos, que na sua forma livre são solúveis em solventes orgânicos, no entanto, seus sais são solúveis em água (Chiesa & Moyna, 2001).

Costumam ser isolados tanto de vegetais como de animais, e em geral são compostos relativamente tóxicos ou muito tóxicos, talvez por fazerem parte de um rol de defesa dos organismos que os produzem (Kul'kova *et al.*, 1999).

Plantas das famílias Apocinaceae, Buxaceae, Liliaceae e Solanaceae tem sido supridoras tradicionais e naturais de alcalóides esteroidais (Atta-ur-Rahman & Muzaffar, 1988; Schakirov & Yunusov, 1990), compostos esses que tem provado seu papel como caracterizadores ou até definidores dessas famílias botânicas.

Nas plantas, aparecem como um grande grupo nos gêneros *Solanum* e *Veratrum*, apresentando diferentes graus de toxicidade.

De acordo com alguns estudos, a síntese de alcalóides vegetais está conectada com a atividade formadora de tecidos, ou seja, tecidos meristemáticos, os quais são particularmente ativos em plantas jovens (Novacki *et al.*, 1976; Ramaval *et al.*, 1988), sendo encontrados em diferentes órgãos variando conforme o composto e a espécie.

Na literatura não é encontrado nenhum dado conclusivo quanto ao local de biossíntese de alcalóides esteroidais, embora sapogeninas, inclusive a solasodina,

diosgenina, tomatidina, botogenina e tipogenina tenham sido identificadas nas raízes de algumas espécies do gênero *Solanum* (Ripperger, 1995).

2.3.1.2. Biossíntese dos Alcalóides Esteroidais

A biossíntese de alcalóides esteroidais ocorre através da incorporação dos átomos de nitrogênio em etapas avançadas através da rota do isopentenilpirofosfato. Por esta razão podem ser encontrados tanto alcalóides como derivados aminados de seus precursores esteroidais. Porém, as modificações sofridas são de importância crucial na determinação do destino e função destes compostos, por isso se consideram como um grupo independente (Chiesa & Moyna, 2001).

A incorporação do nitrogênio à molécula pode ocorrer na forma de três mecanismos diferentes: 1) um mecanismo de oxi-redução; 2) um mecanismo de substituição, ou 3) uma reação de adição de dupla ligação (Figura 4).

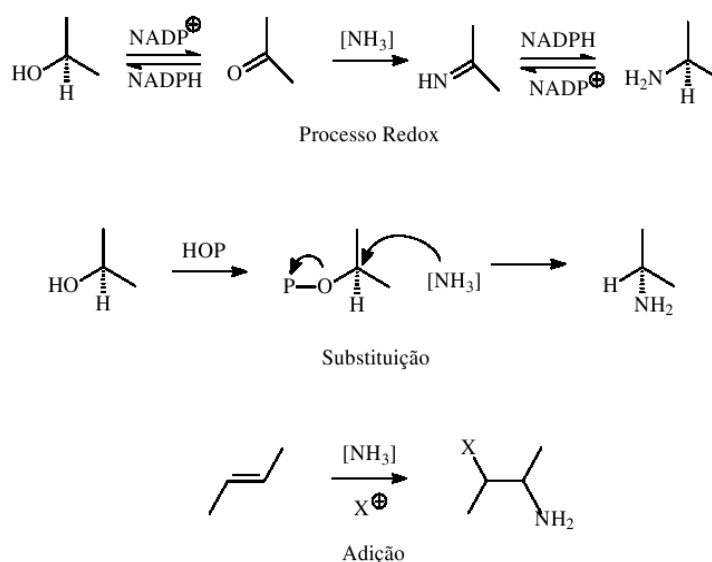


Figura 4. Mecanismo de incorporação do nitrogênio na biossíntese de alcalóides esteroidais. HOP: fosfato ou pirofosfato (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001)

Têm-se demonstrado através de estudos com incorporação de precursores marcados que os alcalóides esteroidais são biossintetizados a partir do colesterol, como exemplo disso temos a tomatidina da planta de tomate, *Lycopersicum esculentum* Mill.e a solanidina da planta de batata *Solanum tuberosum* L., que possuem um esqueleto esteroidal intacto (Figura 5).

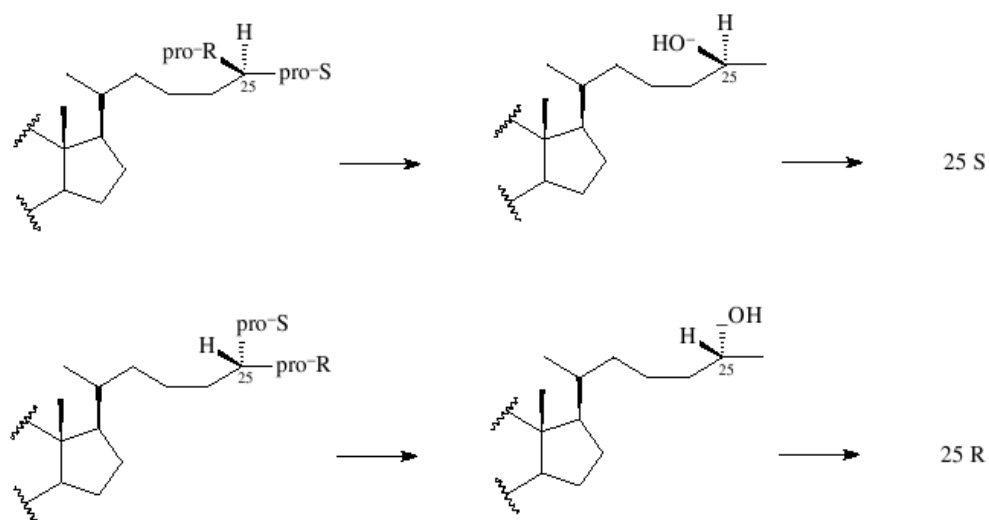


Figura 5. Exemplo de alcalóides esteroidais obtidos a partir do colesterol (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

A incorporação do nitrogênio é precedida pela hidroxilação da cadeia lateral. O colesterol é hidroxilado especificamente sobre o carbono 26 ou 27, o que determinará posteriormente a configuração definitiva do carbono 25 (Fig. 6).

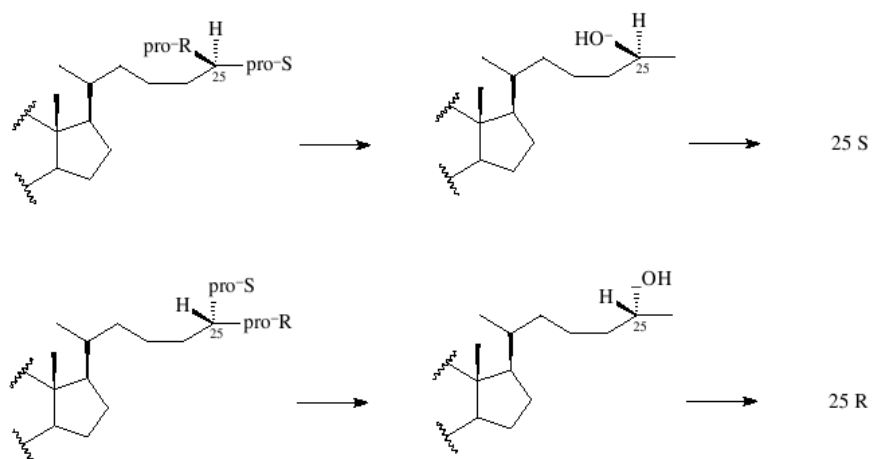


Figura 6. Hidroxilação primária do grupo metil 26 ou 27 determina a configuração final no carbono 25 (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

Em uma segunda etapa pode ocorrer à substituição do grupo hidroxila pelo grupo amino, ou a oxidação na posição C-22, logo após uma ciclização dando a formação do anel F e depois uma nova ciclização (Figura 7).

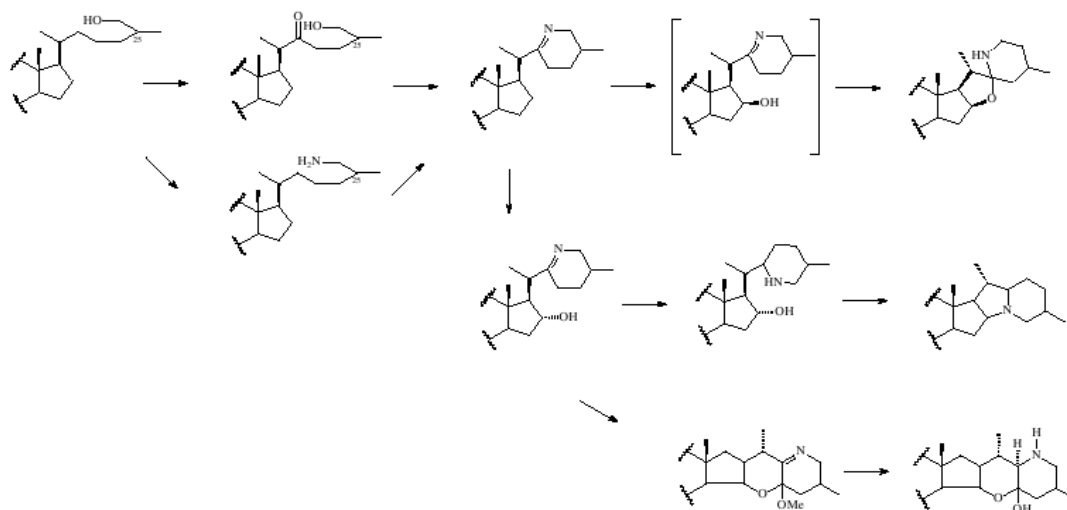


Figura 7. Rota para formação dos anéis E e F em alcalóides esteroidais (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

Os alcalóides esteroidais podem ser encontrados tanto livres como na forma de glicosídeos. Neste último caso a biossíntese não está totalmente definida, acreditando provavelmente se formarem pela união com açúcares ativados como UDP-glicosídeos (Friedman & McDonald, 1997).

Valkonen *et al.* (1996), afirmam que os alcalóides esteroidais produzidos durante a via geral de biossíntese de esteróides, começam do acetil-CoA e seguem pelos intermediários do ácido mevalônico, squaleno, cicloartenol e colesterol em alcalóides esteroidais em *S. tuberosum* L.

2.3.1.3. Classificação dos Alcalóides Esteroidais

Os alcalóides esteroidais são classificados com base em seus hidrocarbonetos esteroidais, o que melhor representa a estrutura geral do composto e sua configuração. Levando em conta esse critério, os alcalóides esteroidais podem ser divididos em três grupos principais segundo Marcano & Hasegawa, (1991):

1 - Aminopregnanos: compostos esteroidais de 21 átomos de carbonos produzidos pela degradação da cadeia lateral do colesterol, a qual contém o esqueleto pregnano.

2 – Piperidilpregnanos: compostos que além de conservar a estrutura de 27 átomos de carbono de colesterol, apresentam o átomo de nitrogênio formando parte de um ciclo de piperidina, são classificados por sua vez em 4 subgrupos:

2.1 – Espirosolanos: onde o anel de piperidina está unido por um

carbono espiroestânico a um anel de tetrahydrofurano formado pela ciclização da cadeia lateral.

2.2 – *Solanidanos*: a cadeia lateral sofre ciclização formando anéis fusionados, com um átomo de nitrogênio ponte.

2.3 – *Solanocapsinas*: derivadas do 22,26-epimino-hemiacetal, os quais possuem um anel pirânico e um anel de piperidina fusionados através de uma união hemiacetal.

2.4 – *Piperidinas simples*: derivadas do piperidil pregnano, na cadeia lateral do colesterol a qual dá origem a um único ciclo de piperidina.

3 – Alcalóides com esqueletos anormais: a estrutura do cicloperidrofenantreno tem sido modificada.

1. Aminopregnanos:

Esses alcalóides são produzidos principalmente por espécies da família Apocynaceae, e em menor quantidade, para as espécies da família Buxaceae e Solanaceae. O nitrogênio pode estar presente formando uma amina alifática, seja na posição C-3, ou mais frequente, na posição C-20. Eventualmente, ambas as posições podem estar aminadas, como na vaganina A, isolada de *Sarcococca vagans* Stapf. (Buxaceae) (Atta-ur-Rahman & Choudhary, 1997). O Nitrogênio pode formar parte de um heterociclo junto aos carbonos 20 e 21 da cadeia lateral e carbono 18. Os alcalóides dizem-se serem pertencentes à série da conanina e são típicos da família Apocynaceae (Goutarel, 1964). Alguns exemplos estruturais podem ser observados na Figura 8.

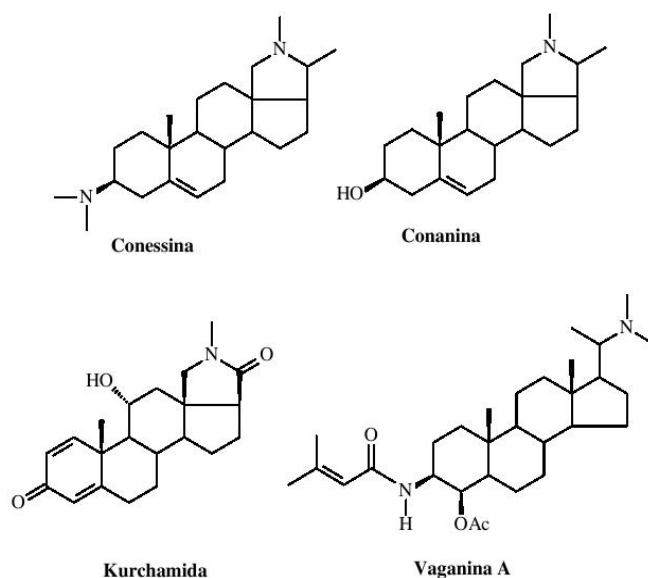


Figura 8. Alcalóides do tipo aminopregnano (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

2 . 20-Piperidilpregnanos:

Com frequência os alcalóides esteroidais C27 são análogos às sapogeninas oxigenadas encontradas na mesma planta, e assim como estas, podem ser encontrados como glicosídeos unidos a oligossacarídeos ou a outros glicosídeos produzidos pela planta.

Apesar de sua semelhança estrutural com as sapogeninas esteroidais, estes alcalóides possuem uma distribuição mais restrita entre os vegetais e são encontrados apenas nas famílias Solanaceae e Liliaceae. São particularmente abundantes nos gêneros *Fritillaria* e *Veratrum* (Liliaceae) e *Solanum*, *Lycopersicum* e *Cestrum* (Solanaceae).

Os alcalóides do tipo piperidilpregnano classificam-se por sua vez em quatro subgrupos:

2.1. *Espirosolanos*: Caracterizam-se pela presença de dois anéis

heterocíclicos unidos através de um carbono espiro (C-22), e muitos deles se encontram naturalmente como glicosídeos. O ciclo pentanoperhidrofenatreno apresenta a mesma estereoquímica que os hormônios naturais (*trans, trans, trans*) que se convertem em possíveis matérias primas para a semi-síntese dos hormônios esteroidais.

A tomatidina, o principal alcalóide do tomate (*L. esculentum* L.) é comum em outras espécies de tomates selvagens e em outros gêneros relacionados. Apresenta a estereoquímica 25S, 22βN. Também é comum o seu estereoisômero solasodina, com estereoquímica 25R, 22αN, a qual é amplamente empregada na síntese de hormônios esteroidais (Figura 9).

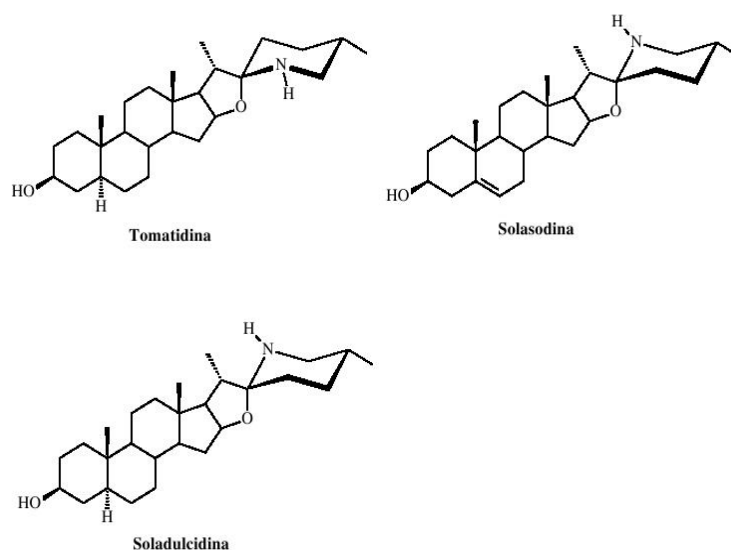


Figura 9. Alcalóides do tipo Espirosolanos (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

2.2 *Solanidanos*: Possuem uma estereoquímica 22αH, 25S são considerados os mais comuns e, dentro desse grupo estão incluídos a solanidina (22R), a demissidina (22R) e a leptinidina (22S), entre outros os quais, costumam ser encontrados na planta sob a forma de glicosídeos. A solanina e a chaconina, que são os

glicoalcalóides mais comuns da batata (*S. tuberosum* L.), são formados pelo alcalóide esteroidal solanidina unido a um trissacarídeo, a solatriose ou a chacotriose, respectivamente (Figura 10).

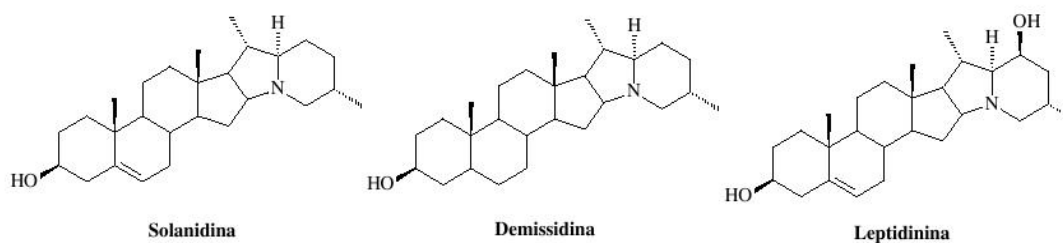


Figura 10. Alcalóides do tipo Solanidanos (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

2.3 *Solanocapsinas*: O primeiro alcalóide isolado foi na espécie *Solanum pseudocapsicum* L. Este grupo caracteriza-se por possuir um sistema de anéis heterocíclicos fusionados através de uma união hemiacetal. A estereoquímica da união desses dois anéis heterocíclicos pode ser *cis*, como no caso da pimpifolidina, ou *trans*, como na 22-isopimpifolidina, ambas isoladas de uma espécie de tomate selvagem, *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. (Ripperger & Porzel, 1994) (Figura 11).

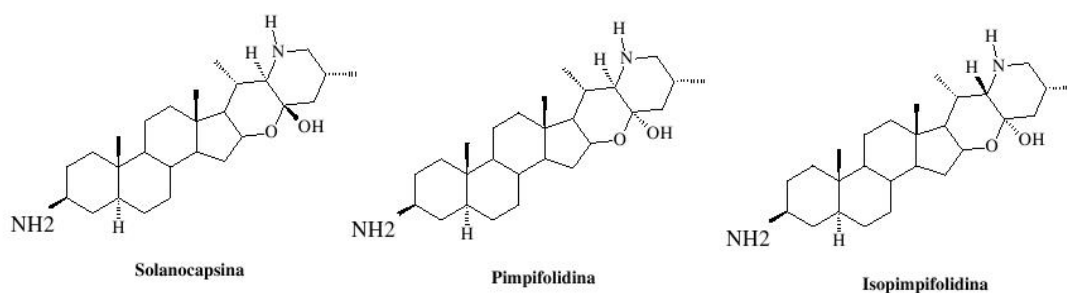


Figura 11. Alcalóides do tipo solanocapsinas (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

2.4. *20-Piperidilpregnanos simples*: Esta classe de alcalóides encontra-se principalmente nos gêneros *Solanum* e *Veratrum* e são caracterizados pela presença do anel E aberto. São menos freqüentes e podem, em alguns casos, representar precursores ou intermediários biossintéticos de outros compostos. Como exemplos desses alcalóides podemos citar a veralcamina isolada de *Veratrum album* L. (Tomoko *et al.*, 1968) e a oblinginina isolada de *Veratrum oblongum* O. Loes. (Kadota *et al.*, 1995) (Figura 12).

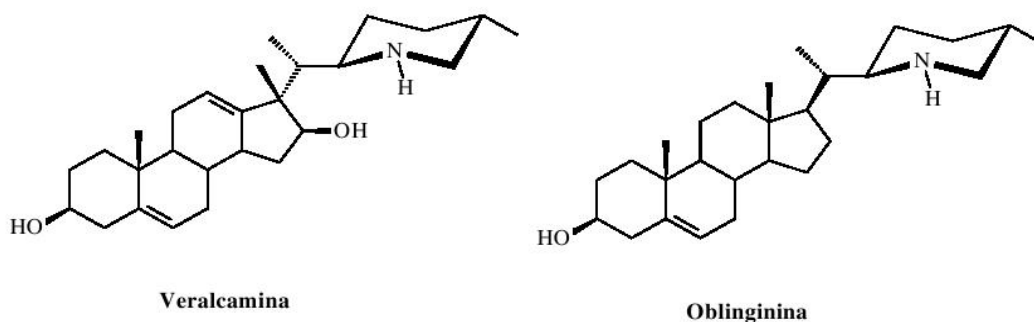


Figura 12. Alcalóides do tipo piperidilpregnanos simples (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

3. Alcalóides com esqueletos anômalos: São aqueles cuja estrutura do cicloperidrofenantreno sofreu modificações, diferença observada quando comparado aos grupos anteriores, os quais apresentavam esqueletos esteroidais inalterados. Dentro deste grupo se distinguem duas classes: 1) alcalóides de *Veratrum* (Figura 13), que apresentam um esqueleto 12-nor-D-homo e, 2) alcalóides de *Buxus* (Figura 14), que estão estruturalmente relacionados com o cicloartenol.

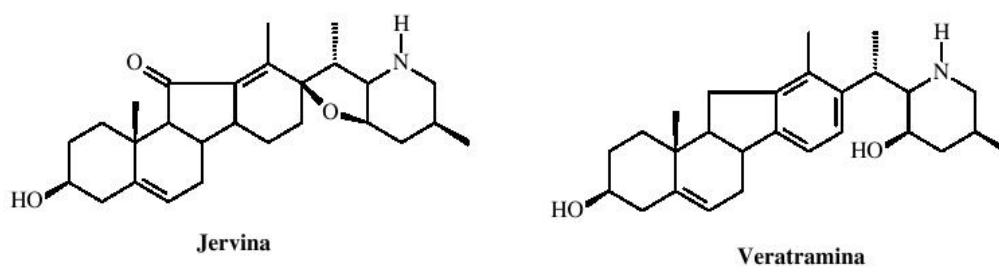


Figura 13. Alcalóides de *Veratrum* (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

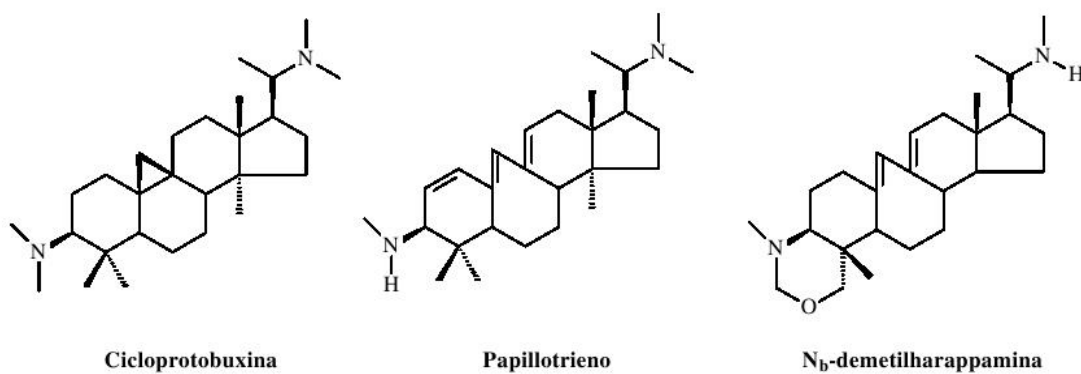


Figura 14. Alcalóides de *Buxus* (Adaptada de Chiesa & Moyna, 2001).

2.3.1.4. Propriedades Biológicas dos Alcalóides Esteroidais em plantas

A toxicidade dos alcalóides esteroidais nos vegetais sugerem que os mesmos cumprem um papel de defesa, por possuírem atividade antibacteriana leve e antifúngica mais pronunciada. Essa ação está correlacionada à capacidade dos glicoalcalóides de desestabilizarem membranas biológicas.

A tomatidina, alcalóide esteroidal comum em tomate (*L. esculentum*) possui um amplo espectro antifúngico e antimicrobiano, já os glicoalcalóides encontrados na batata tem sido relatados com atividade antifúngica. A mistura de alcalóides também foi avaliada por verificar-se um efeito sinérgico desses alcalóides aumentando seu poder desestabilizador de membranas assim como sua atividade antifúngica (Roddick, 1988; Fewell & Roddick, 1993). Também se tem observado ação antialimentaria, inibidora e tóxica em muitos insetos, tendo como exemplo o uso de extratos das plantas de *Veratrum album* L. e *Veratrum viride* Aiton., utilizados como inseticidas (Chiesa & Moyna, 2001).

Baker *et al.* (2002) avaliaram em seus resultados uma primeira indicação de que o sequestro de alcalóides esteroidais tem um efeito fagoestimulatório em herbívoros.

A diminuição da ação de nematóides foi comprovada e associada à presença de glicoalcalóides na cultivar Elles de *Solanum tuberosum* L, (Gerstner *et al.*, 1999).

Yencho *et al.* (1998) identificaram através de QTLs relacionados com a produção das agliconas solanidina e solasodina em progênies de *Solanum tuberosum* x *S. berthaultii*. Esses glicoalcalóides são de interesse, principalmente no que se refere à resistência a doenças avaliadas em pool gênico de batatas, além de contribuírem para o

entendimento da localização e organização dos genes para a biossíntese de glicoalcalóides.

2.3.1.5. Farmacologia dos Alcalóides Esteroidais

Os alcalóides esteroidais são empregados na indústria farmacêutica, principalmente como fonte de matéria prima na síntese de compostos derivados de esqueletos esteroidais. A solasodina, por possuir um esqueleto esteroidal intacto e com a mesma estereoquímica que os hormônios naturais é considerado o principal composto deste grupo sendo empregado na produção de hormônios esteroidais (Chiesa & Moyna, 2001). Por esse motivo tem sido considerado como potencial alternativa para a diosgenina (Galanes *et al.* 1984). Esses dois compostos são similares, compartilham a mesma característica de poderem ser rapidamente convertidos para 16-dehidropregmolona acetato, considerados a chave intermediária na síntese de medicamentos esteroidais, erg., progesterona, cortisona (Sree *et al.*, 1998).

A produção limitada de diosgenina traz como consequência um problema de custos. A obtenção de um método para aumentar a produção de solasodina pode ser uma das soluções desse problema no futuro (Kittipongpatana *et al.*, 1998)

A solasodina é amplamente encontrada em plantas do gênero *Solanum*, possui várias atividades biológicas descritas. Esteves-Souza *et al.* (2002), concluíram que o gênero de muitas plantas nativas brasileiras como *Solanum crinitum* L. e *S. iabrense* que contém flavonóides e glicoalcalóides conferem potenciais vantagens como novos agentes quimioterápicos.

Compostos com propriedade antifúngica como as saponinas esteroidais de espécies como *Solanum chrysotrichum* Schldl. tem sido utilizados como extratos

triturados de plantas para o tratamento de micoses (Villarreal, *et al.*, 1997). A maioria dos alcalóides esteroidais apresentam diversos graus de toxicidade em mamíferos. Por exemplo, os glicoalcalóides de *Solanum*, que estão presentes em pequenas quantidades na dieta humana normal, podem, em concentrações maiores, ocasionar uma intoxicação alimentar. Os sintomas incluem desordens gastrointestinais e neurológicas. Em casos extremos podem causar além desses distúrbios, a inibição da atividade da enzima colinesterase, enxaquecas, elevação da pressão arterial, febre, taquicardias, alucinações, delírios, coma e também a morte (Groen, 1993; Friedman & McDonald, 1997). Por isso, dependendo da legislação em cada país o limite máximo destes alcalóides admitidos em alimentos está na faixa de 100 e 200mg/kg (Maga, 1994)

Diversos são os mecanismos de toxicidade dos glicoalcalóides. Dentre eles pode ocorrer o bloqueio dos canais de sódio, como no caso das batracotoxinas, e despolarização das membranas, dos neurônios e células musculares, como no caso da veratridina.

Muitos destes compostos são teratogênicos, como no caso de *Veratrum californicum* Durand chegando a causar malformações como a ciclopia em terneiros e cordeiros que tenham ingerido acidentalmente esses compostos durante a gestação. Têm-se demonstrado que os alcalóides desta planta interferem com o colesterol em seu rol de mensageiro químico durante o desenvolvimento embrionário (Cooper *et al.*, 1998).

Em *Solanum lycocarpum* St.Hill foram encontrados alcalóides esteroidais e o glicoalcalóide solasodina, com ação tóxica (Baker *et al.*,1989). Alcalóides esteroidais foram também associados a lesões de mucosa intestinal e alterações de peso por

Friedman *et al.* (1996), arritmia cardíaca em células neonatais (Bergers & Alink, 1980) e defeitos em tubo neural (Renwick, *et al.*, 1984).

2.3.2. Métodos de Detecção e Obtenção de Alcalóides Esteroidais

Os alcalóides esteroidais possuem as características químicas de outros alcalóides e por isso podem empregar-se para seu estudo os métodos gerais de isolamento e análise destes compostos. Muitos podem ser encontrados como glicosídeos, e para sua detecção podem empregar-se a formação de espuma e a medida da atividade hemolítica.

Devido a sua importância na agricultura e alimentação, a análise dos alcalóides esteroidais de *Solanum* tem recebido grande atenção (Lachman *et al.*, 2001). Tem sido relatado o uso de métodos gravimétricos, valorizações ácido-base, ensaios enzimáticos e imunoenaios (Maga, 1994). Também se tem relatado o uso de métodos cromatográficos de análise, identificação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) e por Cromatografia de Camada Delgada (TLC) e também por Cromatografia Gás-líquido (GLC), (Chiesa & Moyna, 2001) além do uso de Espectro FAB-MS, a espectroscopia NMR, análise de açúcares, metilação, agliconas, todas essas relacionadas com os alcalóides esteroidais.

O estudo de alcalóides esteroidais tem sido intenso nos últimos anos em inúmeras espécies e também no gênero *Solanum*. Como opções para a produção desses compostos estão as culturas de células vegetais em suspensão, a adição de elicitores bióticos ou abióticos e as técnicas de transformação genética via *Agrobacterium*

tumefaciens e *Agrobacterium rhizogenes* além do uso de microrganismos (Croteau *et al.*, 2000).

2.4. Compostos Fenólicos em plantas

Os fenóis fazem parte de um grupo heterogêneo com cerca de 10.000 compostos individuais. Um dos aspectos que os caracteriza é a estrutura em comum de um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila (Craik *et al.*, 2002)

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários derivados de pentoses fosfato, chiquimato e vias de fenilpropanóides (Randhir & Shetty, 2004), podendo ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal ou ocorrência no reino vegetal, sendo divididos em compostos fenólicos amplamente distribuídos e de distribuição restrita (Carvalho *et al.*, 2001). É importante ressaltar que uma característica da biogênese de derivados fenólicos é a capacidade que os vegetais têm de produzir um mesmo composto (como o ácido lorigênico) a partir de diferentes intermediários, isto é, os vegetais apresentam rotas biogênicas alternativas.

Os animais, a princípio, são incapazes de sintetizar o anel aromático, e os compostos fenólicos produzidos em pequena quantidade, utilizam o anel benzênico de substâncias providas da dieta alimentar. Entretanto, os vegetais e a maioria de microrganismos têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico.

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, e sim sob a forma de ésteres ou de hesterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e solventes orgânicos polares. Assim possuem características ácidas e propriedade

de complexação com metais, sendo que muitos desses quelatos metálicos são importantes em diversos sistemas biológicos.

Neste grupo estão incluídas as ligninas, taninos, furanocumarinas e ácido salicílico. Algumas funções atribuídas a eles são respectivamente: suporte mecânico (lignina), ação na atração de polinizadores, dispersadores de frutas (flavonóides), como captadores de radiação ultra violeta (flavonóides), na redução do crescimento de plantas vizinhas (fenilpropanóides e derivados de ácido benzóico) (Taiz, 2002). Alguns fenilpropanóides tem sido relatados como marcantes supressores de apetite de insetos (Harbone, 1985, 1997; Leitão *et al.*, 1997) ou também são encontrados fazendo parte de proteínas, alcalóides e terpenóides (Carvalho, *et al.*, 2001).

Muitos dos compostos fenólicos são constituintes de óleos voláteis e alguns são aromatizantes tradicionais como o aldeído cinâmico (na canela, *Cinamomum zeyllanicum* Nees) e a vanilina (em *Vanilla planifolia* Andrews), de amplo emprego na indústria de alimentos (Harbone, 1985, 1997; Leitão *et al.*, 1997). Exibem uma ampla gama de propriedades fisiológicas como antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, antitubercóticos, cardioprotetores, com efeito vasodilatador (Benavente-Garcia, 1997; Manach & Manzur, 2005; Middleton, 2000; Puupponen-Pimia, 2001; Samman, 1998). Os compostos fenólicos influem diretamente no sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas.

Inúmeros trabalhos estão sendo realizados em busca do potencial antioxidante em frutas e vegetais (Hertog & Fesknes, 1993), entretanto surgem cada vez mais pesquisas e levantamentos comprovando a presença de compostos fenólicos em plantas não comestíveis sendo avaliada a sua bioatividade e uma futura exploração desses

compostos como suprimentos de antioxidantes (Aberoumand, 2008). Nesse sentido, há relatos de efeito antioxidante do extrato de *Ilex paraguariensis* St.- Hill. (erva-mate) sobre a oxidação de LDL (lipoproteínas de baixa densidade) *in vitro* e *in vivo*, assim como da ação antioxidante e pró-oxidante de *Camellia sinensis* L.

As solanáceas são plantas que tem despertado interesse pela presença de compostos fenólicos de interesse farmacêutico como é o caso da capsaicina obtida de sementes de algumas espécies de *Capsicum*, utilizada como analgésico tópico (Fusco & Giacobazo, 1997).

O gênero *Solanum*, tem sido alvo de estudos de identificação e quantificação quanto a seus compostos fenólicos, como podemos citar em *Solanum tuberosum* (Kähkönen *et al.*, 1999), *Solanum indicum* (Aberoumand, 2008), *Solanum lycocarpum* (Roesler *et al.*, 2007) *Solanum laciniatum* (Chandler & Doods, 1983).

Os avanços na biotecnologia, particularmente, nos métodos de cultura de células vegetais têm provido novos recursos para o processo comercial de plantas raras e compostos químicos providos delas. Essas tecnologias vão melhorar a utilidade das plantas como recursos renováveis de compostos químicos valiosos. A cultura de células vegetais é tida como potencial alternativo para a agricultura tradicional e para produção industrial de metabólitos secundários (Dicosmo & Misawa, 1995).

Como vantagens no estudo e produção de metabólitos secundários através da cultura de células *in vitro*, em relação à planta *in vivo* podemos citar: (a) a produção pode ser mais rentável, simples e mais previsível; isolamento de fitoquímicos podem ser rápidos e eficientes, comparados a extração de complexos derivados de plantas intactas; (b) os compostos produzidos *in vitro* podem traçar um paralelo direto com plantas intactas; (c) os compostos que possam interferir na produção dos metabólitos na planta

a campo podem ser evitados em culturas de células; (d) as culturas celulares podem ser fontes rentáveis de definição de padrões fitoquímicos em larga escala; (e) as culturas celulares são um belo modelo para testes de elicitores; (f) as culturas de células podem ser selecionadas (Lila, 2005).

2.5. Cultura de tecidos vegetais aplicada à produção de metabólitos secundários

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (Wink, 1990). Cada um desses processos por sua vez, é governado por genes e portanto, influenciado por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia (estágio do desenvolvimento) e ambiente (Robbers *et al.*, 1996). A maioria dos mecanismos que regulam tanto a biossíntese quanto a estocagem e a degradação, entretanto, permanecem ainda desconhecidos.

Embora qualquer tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, parece que isso ocorre somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, em função do grau de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos. Em alguns casos, a produção pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ecológicas ou ambientais (Mann, 1978), podendo apresentar variedades nas suas concentrações, e até dentro de um período curto como o de 24 horas por exemplo (Raver *et al.*, 1999).

Em várias espécies, o local da biossíntese está restrito a um órgão, enquanto que os produtos são acumulados em toda planta ou em órgãos diferentes, devido a um sistema de transporte intercelular. Nas células, certos mecanismos bioquímicos

garantem a condução de compostos aos compartimentos de estocagem apropriados. Os metabólitos secundários hidrofílicos tendem a ser armazenados nos vacúolos, enquanto que os lipofílicos se acumulam em ductos de células mortas ou ligam-se aos componentes celulares lipofílicos, como membranas, ceras cuticulares e lignina (Wink, 1990).

A cultura de tecidos tem como definição básica o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta constituída por frações de tecidos, órgãos ou mesmo células em meio de cultura, sob condições controladas de umidade, temperatura e luminosidade, pré-requisitos básicos para gerar uma nova planta. Essa técnica baseia-se principalmente, na capacidade de células vegetais originarem novas células e se diferenciarem em tecidos e órgãos originando uma nova planta inteira, tal propriedade é dita totipotencialidade.

As técnicas de micropropagação e cultura de tecidos são formas de propagação e manutenção do material vegetal utilizados para espécies que normalmente se reproduzem vegetativamente, assim como para outras espécies onde esse tipo de reprodução é difícil.

Uma das aplicações da cultura de tecidos se dá em plantas com interesse biotecnológico como é o caso das plantas produtoras dos mais diversos compostos de interesse para a agroindústria e indústria farmacêutica.

A técnica de micropropagação e cultura de tecidos vegetais tem contribuído efetivamente nos últimos 40 anos na elucidação de mecanismos bioquímicos e biológicos, assim como na biossíntese de compostos secundários.

A seleção de linhagens, variedades ou quimiotipos altamente produtores, tem sido o método geralmente utilizado para a obtenção de plantas com elevado teor de

substâncias ativas. Essa estratégia tem sido bem sucedida devido à biodiversidade de espécies selvagens, assim como a grande variedade a nível de metabólitos secundários dentro de uma mesma espécie.

Em muitos casos a única fonte de matéria-prima para fitoterápico é a planta selvagem (França, 2001) o que justificaria a utilização dessas técnicas disponíveis.

Algumas vantagens da cultura de células incluem: (i) síntese de metabólitos secundários bioativos que são controlados pelo ambiente, independentemente das condições climáticas ou do solo; (ii) controle de fatores biológicos negativos que afetam a produção de metabólitos secundários na natureza (microrganismos e insetos); (iii) seleção de cultivares com alta produção de metabólitos secundários; (iv) automatização de controle de crescimento celular e regulação dos processos metabólicos. Todos estes fatores contribuem para a diminuição do preço de custo e o aumento da produção. Desde 1972, importantes fármacos vegetais tem sido produzidos por cultivo de células vegetais (Mulabagal & Tsay, 2004).

Até o momento, várias estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar a produção de metabólitos secundários usados em cultura de células vegetais. Na cultura de tecidos vegetais, as células acumulam quantidades consideráveis de compostos secundários dentro de condições específicas. A maximização da produção e acúmulo de metabólitos secundários por cultura de tecidos vegetais requer: (i) manipulação de parâmetros de ambiente e meio; (ii) seleção de clones celulares de alta produção (iii) uso de precursores, e (iv) elicitação (Mulabagal & Tsay, 2004 ; França, 2001).

A produtividade da cultura é um fator crítico para a determinação da aplicação prática da cultura de células vegetais na produção de metabólitos secundários. A total síntese da maioria dos produtos secundários não é possível por causa da dificuldade do

processo, sendo muitas vezes economicamente inviável. Uma alternativa é a combinação do estudo químico e biológico e o uso de cultura de células para completar os difíceis estágios da síntese (Collin, 2001).

Quando alguma diferenciação morfológica é induzida nas culturas ocorre à formação de embriões, brotações ou raízes e o teor de metabólitos secundários de interesse pode aumentar significativamente. Isso tem sido detectado para a produção de alcalóides (Yoshikawa & Furuya, 1985), saponinas (Furuya *et al.*, 1986) e terpenos (Charlwood & Moustou, 1988). Ao estudar o efeito da diferenciação de culturas de *Panax ginseng* C.A. Meyer, sobre a produção de saponinas, Furuya *et al.*, (1986) demonstraram que culturas de brotações e de raízes produziam respectivamente 3,5 e 4,9 vezes mais saponinas do que as culturas de calos.

Calos ou células em suspensão, resultantes da dediferenciação *in vitro* de tecidos de plantas, usualmente sofrem uma aparente perda de habilidade em acumular metabólitos secundários. Fatores distintos, tais como, falha na expressão de genes específicos que controlam enzimas-chave de vias biossintéticas ou mesmo a não-disponibilidade de compartimentos de armazenagem de produtos já foram apontados como responsáveis pelo acúmulo de cada metabólito ou série de metabólitos nas culturas de tecidos de plantas (Charlwood *et al.*, 1990).

Considerando que cada célula contém a informação genética para todas as funções, incluindo a biossíntese de metabólitos secundários, a partir do momento em que partes da planta (explantes) são fragmentadas, para que o seu desenvolvimento possa ser estudado isoladamente, (fluxo de reguladores, nutrientes orgânicos e inorgânicos, água, tecido ou célula) torna-se necessário proporcionar todos os nutrientes

essenciais, fonte de carbono, nitrogênio e inclusive reguladores de crescimento (França, 2001).

A manipulação de aspectos físicos, elementos nutricionais, hormônios vegetais, fontes de carbono, entre outros parâmetros tem sido a estratégia mundial para a propagação de plantas com interesse em seus compostos bioativos (Rout *et al.*, 2000) além do estudo de rotas metabólicas e ação de agentes bióticos na resposta *in vitro* desses metabólitos.

A concentração de metabólitos secundários *in vitro* pode ser altamente influenciada por modificações físicas e químicas do meio de cultivo.

Existem mais de 50 formulações de meio de cultivo utilizados nas mais diferentes espécies para a cultura de tecidos vegetais (Rout *et al.*, 2000), no entanto o meio de cultivo mais utilizado em todo o mundo é o meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962).

Basicamente, um meio de cultivo para plantas tem como requerimentos fundamentais fonte de macronutrientes, entre eles N, P, K, Ca, Mg e S, micronutrientes incluindo Fe, Mn, Zn, B, Cu, Cl, Mo e Ni além de vitaminas como a Tiamina (B1), Ácido Nicotínico (B3), Piridoxina (B6), mio-inositol e fontes de carbono como a sacarose normalmente presente na concentração de 2 a 3% sendo a mais utilizada.

A glicose, assim como outras fontes de carbono como frutose, galactose, ribose, sorbitol, manitol entre outros, são também utilizadas porém em menor escala. Agentes geleificadores, também são requeridos na maioria dos cultivos *in vitro*, sendo o ágar o mais utilizado.

Alterações na fonte de nitrogênio e fosfato, suprimento de fonte de carbono,

reguladores de crescimento e estágio de crescimento tem demonstrado serem fatores importantes no estudo de rotas biossintéticas e avaliações desses compostos *in vitro* (Collin, 2001)

Collin *et al.* (2001) relatam a produção de antocianinas em cultura de calos de *Oxalis linearis* e acúmulo desses compostos sendo testados a mudanças na concentração de reguladores de crescimento como a benziladenina (BA), zeatina (Zea), ácido naftalenoacético (NAA) e ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Como resultados obtidos foi averiguado que a ausência de reguladores de crescimento acumulou antocianinas para essa espécie, porém um incremento foi obtido com a inclusão de BA e zeatina e altas concentrações de sacarose no meio de cultivo. Esse processo foi reprimido por inclusão de auxinas em baixas concentrações, e foi inversamente relacionado com o crescimento (Collin, 2001).

A produção de espirostanol (saponina) tem sido relatada como não estando diretamente relacionada com o crescimento vegetal, mostrando seu máximo acúmulo em concentrações de 3,0- 4,5% de sacarose no meio de cultivo.

Para a produção de antraquinona em células em suspensão em *M. elliptica* a concentração ótima para sua produção *in vitro* pôde ser encontrada na concentração de 0,5 mg/L NAA e 0,5mg/L de cinetina (Kin). O máximo de crescimento foi obtido com 5 a 6% de sacarose, entretanto sua produção foi incrementada em culturas em 8% de sacarose (Abdullah *et al.*, 1998).

Furmanowa *et al.* (1997) averiguaram que em calos de *Taxus x media* var *Hatfieldii* a inclusão da auxina picloram estimulou o crescimento, porém não alterou a produção de paclitaxel. Em células em suspensão de *T. baccata*, Hirasuna *et al.* (1996)

obtiveram incremento na produção de paclitaxel com o uso de frutose e quando adicionada glicose ao meio de cultivo a concentração desse composto diminuiu.

A adição de zeatina e concentração salina de 32mmol/L NaCl aumentou a produção de alcalóides e peptídeos em *C. roseus* (Carpin *et al.*, 1997).

Como exemplos de alta produtividade de metabólitos secundários podemos citar: ginsenosídeos de *Panax ginseng* (Choi *et al.*, 1994; Furuya *et al.*, 1984; Franklin & Dixon, 1994; Furuya, 1988), ácido rosmarínico de *Coleus blumei* (Ulbrich *et al.*, 1985), shikonina de *Lithorpermum erythrorhizon* (Takahashi & Fujita, 1991), ubiquinona-10 de *Nicotiana tabacum* (Fontanel & Tabata, 1987), berberina de *Coptis japonica* (Matsubara *et al.*, 1989).

Em relação à produção de metabólitos secundários e cultivo *in vitro* existe um constante interesse em avaliar em que tipo específico de tecido, diferenciado ou não ou órgão pode-se obter a real expressão do metabólito de interesse. Como exemplos clássicos de expressões diferenciadas comprovadas podemos citar o Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer), por exemplo, onde Saponinas encontradas nessa espécie são encontrados nas raízes e o qual é confirmado em culturas de raízes *in vitro*, já em plantas herbáceas como o *Hypericum perforatum* (St. John's wort), acumularam-se hipericinas e hipeforinas, que são substâncias com potencial antidepressivo em glândulas foliares não sendo verificado o seu acúmulo em células indiferenciadas (*in vitro*) (Smith *et al.*, 2002).

A maioria das aplicações de cultura de células em biotecnologia apontam para a produção de taxol, morfina e dodeína, ginsenosídeos, L-DOPA, berberina, diosgenina, capsacina, podofilotoxina, derivados de chiconina, ajmalicina, vincristina e vinblastina (Dicosmo & Misawa, 1995), ou seja, produtos que envolvam altos valores agregados.

A família Solanaceae, tem sido objeto de estudos nos últimos anos em inúmeros dos seus gêneros e entre eles o gênero *Solanum*, onde podemos citar as espécies *Solanum dulcamara* com estudo em cultivo de calos, regeneração direta, protoplastos e gemas, *Solanum elaeagnifolium* em hipocótilos e *Solanum khasianum* com estudos em calos e organogênese direta (George, 1996).

Inúmeros estudos e revisões tem sido descritas na tentativa de otimizar um sistema eficiente de produção em larga escala específico para metabólitos de plantas assim como estudos aprofundados sobre a biossíntese desses metabólitos (Verpoorte *et al.*, 2002).

O acúmulo de alcalóides em calos e raízes transformadas de plantas do gênero *Solanum* também tem sido estudados visando esclarecimentos quanto à sua biossíntese em busca da otimização para a produção dos mesmos *in vitro*.

2.6. Transformação genética via *Agrobacterium*

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas, sendo essas agrupadas em duas categorias: transferência indireta e direta de genes. A transferência indireta é aquela na qual para intermediar a transformação, utiliza-se um microrganismo, como *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton *et al.*,1977) e *Agrobacterium rhizogenes* (Chilton *et al.*,1982). Na transferência direta de DNA se destacam os métodos de transformação com polietilenoglicol (PEG), eletroporação, microinjeção e aceleração de partículas.

Agrobacterium tumefaciens e *A. rhizogenes* são bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, família Rhizobiaceae. Fitopatógenos do solo, causam doenças neoplásicas em dicotiledôneas conhecidas como galha da corôa e raiz em cabeleira, respectivamente (Quecini & Vieira, 2001). A interação *Agrobacterium*-célula vegetal é o único caso de transferência de genes entre reinos diferentes, e tendo sido descrita como um exemplo de engenharia genética da natureza (Tempé & Schell, 1977). O estudo da doença como galha da corôa abriu novas perspectivas para as pesquisas sobre transferências de genes (Brasileiro & Dusi, 1999).

Os tecidos da galha da corôa, ao contrário as células saudias, quando retirados da planta e cultivados *in vitro*, apresentam a capacidade de se proliferar indefinidamente em meio de cultura, sem o acréscimo de reguladores de crescimento (Brasileiro & Dusi, 1999). A aparição da galha é, na realidade, o resultado de um processo natural de transferência de genes entre a agrobactéria e a célula vegetal: um fragmento do DNA bacteriano, chamado T-DNA (do inglês “Tranferred DNA”), o qual é transferido para dentro da célula vegetal, integrado ao genoma nuclear e então expresso de maneira estável. Esta expressão ocorre somente porque todos os genes presentes no T-DNA, apesar de sua origem procariota, possuem sinais de regulação que podem ser reconhecidos pelo sistema de transcrição eucarioto do vegetal (van Sluys *et al.*, 1992; Brasileiro, 1993; Zupan & Zambryski, 1995; Ream & Gelvin, 1996).

O T-DNA presente em plasmídios Ti (tumor inducing) da *Agrobacterium tumefaciens* e Ri (root inducing) de *Agrobacterium rhizogenes*, é delimitado por seqüências diretamente repetidas de 25pb, conhecidas como borda direita e borda esquerda que carregam genes que codificam precursores de hormônios vegetais, chamados oncogenes e de enzimas responsáveis pela condensação de aminoácidos e

cetoácidos ou açúcares em opinas (Fig. 15). Os precursores de fitohormônios produzidos pelas células transformadas levam a um desbalanço hormonal na planta, promovendo a multiplicação desordenada que origina o tumor ou as raízes em cabeleira (Quecini & Vieira, 2001).

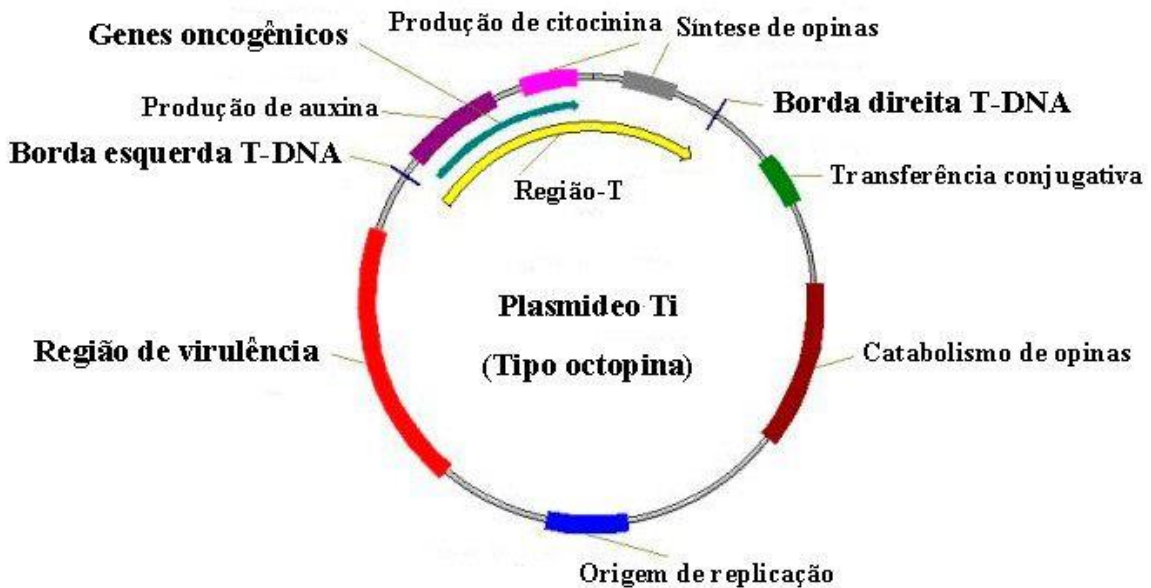


Figura 15. Representação esquemática de um plasmídeo Ti típico do tipo octopina com a respectiva região-T, com zona de produção de auxinas, citocininas e síntese de opinas DNA, bordas esquerda e direita, origem de replicação, região de virulência, região de transferência conjugativa, catabolismo de opinas, e origem de replicação.

A *Agrobacterium* além de ter o T-DNA que é flanqueado em ambas as extremidades por repetições diretas imperfeitas de 25pb (bordas do T-DNA); também possui a região vir (virulência) compreendendo 35 b do plasmídeo Ti/Ri e composto de locos vir e iii) os genes cromossomais de virulência chv (chromosomal virulence) (Quecini & Vieira, 2001).

A transferência do T-DNA é mediada por produtos codificados pela região vir de 30-40 Kb do plasmídeo Ti que é composta de no mínimo 6 operons essenciais (virA, virB virC, virD, virE e virG) e dois não essenciais (virF e virH). O número de genes

por operon difere, vir A, G e F tem somente um gene, Vir E, C e H tem dois genes e virD e B tem de 4 e 11 genes respectivamente. Os únicos operons constitutivos são o Vir A e G, codificando um sistema de dois componentes (VirA-VirG) ativando a transcrição de outros genes Vir (Riva *et al.*, 1999).

O Vir A detecta sinais moleculares, compostos fenólicos, principalmente pequenos compostos livres de plantas feridas. Os sinais de ativação do Vir A são pH ácido, compostos fenólicos, por exemplo a acetoseringona (Winans, 1992) e certas classes de monossacarídeos que atuam sinergisticamente com compostos fenólicos (Ankenbauer & Nester, 1990, Cangelosi *et al.*, 1990, Shimoda *et al.*, 1990 e Doty *et al.*, 1996). O Vir B são proteínas que apresentam características hidropáticas similares a outras proteínas associadas a membrana (Kuldau *et al.*, 1990; Shirasu *et al.*, 1990, 1994; Thompson *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1988). A maioria das proteínas Vir B estão reunidas a proteína que envolve o canal intermembrana (Shirasu & Kado, 1993a, 1993b; Shirasu *et al.*, 1994; Stephens *et al.*, 1995; Das & Xie, 1998).

O processo de transferência pode ser dividido em duas etapas principais: uma etapa bacteriana, e uma eucariótica que ocorre na célula vegetal (Zupan & Zambryski, 1995).

Uma vez que o segmento a ser transferido é definido por suas bordas, a região codificante do T-DNA, pode ser substituída por qualquer outra sequência de DNA sem que a transferência do *Agrobacterium* para a planta seja prejudicada. A substituição dos oncogenes por genes de interesse, flanqueados pelas bordas do T-DNA, fornece um sistema eficiente de obtenção de plantas transgênicas (Quecini & Vieira, 2001).

A metodologia envolvendo *Agrobacterium* possui várias vantagens em relação às demais técnicas existentes, principalmente por utilizar um processo que ocorre

naturalmente: 1) a transformação das células é permanente e altamente eficiente uma vez que apenas uma cópia do T-DNA é integrada no genoma da célula e normalmente em um local que não prejudica as funções celulares normais, 2) a infecção se dá em células intactas o que facilita a regeneração da planta; 3) é possível a transferência de grandes moléculas de DNA, com raros eventos de rearranjos; 4) é um processo simples e pouco oneroso. No entanto, nem todas as espécies vegetais são suscetíveis à infecção por *Agrobacterium* e falso-positivos aparecem com uma certa frequência devido à contaminação bacteriana (Zaha & Passaglia, 2003).

Estudos de genética molecular e de transformação são realizados baseados em sistemas de plantas-modelo, assim chamadas por possuírem uma ou mais das seguintes características: boa adaptação a cultura de tecidos, alta susceptibilidade à infecção por *Agrobacterium* e fácil manipulação molecular. As principais espécies utilizadas como modelo são: *Nicotiana tabacum* (fumo), *Brassica napus*, *Daucus carota* (cenoura), *Populus spp.* (Álamo) e *Arabidopsis thaliana* (Torres *et al.*, 1999).

Outras plantas podem também ser utilizadas como modelo para determinados estudos. Este é o caso da batata (*Solanum tuberosum*), que apresenta um sistema eficiente de análise da expressão de genes tecido-específico, da estrutura e origem de promotores, e do desenvolvimento de órgãos (Torres *et al.*, 1999).

Sob condições de laboratório, uma ampla variedade de espécies vegetais, incluindo muitas dicotiledôneas e algumas gimnospermas são transformáveis pelas agrobactérias. Plantas monocotiledôneas, por muito tempo, foram consideradas inacessíveis a transformação por *Agrobacterium*, no entanto, modificações realizadas nas sequências de genes *vir* e na combinação dos mesmos possibilitaram que várias espécies transgênicas de monocotiledôneas fossem obtidas incluindo espécies de

interesse econômico como o arroz, cevada, milho, trigo, aspargo, cana, banana, tulipas, entre outras (Pasquali & Zanettini, 2003).

Segundo Porter (1991) espécies do gênero *Solanum* são altamente susceptíveis as infecções por bactérias indutoras de raízes como a *Agrobacterium rhizogenes*.

O cultivo de raízes transformadas representou um grande progresso para a viabilização da produção de metabólitos secundários (Flores *et al.*, 1987; Hamil *et al.*, 1987; Signs & Flores, 1990), pois além de apresentarem estabilidade genética e bioquímica, essas raízes exibem a capacidade biossintética total das vias metabólicas específicas da raiz da planta (Flores & Curtis, 1992). As raízes em cabeleira (hairy roots) podem ser submetidas à fermentação e respondem a estímulos, tais como indutores biológicos (microrganismos) e não-biológicos (sais de metais pesados, polissacarídeos, etc).

As diferenças entre linhagens transformadas baseiam-se no efeito da posição cromossomal do Ri T-DNA inserido, o número de cópias estáveis integradas no genoma, e os diferentes genótipos do material original (Collin, 2001)

Culturas transformadas de espécies medicinais pertencentes às mais variadas famílias têm sido estabelecidas como *Physalis angulata* L (Solanaceae) que produzem fisalinas (Gottlieb *et al.*, 1987). Produção de vedelolactona em *Eclipta alba* L. Hassk (*A. rhizogenes*-LBA 9402) biossíntese de isoflavonas em *Lupinus mutabilis* (Babaoglu, *et al.*, 2004) produção de alcalóides em *Catharantus roseus* (Whitmer *et al.*, 2003) e *Datura stramonium* (Collin, 2001).

A regeneração de plantas transformadas de cultivo *in vitro* tem sido utilizada como estratégia no incremento de metabólitos secundários de plantas intactas, no entanto a base das alterações desse processo ainda permanece desconhecidas.

Esse fato pode ser confirmado em algumas espécies como em *Vinca minor* onde o acúmulo de vincamina (importante vasodilatador) foi maior em plantas regeneradas de raízes transformadas que em plantas não transformadas, além de ser comprovada a manutenção do seu metabolismo alterado para alta produção desse composto (Tanaka *et al.*, 1995).

Raízes transformadas obtidas de algumas espécies do gênero *Solanum* tem sido relatadas. A habilidade de produção de solasodina em isolados de raízes transformadas sugerem que as raízes podem servir como um dos possíveis sítios de biossíntese de solasodina como confirmam em plantas intactas os autores Drews & Van Staden (1995) com *S. mauritianum* e Alvarez *et al.* (1994) em *S. eleagnifolium*.

O estudo e avaliação da variabilidade genética dentro do gênero *Solanum* no que se refere a compostos de interesse como é o caso dos alcalóides esteroidais que caracterizam esse gênero são de grande relevância podendo avaliar possíveis diferenças entre populações e espécies.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados em quatro capítulos correspondentes a trabalhos submetidos ou em preparação. Os títulos dos capítulos são:

Capítulo 1- A survey of steroid alkaloids and phenolic content in *Solanum* species from South Brazil.

Capítulo 2- *In vitro* propagation of *Solanum pseudocapsicum* L.: an emergin ornamental and medicinal plant.

Capítulo 3- Conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em cultivos *in vivo* e *in vitro* de *Solanum pseudocapsicum* L.

Capítulo 4- Produção de alcalóides esteroidais em plantas regeneradas de *Solanum pseudocapsicum* L. transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834.

CAPÍTULO 1

A survey of steroid alkaloids and phenolic content in *Solanum* species from South Brazil

(Artigo enviado para a revista Brazilian Journal of Pharmacognosy)

**A survey of steroid alkaloids and phenolic content in *Solanum* species
from South Brazil**

Luciana Bavaresco Andrade^{1*}, *Agostini, F.*¹, *Horacio Heinzen*², *Sergio*

Echeverrigaray^{1*}

¹*Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, R. Francisco G. Vargas 1130;*

95001-970; Caxias do Sul, RS, Brazil

²*Pharmacognosy & Natural Products, Faculty of Chemistry, General Flores 2124,*

Montevideo Uruguay

^{*}*E-mail: lbatougu@gmail.com and selaguna@yahoo.com, Tel./Fax +54-32182100-*

R:2075

RESUMO: “Levantamento de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em espécies do gênero *Solanum* identificadas em plantas do Sul do Brasil”

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a concentração de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em um conjunto de espécies nativas e introduzidas do gênero *Solanum* coletadas no Rio Grande do Sul. A quantificação de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos foi realizada através de métodos espectrofotométricos rápidos e de baixo custo. As espécies testadas foram: *S. paranense* Dusén; *S. sisymbriifolium* Lam.; *S. mauritanum* Scop.; *S. subsylvestris* L.B. Sm. e Downs; *S. atropurpureum* Schrank; *S. aculeatissimum* Jacq.; *S. americanum* Mill.; *S. pseudocapsicum* L.; *S. selowianum* Sendtn.; *S. paniculatum* L.; *S. guaraniticum* A.St.-Hil; *S. laxum* Spreng.; *S. variabile* Mart. As maiores concentrações de alcalóides esteroidais foram detectadas nas espécies *S. pseudocapsicum* (1.01 g/100g), *S. laxum* (0.68 g/100g), *S. paranense* (0.52

g/100g) e *S. selowianum* (0.41 g/100g). As espécies *S. laxum* e *S. atropurpureum* apresentaram uma concentração de compostos fenólicos aproximadamente quatro vezes maior do que a médias (1,26 EGA/g) das outras 11 espécies analisadas. O principal alcalóide esteroidal obtido de folhas de *S. pseudocapsicum* foi a solanocapsina, mas outros alcalóides estão presentes no extrato metanólico desta espécie.

Unitermos: Solanaceae, *Solanum*, alcalóides esteroidais, solasonocapsina, compostos fenólicos.

ABSTRACT:

This work had the objective to evaluate the concentration of steroid alkaloids and total phenolic compounds in a group of native and exotic species of *Solanum* collected at Rio Grande do Sul State. The quantification of steroid alkaloids and phenolic compounds was accomplished using rapid and low cost spectrophotometric methods. The species evaluated were: *S. paranense* Dusén; *S. sisymbriifolium* Lam.; *S. mauritanium* Scop.; *S. subsylvestris* L.B. Sm. e Downs; *S. atropurpureum* Schrank; *S. aculeatissimum* Jacq.; *S. americanum* Mill.; *S. pseudocapsicum* L.; *S. selowianum* Sendtn.; *S. paniculatum* L.; *S. guaraniticum* A.St.-Hil; *S. laxum* Spreng.; *S. variabile* Mart. The highest concentration of steroid alkaloids were detected in *S. pseudocapsicum* (1.01 g/100g), *S. laxum* (0.68 g/100g) , *S. paranense* (0.52 g/100g) and *S. selowianum* (0.41 g/100g). *S. laxum* and *S. atropurpureum* showed four times more phenolic compounds than the average value of the other 11 species evaluated. The main steroid alkaloid obtained from *S. pseudocapsicum* leaves was solanocapsine, but other alkaloids are also present in methanolic extracts of this species.

Keywords: Solanaceae, *Solanum*, steroid alkaloids, solasodine, phenolic compounds.

INTRODUCTION

The genus *Solanum* includes about 1500 species and has at least 5000 published epithets (Nee, 1999). This genus is widely distributed around the world, but the highest number of species are originals from South-America, particularly the Andes and Pacific region (Hunziker, 2001). The genus is well represented in Brazil, and is distributed from north to south in different phytogeographic regions (Silva et al, 2007).

In South-Brazil, 93 native species of the genus *Solanum* have been identified (Nee (1999). These species are separated in three subgenera: *Bassovia* (13 species), *Solanum* (56 species), and *Leptostemonum* (31 espécies) (Miz et al., 2008). *Solanum* species are known as important producers of steroid alkaloids. The *Solanum* steroid alkaloids generally occur as glycosides, the aglycones of which possess the C₂₇-carbon skeleton of cholastane and are separated in five groups: (1) the spirosolanes, e.g. solasodine; (2) the epiminocholestanes, e.g. solacongostidine; (3) the solanidanones, e.g. solanidine; (4) the solonacapsine group, e.g. solanocapsine; and (5) the 3-aminospinostanes, e.g. jurubidine (Ripperger, 1998).

Several plant defense activities have been attributed to *Solanum* steroid alkaloids, including anti-feeding and insecticide (Weisseberg et al., 1998), antifungal (Cipollini, Levey, 1997), molluscicidal (Silva et al., 2005), antibacterial activities (Rokka, et al 2005), but also important pharmacological properties, as antinociceptive (Rahman et al, 2003), anti-inflammatory (Emmanuel et al., 2006), anti-carcinogenic (Cham et al., 1991), and anti-viral activities (Ikeda et al., 2000). Moreover, some steroid alkaloids are considered as potential substitutes for diosgenin in the semi-synthetic production of steroidal hormones (Putalun et al., 2004).

An other important group form by plants secondary metabolism are phenolic compounds, including lignin, tannins, furanocumarins, salicylic acid, flavonoids, phenylpropanoids, and a vast range of small aromatic molecules. Phenolic compounds have several biological functions in plants, including plant structure (e.g. lignin), plant-pathogen interactions, allelopathic activity, hormonal functions, among others. In the pharmacological point of view, some phenolic compounds are known as anti-allergic, anti-inflammatory, antibiotic, cardio-protective, anti-thrombotic, anti-oxidant, among other activities (Middleton et al, 2000; Puupponen-Pimia et al, 2001; Manach, Mazur, 2005). Although, phenolic compounds have been studied and characterized in a restricted number of *Solanum* species, like *Solanum laciniatum* (Chandler, Doods, 1983), *Solanum tuberosum* (Kähkönen et al, 1999), *Solanum lycocarpum* (Roesler, et al., 2007), *Solanum indicum* (Aberoumand, 2008), the high variation and concentration observed indicates the potential of these plants for pharmacologic purposes.

In this context, the aims of the present work were to quantified steroid alkaloids and total phenolic compounds in a group of 13 native and exotic species of the genus *Solanum* currently found growing wild in the Southeast mountains of Rio Grande do Sul State (Brazil), and to identify the main steroid alkaloid of *Solanum pseudocapsicum*.

Material and Methods

Plant material

The plants were collected in the municipalities of Caxias do Sul, Bento Gonçalves and São Francisco de Paula and Flores da Cunha, Rio Grande do Sul, Brazil. They were identified and exsiccates of each species were deposited in the Herbarium of the University of Caxias do Sul.

Two to four representatives of the following species were included in the present study: *S. paranense* Dusén, *S. sisymbriifolium* Lam., *S. mauritianum* Scop., *S. subsylvestris* L.B. Sm. and Downs; *S. atropurpureum* Schrank, *S. aculeatissimum* Jacq., *S. americanum* Mill., *S. pseudocapsicum* L., *S. selowianum* Sendtn., *S. paniculatum* L., *S. guaraniticum* A.St.-Hil, *S. laxum* Spreng., and *S. variabile* Mart. Species nomenclature adopted by IBGE (1992). All plants were collected in their flowering periods.

Leaves were collected, and dried at room temperature in 50ml Falcon tubes with 12g of Silica Gel Blue (Vetec) for five days. After this period, the dried material was chilled with liquid nitrogen, crushed with mortar and pestle, and conserved in Eppendorf tubes at -80°C

Extraction and quantification of steroid alkaloids

Total steroid alkaloids were determined by a modification of the Methyl-Orange method described by Birner (1969). Ten mg of leaves powder were macerated with 1ml of methanol (95%) at 70°C for 30 min. After this period samples were centrifuged for 5 min at 14000xg. The supernatant aliquots (0.5ml) were collected and dried at 70°C (dried methanolic extract). Dried samples were suspended in 150 µL of 1M HCl and hydrolyzed for 1h at 100°C. Samples were neutralized with 150 µL of 1M NaOH, acidified with 100 µL of 1M HCl, and adjusted to 1ml with deionized water. This hydrolyzed crude extracts (HCE) were conserved at -80°C.

For steroid alkaloid determination, 250 µL of HCE were mixed with 250 µL of 5M HCl, 500 µL of 2.5 M acetate buffer pH 4.7, and 100 µL of Methyl-Orange solution (0.05%). Samples were strongly vortexed for 7 min, 500 µL of chloroform were added, and agitated again for 3min. The chloroform fractions were collected, and the aqueous

fraction was re-extracted with 600 μ L of chloroform. The absorbance of the pulled chloroformic fractions was determined at 420nm in a Biospectro SP220 spectrophotometer, and compared with those obtained in a calibration curve with solasodine (0 to 120 μ g) submitted to the same hydrolytic and extraction procedures. Data were expressed as solasodine equivalents (SEq).

Extraction and quantification of total phenolic compounds

Total phenolic compounds were determined by the Folin-Ciocalteu method (Single, Rossi, 1965), modified as follow: samples (50 mg) were extracted with 10 ml of ethanol, and 0.5ml were collected and mixed with 2.5ml of Folin-Ciocalteu reagent and 2ml of sodium carbonate 7.5%. The samples were incubated for 5 min at 50°C, cooled to room temperature, and centrifuged (3 min, 13000xg). The absorbance of the liquid fraction was determined at 760 nm in a Biospectro SP220 spectrophotometer. A calibration curve of gallic acid was used to determine the phenolic acid concentration as gallic acid equivalents (GAEq).

TLC analysis of alkaloids

Samples of leaves (50 mg) were mixed with 5 mL of 1% acetic acid using a glass rod. The rod was rinsed with 1mL of the extraction solution, and the tube was capped and sonicated for 5 min. The tubes were centrifuged (5000 g, 5 min), the solution was removed with a Pasteur pipette, and the residue was re-extracted as before with 5mL of 1% acetic acid. The combined extracts were applied to a preconditioned (3 x 3ml methanol) Sep-Pack C₁₈ cartridge (Millipore, Milford, MA, USA). The cartridge was washed with 40 % aqueous methanol (10 mL), and the steroid alkaloids were eluted with methanol (10 mL). The residue was dissolved in 500 μ L of methanol and this solution was used for the quantification step.

Aliquots (5 μ L) of the solutions were applied in duplicate on pre-coated silica gel plates (5 x 8 cm nylon supported, Marchery-Nagel, Düren, Germany). The plates were developed in 17.5 x 11.0 x 6.2 cm chamber (saturation time-30 min), using chloroform-methanol-2% aqueous ammonia (70:30:5) as the mobile phase. After separation, the plates were air dried, sprayed with Dragendorff reagent, and dried. The spots were visualized and digitalized within 30 min.

GC analysis

Dried methanolic extracts were dissolved in 0.5 ml of chloroform, and 2 μ l injected in a Hewlett Packard 6890 gas chromatograph (GC) equipped with a HP-Chemstation data processor. The analyses were performed using a DB-1 capillary column (15m x 530 μ m i.d.; film thickness 0.25 μ m). The column temperature was initially 100°C and then increased to 260°C at 5°C min (held for 5 min) 310°C at 10°C min⁻¹, held for 5 min. The inlet temperature was set at 270°C, the split ratio was 2:1, the flame ionization detector was 280°C and carrier gas was hydrogen (192,0 cm.s⁻¹).

NMR analysis

Dried leaves powder (2g) were treated with 20 ml of hexane. Plant material was then extracted with 20 ml of ammoniacal methanol for 24h at room temperature, filtered and dried at reduced pressure. The pellet was diluted in 20 ml of 2% acetic acid and filtered. The liquid fraction was extracted 2x with chloroform. The aqueous phase was brought to pH 8 with 25% ammonia and extracted 2x with chloroform. The organic phase was dried, dissolved and percolated through a silica gel column using chloroform-methanol (70:30). Ten fractions were collected and evaluated by TLC. The alkaloid fraction (fraction 4) was further analyzed. ¹H- NMR spectra were obtained at 30°C at

400MHz using a Bruker Avance DPX 400 spectrometer. Chemical shifts were reported in ppm, using 2,3,3-trimethyl-2-butanol (δ_{H} 0.00) as internal reference.

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of steroid alkaloids of the aerial parts of 13 native and exotic *Solanum* species currently growing in the mountains of Rio Grande do Sul indicates a significant quantitative variation among species, and low variation within samples of the same species (Table 1). The highest content of steroid alkaloids were obtained on representatives of *S. pseudocapsicum* (1.01 ± 0.13 g SEq/100g), followed by *S. laxum* (0.679 ± 0.01 g SEq/100g), *S. paranense* (0.52 ± 0.01 g SEq/100g) and *S. selowianum* (0.41 ± 0.001 g SEq/100g). Except for *S. mauritanum* and *S. americanum*, species of sub-genus *Solanum* exhibited high steroid alkaloid content, compared with those of the sub-genus *Leptostemonum*. Steroid alkaloid contents obtained are within the range (0% to 4.3%) reported by Weiler et al. (1980) studying 250 species of *Solanum*, and the solasodine content of *Solanum* species from the cerrado (Mola et al., 1997).

Total phenolic content also varied among the *Solanum* species evaluated. The highest values were obtained in *S. laxum* (5.12 ± 0.30 mg GAEq/g) and *S. atropurpureum* (4.95 ± 0.46 mg GAEq/g), approximately 4x higher than the average content exhibited by the other 11 species. No relation was observed between steroid alkaloids and phenolic compounds concentrations.

TLC analysis of the methanolic extracts of the four species (*S. paranense*, *S. pseudocapsicum*, *S. selowianum*, and *S. laxum*) with higher steroid alkaloids content showed different profiles, indicating the presence of different alkaloids in each species (Figure 1). *S. pseudocapsicum* and *S. selowianum* profiles were characterized by the

presence of a main alkaloid that represents more than 60% of the alkaloids in the methanolic extracts. Previous works showed that *S. pseudocapsicum* berries contain solanocapsine (Chakravarty et al., 1984) and other alkaloids Aliero et al. (2005), where *S. laxum* is characterized by the presence of solamargine and solasonine (Eich, 2008), and *S. paranense* by β -solanigrine (Ripperger & Shreiber, 1981).

Considering the high steroid alkaloid concentration (Table 1), and the previously reported cytotoxic, hepatoprotective, and anti-tumour properties of the total alkaloid fractions of the methanolic extracts of the leaves, ripe fruits, roots, seeds and stems of *S. pseudocapsicum* (Vijayan et al., 2002, 2003, 2004), we further analyzed the extract obtained from this species. As can be observed in Figure 2.A, three peaks were obtained by GC analysis, indicating the presence of at least three alkaloids in the methanolic extracts obtained from leaves. The peak with 27.694 was the main alkaloid detected in methanolic extracts from ripped fruits (data non shown), indicating that it represents solanocapsine. $^1\text{H-RMN}$ analysis of a partially purified fraction containing the main steroid alkaloid of *S. pseudocapsicum* leaves is presented in Figure 2.B. Double methyl peaks between $\delta= 0.89-1.25$ ppm are indicatives of the presence of more than one compound in the extract. However, characteristic signals of solanocapsine are evidenced: (1) a proton at C-3 that appears at 2.65ppm, which correspond to a carbon linked to an amine; (2) two protons linked to C-26 observed at 3.02 ppm, and (3) the proton linked to C-16 evidenced at 4.57 ppm. The peak at 3.75 ppm indicates the presence of two protons from a carbon linked to an oxygen atom, and corresponds to an alkaloid of unknown structure. As previously mentioned, solanocapsine has been identified in ripped fruits of *S. pseudocapsicum* (Chakravarty et al., 1984), but this is the first report of this compound in the aerial tissues of this species. Moreover, the other

steroid alkaloids present in the methanolic extracts should be further investigated.

References

- Aberoumand A 2008. Comparison of protein values from seven wild edible plants from Iran. *Afr. J. Food Sci.* 2: 73-76.
- Aliero AA, Grierson DS, Afolayan AJ 2005. Chemical and nutrient characterization of *Solanum pseudocapsicum* berries. *Afr. J. Biotech.* 4: 1300-1303.
- Birner J, 1969. A method for the determination of totals steroid bases, *J, Pharm. Sci.* 58: 258-259.
- Chakravarty AK, Das B, Ali E, Pakrashi SC 1984. New spirostane saponin and sapogenins from *Solanum hispidum* seeds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* 467-474.
- Cham BE, Daunter B, Evans RA 1991. Topical treatment of malignant and premalignant skin lesions by very low concentration of a standard mixture (BEC) of solasodine glycosides. *Cancer Lett.* 59:183-192.
- Chandler SF, Doods JH 1983. The Effect of Phosphate, Nitrogen and Sucrose on the Production of Phenolics and Solasodine in Callus Cultures. *Plant Cell Rep.* 2:205-208.
- Cipollini ML, Levey DJ, 1997. Antifungal Activity of *Solanum* Fruit glycoalkaloids: implications for frugivory and seed dispersal. *Ecology*, 78: 799-809.
- Eich, E 2008. Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Biosynthesis, Chemotaxonomy Biological and Economic Significance. *A Handbook.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg 637.

- Emmanuel S, Ignacimuthu S, Perumalsamy R, Amalraj T 2006. Antiinflammatory activity of *Solanum trilobatum*. *Fitoterapia* 77: 611-612.
- Hunziker, A.T. 2001. Genera Solanacearum. Ruggell, A.R.G.Gantner Verlag. 500p.
- Ikeda T, Ando J, Miyazono A, Zhu XH, Tsumagari H, Nohara T, Yokomizo K, Uyeda M 2000. Anti-herpes virus activity of *Solanum* steroidal glycosides. *Biol. Pharm. Bull.* 23: 363-364.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 37: 3954-3962.
- Manach C, Mazur A 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Rev. 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 230S-242S.
- Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharm. Rev.* 52: 673-751.
- Miz RB, Mentz LA, Souza-Chies TT 2008. Overview of the phylogenetic relationships of some southern Brazilian species from section Torva and related sections of “spiny *Solanum*” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae) *Genetica* 132: 143-58.
- Mola JL, Araujo ER, Magalhães GC 1997. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do distrito federal. *Química Nova* 20: 460-462.
- Nee M 1999. Synopsis of *Solanum* in the New World. In: Nee, M.; Symon, D.E.; Lester, R.N.; Jessop, J.P. (eds), *Solanaceae IV. Royal Botanic Gardens Kew*, 285-333.

- Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Meier C, Kahkonen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol*, 90: 494-507.
- Putalum W, Prasarnsiwamai P, Tanaka H, Shoyama Y 2004. Solasodine glycoside production by hairy roots cultures of *Physalis minima* Linn. *Biotech. Lett.* 26: 545-548.
- Rahman MT, Ahmed M, Alimuzzaman M, Shilpi JA 2003. Antinociceptive activity of the aerial parts of *Solanum xanthocarpum*. *Fitoterapia* 74 119-121.
- Ripperger H, 1998. *Solanum* steroid alkaloids– an update. In: Pelletier SW (ed), Alkaloids: chemical and biological perspectives, v. 12. Elsevier Science, Amsterdam The Netherlands, 103-185.
- Ripperger H, Shreiber K 1981. *Solanum* steroidal alkaloids. In: Rodrigo RGA (ed) The alkaloids: chemistry and physiology v. 19. Academic Press, London New York, pp 81-192.
- Roesler J 2007. Important role of corticosteroids in cronic granulomatous disease. *J. Med. Microbiol*, 56: 1253.
- Silva, TMS, Batista MM, Camara, CA, Agra MF 2005. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 99: 419– 425.
- Silva TMS, Nascimento RJB, Batista MM, Agra MF, Camara CA 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Braz. J. Pharmacogn.* 17: 35-38.
- Singleton VL, Rossi JA, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144–158.

- Vijayan P, Kumar, VS, Preethi V, Dhanaraj, SA, Shrishailappa B, Suresh B 2002. In vitro Cytotoxicity and Anti-tumor properties of the total Alkaloid Fraction of Unripe Fruits of *Solanum pseudocapsicum*. *Pharm. Biol.* 40:456-460.
- Vijayan P, Prashanth, HC, Preethi V, Dhanaraj SA, Shrishailappa B, Suresh B 2003. Hepatoprotective Effect of the total Alkaloid Fraction of Unripe Fruits of *Solanum pseudocapsicum* leaves. *Pharm. Biol.* 41:443-448.
- Vijayan P, Vijayaraj P, Setty PH, Hariharpura RC, Godavarthi A, Badami S, Arumugam DS, Bhojraj S 2004. The cytotoxic activity of the total alkaloids isolated from different parts of *Solanum pseudocapsicum* leaves. *Pharm. Bull.* 27: 528-30.
- Weiler EW, Krüger H, Zenk MH 1980. Radioimmunoassay for the determination of the steroidal alkaloid solasodine and related compounds in leaving plants and herbarium specimens. *Planta Med.* 39: 112-124.
- Weissemberg M, Levy A, Svoboda JA, Inbaaya I 1998. The effect of *Solanum* steroidal alkaloids and glycoalkaloids on larvae of the red flour beetle *Triblium cartaneum*, and the tobacco hornworm. *Phytochemistry* 47: 203-209.

Table 1- Steroid alkaloids and total phenol content in leaves of 13 *Solanum* species.

<i>Solanum</i> Species	Steroid alkaloids (g SEq/100g dry wt.)*	Phenolic Compounds (mg GAEq/g)*
<i>S. paranense</i>	0.52 ± 0.01 ^{bc}	1.37 ± 0.06 ^{bc}
<i>S. sisymbriifolium</i>	0.24 ± 0.19 ^{de}	1.65 ± 0.03 ^b
<i>S. mauritianum</i>	0.19 ± 0.12 ^{de}	1.18 ± 0.16 ^{bcd}
<i>S. subsylvestris</i>	0.17 ± 0.02 ^{de}	1.92 ± 0.24 ^b
<i>S. atropurpureum</i>	0.29 ± 0.13 ^d	4.95 ± 0.46 ^a
<i>S. aculeatissimum</i>	0.31 ± 0.12 ^{dc}	1.45 ± 0.09 ^{bc}
<i>S. americanum</i>	0.24 ± 0.12 ^{de}	1.16 ± 0.13 ^{bcd}
<i>S. pseudocapsicum</i>	1.01 ± 0.13 ^a	1.59 ± 0.08 ^b
<i>S. laxum</i>	0.68 ± 0.02 ^b	5.12 ± 0.30 ^a
<i>S. paniculatum</i>	0.32 ± 0.19 ^{cd}	0.69 ± 0.04 ^{cd}
<i>S. guaraniticum</i>	0.28 ± 0.11 ^d	0.52 ± 0.07 ^b
<i>S. selowianum</i>	0.41 ± 0.01 ^{cd}	1.12 ± 0.10 ^d
<i>S. variable</i>	0.16 ± 0.17 ^e	1.84 ± 0.21 ^b

* SEq- solasodine equivalents; GAEq- gallic acid equivalents.

Mean values within the same column followed by different letters are significantly different as determined by the Tukey's test (p<0.05).

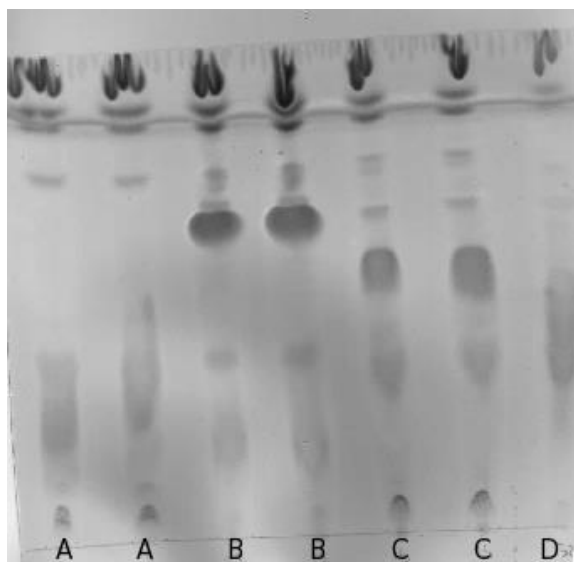
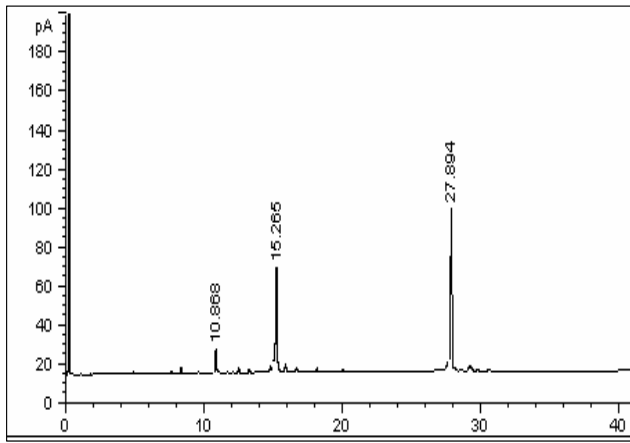
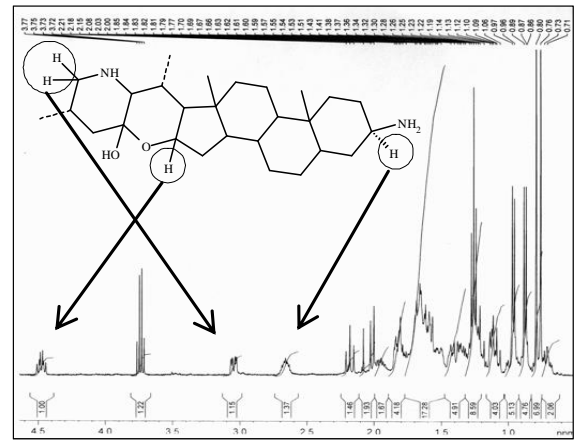


Figure 1- TLC patterns of total steroid alkaloids extracted from (A) *S. paranense*, (B) *S. pseudocapsicum*, (C) *S. laxum*, and (D) *S. selowianum*.



A



B

Figure 2- GC (A) and $^1\text{H-NMR}$ (B) spectra of *S. pseudocapsicum* steroid alkaloids.

CAPÍTULO 2

***In vitro* propagation of *Solanum pseudocapsicum* L.: an emergin ornamental and medicinal plant.**

(Artigo enviado para a revista Biologia Plantarum)

***In vitro* propagation of *Solanum pseudocapsicum* L.: an emergin ornamental and medicinal plant.**

L.B. ANDRADE, M. ISOTTON and S. ECHEVERRIGARAY

*Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, R. Francisco G. Vargas 1130;
95001-970; Caxias do Sul, RS, Brazil*

Note: Financial support from the Foundation of the University of Caxias do Sul and CNPq.

Abstract

Node explants from a selected plant of *Solanum pseudocapsicum* were used to evaluate the effect of growth regulators on the *in vitro* shoot proliferation and growth. Multiple adventitious shoots were regenerated through direct organogenesis on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with benzyladenine (BA), with a positive correlation (0.935) between BA concentration and shoot number. The highest multiplication rate (>80 shoots/explants) was obtained on MS plus 17.9 μM BA. However, considering the multiplication rate and shoot growth, the best conditions was MS plus 4.4 μM BA. Intense rooting was obtained on MS medium supplemented with 2.46 μM IBA or 5.71 μM IAA. Rooted plantlets were successfully established in soil with a survival frequency of 94%. Moreover, there were no phenotypic differences observed between the *in vitro* regenerated and *in vivo* plants.

Additional key words: Jerusalem Cherry; micropropagation; growth regulators; adventitious shoots.

Abbreviations: BA – 6-benzyladenine; IAA – indole-3-acetic acid; IBA – indole-3-butyric acid; MS - Murashige and Skoog; NAA – α -naphthalene acetic acid.

Solanum pseudocapsicum L. (Solanaceae), known as Jerusalem Cherry or Winter Cherry, is native to Peru, and currently found in drier microhabitats in Central and South America, from Mexico to southern Brazil, Argentina and Uruguay. This plant is an erect and highly branched small shrub with non-spiny stem, dark-green lanceolate leaves, and star-shaped flowers. Its berries are green when unripe and yellow, scarlet or bright red when ripe. Due to its brightly colored berries and beautiful plant structure, *S. pseudocapsicum* is cultivated as an indoor ornamental plant all around the world. Moreover, the anti-microbial (Mitscher *et al.* 1976), anti-viral (Van Den Berghe *et al.* 1987), anti-spasmodic and anti-hypertensive (Dhar *et al.* 1973) properties of their extracts have been reported. Unripe berries and leaves of *S. pseudocapsicum* contain solanocapsine and other glycoalkaloids with cytotoxic, hepatoprotective and antitumour properties against different malignant human tissues (Hohne *et al.*, 1970; Mitscher *et al.* 1976; Chakravarty *et al.* 1984; Vijayan *et al.* 2002, 2003, 2004).

S. pseudocapsicum is usually propagated by seeds. However, low seed germination and high morphological (plant height, fruit color, number of fruits) and chemical variation among seed derived plants limits its propagation for commercial purposes. Clonal propagation can be obtained by woody stem cutting, but its poor rooting and low multiplication rate restrains its application. In this context, micropropagation represents an interesting option to obtain highly uniform plants. *In vitro* propagation studies of *Solanum* species revealed considerable differences in hormonal response, direct regeneration, shoot proliferation, and rooting (Macek *et al.*, 1989; Pauli, 1988; Arokiazamy *et al.*, 2002; Okrslar *et al.*, 2002; Pawar *et al.*, 2002; Jawahar *et al.*, 2004; Boufleuher *et al.*, 2008), indicating that specific protocols are necessary for the efficient propagation of each species. In this sense, the present study shows the effect of sucrose

and growth regulators on the micropropagation of *S. pseudocapsicum*, and presents an efficient system for the *in vitro* propagation of this species.

Explants were obtained from adult plants (2 years-old) of *S. pseudocapsicum* (SAC Velling Holambra) maintained in a greenhouse at Caxias do Sul (Rio Grande do Sul, Brasil). These plants were obtained by stem cutting from a plant previously selected by its morphological and chemical (high solanocapsine content) characteristics. Nodal segments measuring 2 to 3 cm in length were excised during spring (September/December) and surface disinfected by a subsequent treatment with 70% ethanol (2 min.) and 0.1% sodium hypochlorite solution (20 min.). After rinsing with sterile distilled water, nodal segments were dissected and implanted vertically on culture media.

Propagation and rooting experiments were conducted on Murashige and Skoog (1962) basal medium (MS) supplemented with different concentrations of benzyladenine (BA), naphthalene acetic acid (NAA), indole acetic acid (IAA), indol butyric acid (IBA), and sucrose. Cultures were kept in a growth chamber at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ under a 16-h photoperiod with irradiance of $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The experimental designs were fully randomized with 20 or 60 explants per treatment. Data were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test ($P \leq 0.05$).

Rooted explants were washed in tap-water and transferred to plastic chambers containing carbonized rice barks, covered with a plastic cap that was gradually opened during the acclimatization period of 20 d. Acclimatized plants were transferred to the greenhouse and evaluated during one year.

In order to test the effect of benzyladenine and sugar concentrations on the multiplication of *S. pseudocapsicum*, nodal explants were inoculated on MS medium

supplemented with 0 – 17.8 μM BA, and 3, 5 and 8% sucrose. The results (Table 1) showed that the explants were capable of directly develop multiple adventitious shoots even in the absence of BA, but BA stimulated adventitious shoot proliferation in a concentration dependent manner. The highest multiplication rate (81.30 ± 6.48 shoots/explant) was obtained on medium supplemented with 17.8 μM BA. However, shoot length was drastically reduced in increasing concentrations of BA, and stunted shoots with signs of hyperhydricity were observed at 8.9 and 17.8 μM BA. Cytokinins, particularly benzyladenine, have been efficiently used for the micropropagation, direct and indirect regeneration of several medicinal *Solanum* species, as *S. aviculare* (Macek et al., 1989), *S. laciniatum* (Macek, 1989; Okrslar et al., 2002), *S. muricatum* (Pauli, 1988), *S. trilobatum* (Arokiasamy et al., 2002; Jawahar et al., 2004), *S. sessiliflorum* (Boufleuher et al., 2008), and *S. surattense* (Pawar et al., 2002). The best BA concentration for the *in vitro* propagation of *Solanum* species varied between 2.2 μM for *S. muricatum* (Pauli, 1988) and 20 μM for *S. trilobatum* (Arockiasamy et al., 2002). Considering all the parameters, the best concentration of BA for *S. pseudocapsicum* micropropagation was 4.4 μM , with a production of approximately 60 shoots/explants in 30 days. This multiplication rate was considerably higher than that reported for *S. muricatum*, *S. laciniatum*, *S. trilobatum* and *S. sessiliflorum* (Pauli, 1988; Arokiasamy et al., 2002; Okrslar et al., 2002; Jawahar et al., 2004; Boufleuher et al., 2008). Higher concentrations of BA (17.8 μM) could be used if followed by the transferred of the plantlets to a new medium containing 2.2 μM BA, previous to root induction. Using this system it was possible to obtain 467.5 ± 6.2 plants/explant in 60 days (data not shown). This multiplication rate was higher than that report for a similar three step micropropagation protocol for *S. trilobatum* (Jawahar et al., 2004).

Sugar concentration (3, 5 and 8%) did not significantly modify *in vitro* multiplication parameters when associated with different concentrations of BA (Table 1), except for the combination of 8% sucrose and 17.8 μM BA that exhibited a >45% reduction on the number of adventitious shoots. Although not significant, media supplemented with 5% sucrose supported a higher multiplication rate on different concentrations of BA. Low response to sucrose concentration was also observed in the micropropagation of different genotypes of *S. tuberosum* (Caligari and Powell, 2008). In *S. tuberosum*, as well as in other species of *Solanum*, successful *in vitro* propagation was obtained on media supplemented with 3% sucrose (Pauli, 1988; Arockiasamy et al., 2002; Pawar et al., 2002; Caligari and Powell, 2008).

Adventitious shoots with approximately 2 cm, obtained on MS medium supplemented with 5% sucrose and 4.4 μM BA, were transferred to MS media containing different auxins (IAA, IBA and NAA) alone or combined with 2.2 μM BA. Rooting percentage was 100% in MS hormone-free medium and MS media supplemented with IAA and IBA, but was drastically inhibited in the presence of 2.2 μM (Table 2). The number of roots increased with the concentration of IAA, IBA and NAA. The highest number of roots per explant (9.95 ± 1.34) was obtained on MS medium with 5.37 μM of NAA. However, these roots were short, dark and associated with the development of compact basal calli. Thus, considering shoot length, number of shoots, number of roots and root length, the best conditions for rooting were MS media supplemented with 2.46 μM of IBA and 5.71 μM of IAA.

Rooted plantlets obtained on MS medium with IBA and IAA were acclimatized and successfully transferred to soil with a survival frequency of 94%. Conversely, rooted plantlets derived from NAA supplemented medium showed low survival frequency

(13.5%) that can be attributed to the presence of calli and inefficient root function.

All the plants transferred to the greenhouse (157 plants) were grown until maturity. No morphological abnormalities were detected in micropropagated plants. When compared with the original plants and stem cutting derived plants with the same age, *in vitro* propagated plants showed similar behavior, plant height, fruit color, fruit shape, number of fruits, and other important ornamental characteristics.

The present study show that micropropagation through adventitious shoot development from nodal segments is a reliable method for the rapid multiplication of *S. pseudocapsicum*, allowing for the selection and propagation of elite clones of this increasingly important ornamental and medicinal plant.

References

- Ariokiasamy, D.I., Muthukumar, B., Natarajan, E., John Britto, S.: Plant regeneration from node and internode explants of *Solanum trilobatum* L. - Plant Tissue Cult. **12**: 93-97, 2002.
- Boufleuher, L.M., Schuelter, A.R., Luz, C.L., da Luz, C.L., Antes, V.A., Stefanello, S., Comerlato, A.P., Otoni, W.C.: *In vitro* propagation of *Solanum sessiliflorum* as affected by auxin and cytokinin combinations and concentrations. - Asian J. Plant Sci. **7**: 639-646, 2008.
- Caligari, P.D.S., Powell, W.: Variability in the response of potato cultivars to micropropagation: *In vitro* performance. - Ann. Appl. Biol. **115**: 115-121, 2008.
- Chakravarty, A.K., Das, B., Ali, E., Pakrashi, S.C.: Studies on Indian medicinal plants part-77 Structure and stereochemistry of some new steroidal alkaloids from *Solanum pseudocapsicum* and *Solanum giganteum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. - J. Chem. Soc. Perkin Trans., **1**: 467-474, 1984.
- Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehritra, B.N., Srimal, R.C., Tandon, J. S.: Indian J. Exp. Biol. **11**: 43-45, 1973.
- Jawahar, M., Amalan Rabert, G., Jeyaseelan, M.: Rapid propagation of multiple shoots in *Solanum trilobatum* L. Plant Tissue Cult. **14**: 107-112.
- Hohne, E., Ripperger, H, Schreiber, K.: Solanum Alkaloid- X^c. - Tetrahedron. **26**: 3569-3577, 1970.
- Macek, T.E.: *Solanum aviculare* Forst., *Solanum laciniatum* Ait. (Poroporo): In vitro culture and the production of solasodine. - In: Bajaj, Y.P.S. (ed.): Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 7. Medicinal and Aromatic Plants II. Pp. 443-467.

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg – New York 1989.

Mitscher, L.A., Juvakar, J.V., Beal, J. L.: Solanocapsine, a new steroidal alkaloid from *Solanum pseudocapsicum* possessing antimicrobial activity. - *Experientia*, **32**: 415, 1976.

Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant.* **15**: 473-497, 1962.

Okrslar, V., Trukelj, B., Kreft, S., Bohanec, B, El, J.: Micropropagation and hairy root culture of *Solanum laciniatum* Ait. - *In vitro Cell. Develop. Biol. – Plant* **38**: 352-357, 2002.

Pauli, R.: Micropropagation of pepinos (*Solanum muricatum* Aif). - *ISHS Acta Horticult.* **227**: 387-389, 1988.

Pawar, P.K., Pawar, C.S., Narkhede, B.A., Teli, N.P., Bhalsing, S.R., Maheshwari, V.L.: A technique for rapid micropropagation of *Solanum surattense* Burm. *Indian J. Biotechn.* **1**: 201-204, 2002.

Shrishailappa, B., Reddy, S.A.M., Kumar, E.D.P., Vijayan, P., Suresh, B.: Anti-tumor activity of total alkaloid fraction of *Solanum pseudocapsicum*. - *Phytotherapy*, **17**: 1001-1004; 2003.

Van Den Berghe, D.A., Ieven, M., Mertens, F., Vlietinck, A.J., Lammens, E.: Screening of higher plants for biological activities-11. Antiviral activity. - *J. Natl. Prod.*, **11**: 463-467; 1987

Vijayan, P., Kumar, V. S., Preethi, V., Dhanaraj, S.A., Shrishailappa, B., Suresh, B.: *In vitro* cytotoxicity and anti-tumor properties of the total alkaloid fraction of unripe fruits of *Solanum pseudocapsicum*. - *Pharm. Biol.* **40**: 456-460, 2002.

Vijayan, P., Prashanth, H.C., Preethi, V., Dhanaraj, S.A., Shrishailappa, B., Suresh, B.:

Hepatoprotective effect of the total alkaloid extraction of *Solanum pseudocapsicum* leaves. -Pharm. Biol. 41: 443-448, 2003.

Vijayan, P., Vijayaraj, P., Setty, P.H., Hariharapura, R.C., Godavarthi, A., Badami, S., Arumugam, D.S., Bhojraj, S.: The cytotoxic activity of the total alkaloids isolated from different parts of *Solanum pseudocapsicum* - Pharm. Bull. **27**: 528-30, 2004.

Tabela 1. Effect of benziladenine and sucrose concentration on the micropropagation of *S. pseudocapsicum* (Mean \pm SD, $n= 60$).

Sucrose (%)	BA (μ M)	N	Shoot length (cm)	Number of adventitious	Number of roots	Root length (cm)	Rooting (%)
3	0	60	6.24 \pm 0.61 ^a	8.15 \pm 0,36 ^g	3.55 \pm 0.52 ^a	6.42 \pm 0.25 ^a	100
	2.2	60	3.24 \pm 0.51 ^{bc}	28.15 \pm 2.32 ^{ef}	0.20 \pm 0.12 ^c	0.15 \pm 0.89 ^c	15
	4.4	60	3.27 \pm 0.37 ^{bcd}	50.50 \pm 2.50 ^{bc}	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
	8.9	58	2.09 \pm 0.10	52.36 \pm 4.23 ^{bc}	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
	17.8	60	1.16 \pm 0.17 ^{ef}	80.25 \pm 7.48 ^a	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
5	0	60	3.16 \pm 0.37 ^{bcd}	5.95 \pm 0.38 ^g	1.35 \pm 0.21 ^b	4.76 \pm 0.54 ^b	90
	2.2	60	4.59 \pm 0.39 ^b	33.2 \pm 2.66 ^{def}	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
	4.4	60	3.15 \pm 0.37 ^{bcd}	57.40 \pm 2.25 ^{bc}	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
	8.9	60	1.86 \pm 0.12 ^{def}	62.80 \pm 3.79 ^b	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
	17.8	60	0.73 \pm 0.04 ^f	81.30 \pm 6.48 ^a	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
8	0	60	3.9 \pm 0.49 ^{bc}	6.50 \pm 0.36 ^g	1.85 \pm 0.30 ^b	5.04 \pm 0.57 ^b	85
	2.2	60	2.48 \pm 0.29 ^{cde}	20.50 \pm 1.34 ^{fg}	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
	4.4	57	1.88 \pm 0.20 ^{def}	51.50 \pm 4.85 ^{bc}	0.10 \pm 0.00 ^c	0.07 \pm 0.07 ^c	15
	8.9	60	0.89 \pm 0.07 ^f	53.30 \pm 4.78 ^{bc}	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0
	17.8	58	0.81 \pm 0.05 ^f	38.5 \pm 4.67 ^{cde}	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c	0

Means followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$ according Tukey's multiple range test.

Table 2- Effect of benzyladenine and auxins on *S. pseudocapsicum* shoot proliferation and rooting (Mean \pm SD, $n= 20$).

BA (μ M)	Auxins concentration (μ M)	N	Shoot length (cm)	Number of shoots	Number of roots	Root length (cm)	Root ing (%)	
0	-	0	20	6.76 \pm 0.474 ^{ef}	9.79 \pm 0.47 ^{ef}	2.70 \pm 0.30 ^{ef}	5.83 \pm 0.22 ^a	100
	IBA	0.49	20	11.17 \pm 0.53 ^{abc}	11.00 \pm 0.60 ^{ef}	4.0 \pm 0.25 ^{de}	5.57 \pm 0.22 ^a	100
		2.46	20	10.68 \pm 0.57 ^{abc}	10.55 \pm 0.45 ^{ef}	6.5 \pm 0.65 ^{bc}	4.01 \pm 0.17 ^{bc}	100
		4.92	20	9.48 \pm 0.54 ^{cd}	11.60 \pm 0.62 ^{ef}	5.15 \pm 0.40 ^{bcd}	3.02 \pm 0.21 ^d	100
	IAA	0.57	20	9.96 \pm 0.61 ^{bcd}	10.15 \pm 0.45 ^{ef}	4.65 \pm 0.40 ^{cde}	5.86 \pm 0.36 ^a	100
		2.85	20	12.31 \pm 0.51 ^a	10.00 \pm 0.54 ^{ef}	5.70 \pm 0.52 ^{bc}	4.75 \pm 0.10 ^b	100
		5.71	20	11.77 \pm 0.47 ^{ab}	11.85 \pm 0.76 ^{ef}	6.05 \pm 0.43 ^{bc}	4.23 \pm 0.21 ^{bc}	100
	NAA	0.54	20	9.31 \pm 0.44 ^{cd}	9.80 \pm 0.92 ^{ef}	7.35 \pm 0.84 ^b	3.44 \pm 0.22 ^{cd}	95
		2.68	20	9.81 \pm 0.67 ^{bcd}	8.25 \pm 0.43 ^{ef}	5.95 \pm 0.82 ^{bc}	2.62 \pm 0.27 ^d	90
	5.37	18	8.41 \pm 0.66 ^{cde}	8.0 \pm 0.30 ^{ef}	9.95 \pm 1.34 ^a	2.7 \pm 0.30 ^d	89	
2.22	-	0	10	2.72 \pm 0.27 ^{hi}	62.7 \pm 5.73 ^a	0.20 \pm 0.13 ^g	0.16 \pm 0.11 ^e	20
	IBA	0.49	20	3.82 \pm 0.22 ^{ghi}	59.0 \pm 4.17 ^a	0.00 \pm 0.00 ^g	0.00 \pm 0.00 ^g	0
		2.46	20	5.21 \pm 0.40 ^{fg}	28.7 \pm 4.40 ^{cd}	0.5 \pm 0.24 ^{fg}	0.06 \pm 0.03 ^e	20
		4.92	20	2.59 \pm 0.20 ^{hi}	21.10 \pm 3.21 ^{de}	0.15 \pm 0.11 ^g	0.02 \pm 0.01 ^e	10
	IAA	0.57	20	4.51 \pm 0.36 ^{gh}	43.9 \pm 3.85 ^b	0.22 \pm 0.05 ^g	0.02 \pm 0.02 ^e	5
		2.85	20	2.83 \pm 0.28 ^{hi}	19.75 \pm 4.04 ^{def}	0.65 \pm 0.30 ^{fg}	0.09 \pm 0.03 ^e	30
		5.71	20	2.96 \pm 0.15 ^{hi}	34.15 \pm 5.75 ^{bc}	0.70 \pm 0.25 ^{fg}	0.15 \pm 0.50 ^e	40
	NAA	0.54	20	2.64 \pm 0.22 ^{hi}	20.60 \pm 2.95 ^{def}	0.10 \pm 0.06 ^g	0.02 \pm 0.02 ^e	10
		2.68	20	2.26 \pm 0.13 ⁱ	6.70 \pm 1.61 ^f	0.25 \pm 0.12 ^g	0.08 \pm 0.04 ^e	20
	5.37	20	2.11 \pm 0.73 ⁱ	8.95 \pm 2.97 ^{ef}	0.00 \pm 0.00 ^g	0.00 \pm 0.00 ^e	0	

Means followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$ according Tukey's multiple range test.

CAPÍTULO 3

Conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em cultivos *in vivo* e *in vitro* de *Solanum pseudocapsicum* L.

(artigo em preparação)

Conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em cultivos *in vivo* e *in vitro* de *Solanum pseudocapsicum* L.

Luciana Bavaresco ANDRADE^{*a}, Maurício SANTINI^a, Morgana ISOTTON^a,
Horácio HEINZEN^b, Sergio ECHEVERRIGARAY^{*a}

^a Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, R. Francisco Getúlio Vargas 1130; 95001-970; Caxias do Sul, RS, Brasil, ^b Departamento de Farmacognosia, Universidad de la República Federativa de Uruguay, 11800 – Montevideo, Uruguai.

RESUMO

O conteúdo de alcalóides esteroidais e fenóis totais foi avaliado em plantas *in vivo* e plântulas em cultivo *in vitro* de *S. pseudocapsicum*. O conteúdo de alcalóides e fenóis foi maior em folhas do que em pele de frutos e sementes. Nas folhas a concentração de alcalóides variou de $10,76 \pm 0,34 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em folhas apicais a $5,36 \pm 0,67 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em folhas basais. Em cultivo *in vitro* foi evidenciada ação estimulante de concentrações de até $4.4 \mu\text{M}$ benziladenina sobre a produção de biomassa vegetal e conteúdo de alcalóides esteroidais, atingindo concentrações superiores às evidenciadas em folhas apicais de plantas *in vivo*. Da mesma forma, concentrações crescentes de sacarose (3 a 8%) aumentaram o conteúdo de alcalóides quanto na ausência ou baixas concentrações de citocinina. Por outro lado, a adição de auxinas levou a redução significativa da produção de alcalóides, particularmente quando associadas à benziladenina. O conteúdo de alcalóides esteroidais em raízes *in vitro* foi em geral menor do que em tecidos da parte aérea, porém estimulado pela adição de auxinas, particularmente ácido indolbutírico. O conteúdo de fenóis totais não foi

significativamente alterado por reguladores de crescimento ou concentração de sacarose nas culturas *in vitro*, sendo este inferior ao detectado em folhas de plantas *in vivo*.

Palavras chave: *Solanum pseudocapsicum*, alcalóides esteroidais, folhas, frutos, sementes, reguladores de crescimento, sacarose.

INTRODUÇÃO

Solanum pseudocapsicum L., conhecida mundialmente como “Jerusalem Cherry”, pertence a família Solanaceae, sendo comumente utilizada como planta ornamental de interiores (Aliero et al., 2005). Esta espécie apresenta-se como arbusto ou subarbusto com ausência de espinhos, ereto e muito ramificado, com cerca de 0,6-1,2m de comprimento, lâminas das folhas maiores que variam de elípticas a lanceoladas, ápice e base agudos e via de regra assimétricas, com margem inteira ou ondulada, membranosas, com 2,4-10cm de comprimento e 0,9-3,5cm de largura. Seus frutos vão do branco esverdeado ao vermelho claro passando por tons amarelo-alaranjados. Suas sementes são ovóides e rodeadas de uma camada de polpa amarelada (Vijayan et al., 2004)

Além de sua utilização como planta ornamental, essa espécie tem sido relatada na medicina popular de alguns países para o tratamento de dores abdominais agudas (Boericke, 1927), cura de furúnculos e como tônico masculino (Batten & Bokelmann, 1966). Estudos farmacológicos tem mostrado atividade anti-viral, hepatoprotetora, antimicrobiana, anti-hipertensiva, antiespasmódica, anticancerígena e antioxidante (Mitscher et al.,1976; Van Den Berghe *et al.*,1987; Vijayan et al, 2002; 2003; 2004; Shrishailappa *et al.*, 2003; Badami et al, 2005) associada a presença de alcalóides esteroidais. Entretanto, alcalóides presentes nos frutos possuem efeito tóxico sendo

relatados como responsáveis por síndrome anti-colinérgica central (Parisi & Farancia, 2000), eventualmente fatal para homens e animais (Friedman & McDonald, 1997; Parisi & Farancia, 2000; Watson et al., 2004).

Um outro grupo importante de metabólitos secundários são os compostos fenólicos, os quais, podem ser encontrados fazendo parte da lignina, taninos, furanocumarinas, ácido salicílico, flavonóides, fenilpropanóides e um grande número de pequenas moléculas aromáticas. Compostos fenólicos tem várias funções biológicas nas plantas que variam desde a sua estrutura (lignina) a interações planta-patógeno, atividades alelopáticas, funções hormonais, entre outros. Do ponto de vista farmacológico, alguns compostos fenólicos tem conhecida ação como anti-alérgicos, anti-inflamatórios, antibióticos, cardio-protetores, antitrombóticos, antioxidantes, entre outras atividades (Middleton et al., 2000; Puupponen-Pimia et al., 2001; Manach & Mazur, 2005). Compostos fenólicos tem sido estudados e caracterizados em um restrito número de espécies do gênero *Solanum*, como em *Solanum laciniatum* (Chandler & Doods, 1983), *Solanum tuberosum* (Kähkönen et al, 1999), *Solanum lycocarpum* (Roesler, et al., 2007), *Solanum indicum* (Aberoumand, 2008), *Solanum paniculatum* (Ribeiro et al., 2007), variações de compostos e respectivas concentrações tem muitas vezes indicado o potencial farmacológico dessas plantas.

O uso das técnicas de cultivo *in vitro* no estudo e produção de metabólitos secundários tem sido amplamente revisada (Rout et al., 2000; Collin, 2001; Verpoorte et al., 2002; Sarin 2005). Em diversas espécies do gênero *Solanum*, tem-se identificado e estudado a produção de alcalóides buscando um melhor entendimento da biossíntese desses compostos, em plântulas *in vitro*, calos e células em suspensão (Kittipongpatana et al., 1998) e raízes transformadas (Kittipongpatana et al 1998; Curtis et al 2000; Jacob

& Malpathak, 2004). O alcalóide que tem despertado maior interesse é a solasodina, molécula que pode ser empregada como precursora de hormônios esteroidais. Estudos relacionados ao efeito de composição de meio de cultivo, reguladores de crescimento e fatores físicos sobre o desenvolvimento e produção de alcalóides esteroidais tem sido relatados em algumas espécies de *Solanum* (El-Ashaal et al., 1999, Mutlu & Turker, 2008).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em folhas e frutos de *S. pseudocapsicum* em distintos estágios de desenvolvimento, assim como estudar o efeito de reguladores de crescimento e concentração de sacarose sobre a produção estes compostos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

No presente trabalho foram utilizados materiais oriundos de cinco plantas de *S. pseudocapsicum* com 2 anos de idade adquiridas da empresa Holambra (SP), mantidas em casa de vegetação na cidade de Caxias do Sul (Rio Grande do Sul, Brasil). Exsiccatas em triplicata destas plantas foram depositadas no Herbário na Universidade de Caxias do Sul (HEUCS).

Amostragem de órgãos vegetais de *S. pseudocapsicum*

Amostras de frutos e sementes em cinco diferentes estádios de maturação e de folhas classificadas por tamanho e posição na planta (apicais, medianas e basais) foram obtidas durante os meses de outubro 2006 a Fevereiro 2008. Um mínimo de três frutos ou folhas foram amostrados de cada uma das cinco plantas em estudo. As amostras foram

secas a 40°C em estufa (Biopar HW500) até estabilização do peso (matéria seca) e logo após foram maceradas utilizando nitrogênio líquido. O material vegetal em pó obtido foi armazenado em microtubos a -80°C até análise o momento de análise.

Instalação, manutenção e ensaios de cultivo *in vitro* de *S. pseudocapsicum*

Para os ensaios de cultivo *in vitro* em *Solanum pseudocapsicum*, foram utilizados ramos de matrizes mantidas em casa de vegetação, das quais, foram excisados segmentos nodais com cerca de 2 a 3 cm de comprimento da porção mediana. Estes explantes foram desinfestados utilizando etanol 70% por 2 minutos (sob agitação constante) seguidos de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,1% por 20 minutos. Após esse período, foram realizadas lavagens com água destilada sendo excisados os segmentos nodais com uma gema e inoculados verticalmente em meio de cultivo.

O meio de cultivo utilizado para todos os experimentos foi o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) pH 5.8 contendo 0,7% (w/v) de ágar. Todos os ensaios de cultivo *in vitro* foram conduzidos em tubos de ensaio de 15 cm x 22mm com cerca de 5 mL de meio de cultivo por tubo. As culturas permaneceram em sala de crescimento sob a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16h e irradiância de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os desenhos experimentais foi em blocos casualizados utilizando de 20 explantes por tratamento.

Para avaliação do efeito da concentração de benziladenina (BA) e sacarose, os segmentos nodais foram inoculados em meio de cultivo MS contendo 0; 2,2; 4,4; 8,9; 17,8 μM de BA combinadas com sacarose nas concentrações (3, 5, 8%) totalizando 15 tratamentos.

O efeito da combinação citocinina-auxina foi avaliado em ensaio realizado em

meio MS suplementado com BA nas concentrações 0 e 2,22 μM combinadas com as auxinas ácido indol-butírico -IBA (0, 0,49, 2,46 e 4,92 μM , ácido indol-acético -IAA (0,57, 2,85, 5,71 μM) e ácido naftalenacético -NAA(0,54; 2,68, 5,37 μM).

Após 30 dias de cultivo nas condições acima descritas foram avaliados o número de brotos, gemas e raízes, e o peso fresco e seco da parte aérea e radicular. Após secagem as partes aéreas e radiculares das 20 plântulas de cada tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido e devidamente armazenados em microtubos a -80°C .

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

Extração e quantificação de alcalóides esteroidais

Os alcalóides esteroidais foram determinados pelo método espectrofotométrico descrito por Birner (1969) com algumas modificações: 10 mg (peso seco) de material vegetal foram extraídos por 30 min a 70°C com 1ml de metanol (95%). As amostras foram centrifugadas por 5 min a 14000xg e alíquotas de 0,5 ml do sobrenadante foram secas a 70°C (extrato metanólico seco). Amostras secas foram ressuspendidas em 150 μL de HCl 1M e hidrolisadas permanecendo em banho maria por 1h a 100°C . As amostras foram neutralizadas com 150 μL de NaOH 1M, sendo acidificadas com 100 μL de HCl 1M. Seu volume foi ajustado para 1ml utilizando água deionizada. Esse extrato bruto hidrolisado (HCE) foi conservado a -80°C .

Para a determinação dos alcalóides esteroidais, 250 μL of HCE foram misturados a 250 μL de HCl (5M), 500 μL de tampão acetato a 2.5 M e pH 4.7 e 100 μL de solução Laranja de Metila (0.05%). As amostras foram centrifugadas por 7 min, e 500 μL do sobrenadante foram misturados por 3 min com 500 μL de clorofórmio. A fração clorofórmica foi coletadas e a fração aquosa re-extraída com 600 μL de

clorofórmio. As duas frações foram misturadas e a sua absorvância determinada a 420nm em espectrofotômetro Biospectro SP220. A conteúdo de alcalóides esteroidais foi determinado comparando os valores com uma curva de calibração de solasodina (0 a 120 µgOs dados foram expressos em µg.g⁻¹ de equivalentes de solasodina (EqS).

Extração e quantificação dos compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais, foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteau (Singleton & Rossi, 1965), modificado: 50 mg (peso seco) de material vegetal foram extraídos por 5 min com 10 ml de etanol. Dessa solução foram coletados 0.5ml, acrescidos de 2.5ml de reagente de Folin-Ciocalteau e 2ml de carbonato de sódio a 7.5%. As amostras foram incubadas por 5 min a 50°C, resfriadas a temperatura ambiente e centrifugadas por 3 min a 13000xg. A absorvância da fração líquida foi determinada a 760 nm em espectrofotômetro Biospectro SP220. Uma curva de calibração de ácido gálico foi utilizada para quantificação dos fenóis totais. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mgEqAG.g⁻¹).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantificação de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em *S. pseudocapsicum*

O conteúdo de alcalóides esteroidais e fenóis totais foi avaliado em frutos em cinco estágios de maturação e em folhas coletadas em três posições ao longo dos ramos. Na Figura 1 pode ser visualizado o aspecto dos frutos imaturos (Fig. 1A) -frutos de coloração clara com aproximadamente 1 cm de diâmetro coletados logo após a abertura da cápsula, dos frutos verdes (Fig. 1B) -frutos de coloração verde intensa com

aproximadamente 1 cm, dos frutos em início de maturação (Fig. 1C) -frutos amarelos com 1,2 cm, dos frutos em fase intermediária de maturação (Fig. 1D) -frutos de coloração laranja com 1,3 cm e dos frutos maduros (Fig. 1E) – frutos de coloração vermelha com 1,5 cm, assim como das folhas apicais (Fig 1F), medianas (Fig. 1G) e basais (Fig. 1H) de *S. pseudocapsicum*.



Figura 1. Frutos em estádios de maturação: A, B, C, D e E e zonas de inserção foliar de apical (F), mediana (G) e basal (H) em *S. pseudocapsicum*.

Os resultados obtidos (Tabela 1) permitiram evidenciar significativa variação no conteúdo de alcalóides esteroidais nos distintos estágios de maturação do fruto, assim como entre folhas colatadas em diferentes posições ao longo dos ramos. De um modo geral, as folhas apresentaram maior quantidade de alcalóides esteroidais, com valores que variaram em média de $8.74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de material vegetal, contra apenas $1,14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ nas

duas estruturas dos frutos avaliadas (Tabela 1). Nas amostras foliares foi observada uma redução gradativa do conteúdo de alcalóides conforme a maturação da folha. Da mesma forma, o maior conteúdo de alcalóides em sementes e pele de frutos foi observado na fase inicial de frutos esbranquiçados (Fig 1A), decaindo e estabilizando em teores de aproximadamente $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na pele e reduzindo gradativamente até $0,26 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ nas sementes (Tabela 1). As variações evidenciadas corroboram conclusões obtidas em batata (*S. tuberosum*) na qual altas concentrações de glicoalcalóides foram frequentemente associadas com tecidos com elevada atividade metabólica (Schreiber, 1966; Jadhav et al., 1973; Jadhav & Salunkhe, 1975).

Tabela 1. Conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos (média \pm desvio) em folhas apicais, medianas e basais e frutos de *S. pseudocapsicum* em cinco estádios de maturação .

Material Vegetal	Alcalóides Esteroidais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de EqS)	Compostos Fenólicos (mg EqAG/g)
Apicais	$10,76 \pm 0,34^a$	$2,00 \pm 0,68^a$
Medianas	$9,97 \pm 0,17^a$	$2,30 \pm 0,31^a$
Basais	$5,36 \pm 0,67^b$	$2,08 \pm 0,00^a$
Pele de fruto (1)	$2,66 \pm 0,20^a$	$0,82 \pm 0,06^a$
Pele de fruto (2)	$0,96 \pm 0,21^b$	$0,73 \pm 0,04^a$
Pele de fruto (3)	$1,0 \pm 0,18^b$	$0,77 \pm 0,07^a$
Pele de fruto (4)	$1,04 \pm 0,32^b$	$0,73 \pm 0,09^a$
Pele de fruto (5)	$1,23 \pm 0,25^{ab}$	$0,55 \pm 0,01^a$
Semente (1)	$1,98 \pm 0,32^a$	$0,72 \pm 0,12^a$
Semente (2)	$0,58 \pm 0,09^b$	$0,62 \pm 0,04^a$
Semente (3)	$0,42 \pm 0,05^b$	$0,68 \pm 0,05^a$
Semente (4)	$0,26 \pm 0,00^b$	$0,82 \pm 0,04^a$
Semente (5)	$0,26 \pm 0,20^b$	$0,70 \pm 0,06^a$

* Valores seguidos da mesma letra, para cada parte da planta analisada, não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey $P \leq 0.05$.

De um modo geral, os resultados obtidos apóiam as observações de Vijayan et al. (2004) que evidenciaram maior atividade citotóxica e anti-tumoral em extratos foliares do que em extratos de frutos, raízes, sementes e caules de *S. pseudocapsicum*, e de Badami et al. (2003, 2005) que constataram elevada concentração de alcalóides, glicosídeos, taninos e flavonóides em folhas desta espécie. Por outro lado, Aliero et al (2005) avaliando somente frutos, identificaram em *S. pseudocapsicum* uma predominância da presença de alcalóides, hidrocarbonetos, ácidos graxos, álcoois e derivados de ácidos carboxílicos assim como a presença de componentes como a dopamina e fluoxetina potentes psicoestimuladores em humanos.

Alguns alcalóides esteroidais com atividade anti-tumoral encontrados em partes aéreas de *S. pseudocapsicum* tem sido identificados como solanocapsina, solacasina, solacapina, episolacapina, isosolacapina e O-metilsolanocapsina (Chacravarty et al, 1984), com grande predominância do primeiro (Andrade et al., 2010).

S. pseudocapsicum, normalmente é classificada como planta tóxica devido à presença do alcalóide esteroideal solanocapsina. Os dados aqui apresentados permitiram identificar órgãos vegetais e os picos de maior concentração de alcalóides que permitem explicar as variações observadas no grau de intoxicação de animais e do homem na ingestão de partes aéreas de *S. pseudocapsicum* (Friedman & McDonald, 1997; Parisi & Farancia, 2000; Watson et al., 2004).

Quanto aos compostos fenólicos foi possível detectar maior conteúdo nas folhas do que na pele dos frutos e sementes, não apresentando grandes alterações ao longo do processo de maturação destes órgãos. Estes resultados diferem daqueles obtidos em outras espécies vegetais, nas quais o conteúdo de fenóis depende do estágio de desenvolvimento da plantas, sendo esta maior em folhas jovens com evidente

decaimento durante a maturação das mesmas (Lavola et al., 1998; Zeier, 2005; Manetas, 2006). Esta discrepância pode ser atribuída a diferenças no comportamento de *S. pseudocapsicum*, ou a fatores bióticos e abióticos que sabidamente interferem na produção de fenóis.

Efeito de reguladores de crescimento e concentração de sacarose sobre a produção de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos em cultivo *in vitro* de *S. pseudocapsicum*.

Plântulas obtidas por cultivo *in vitro* em meio MS contendo distintas concentrações de BA e de sacarose apresentaram variação quanto ao acúmulo de alcalóides esteroidais (Fig. 2). Na presença de 3 e 5% de sacarose as plântulas exibiram aumento do conteúdo de alcalóides com o incremento da concentração de BA atingindo valor máximo na presença de 4,4 μM de BA e decréscimo em concentrações maiores desta citocinina. O aumento do conteúdo de alcalóides esteroidais acompanhou o aumento na produção de massa vegetal, resultado que apóia as evidenciadas de que altas concentrações de glicoalcalóides estão associadas com tecidos com elevada atividade metabólica (Schreiber, 1966; Jadhav et al., 1973; Jadhav & Salunkhe, 1975). Estímulo à produção de solasodina por BA foi relatado em cultura de calos de *S. aviculare*, com concentrações máximas em meio contendo 5% de sacarose e 4,4 μM de BA (Kittipongpatana et al., 1998).

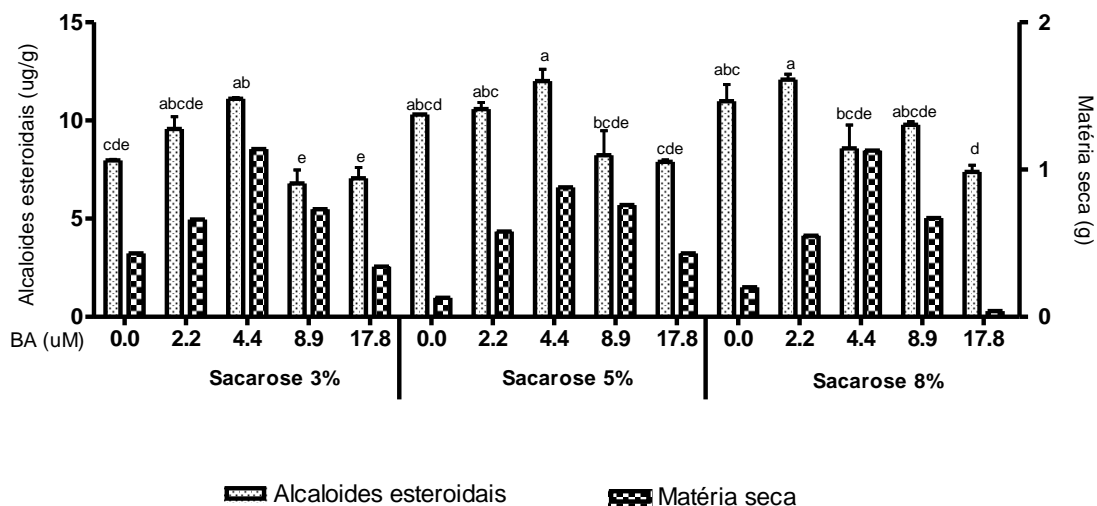


Figura 2. Efeito de benziladenina e sacarose no acúmulo de alcalóides esteroidais em plântulas *in vitro* de *S. pseudocapsicum*. Médias com a mesma letra não diferem significativamente a $P \leq 0.05$ de acordo com o teste de Tukey (Média \pm DP, $n = 20$).

Na ausência ou na presença de 2,2 μM de BA o conteúdo de alcalóides esteroidais aumentou com incremento da concentração de sacarose. Já em meio contendo 8% de sacarose, o maior conteúdo de alcalóides esteroidais foi observado em 2,2 μM de BA com significativo decréscimo em concentrações maiores, não havendo uma relação direta com a produção de massa vegetal. Efeito da concentração de sacarose tem sido relatado na produção da saponina esteroidal espirostanol em culturas celulares de *S. chrysotrichum* (Villareal et al., 1997), na produção de antraquinona em células em suspensão de *Melaleuca elliptica* (Collin, 2001) e na produção de alcalóides indólicos em culturas de calos de *Catharantus roseus* (Zhao et al., 2001).

O conteúdo de alcalóides esteroidais em 3 e 5% de sacarose com 4,4 μM de BA e em 8% de sacarose com 2,2 μM de BA (Fig. 2) foi significativamente superior àquele

observado em folhas jovens de plantas de *S. pseudocapsicum* (Tabela 1), confirmando o estímulo da BA no metabolismo de alcalóides esteroidais.

No que se refere a compostos fenólicos, estes variaram entre 0,43 e 1,14 mg EqGA.g⁻¹, porém sem claro efeito da presença ou concentração de BA ou sacarose. De um modo geral, o conteúdo de fenóis totais em cultivos *in vitro* foi inferior àquele obtido em folhas colhidas de plantas de *S. pseudocapsicum* (1,53 mg EqGA.g⁻¹)

Conforme pode ser observado na Figura 3, de um modo geral, a presença de auxinas no meio de cultivo levou a redução no conteúdo de alcalóides esteroidais, independente da concentração estes reguladores. Entre as auxinas avaliadas, os maiores conteúdos de alcalóides foram verificados na presença de IAA e NAA. Interação negativa citocinina-auxina foi evidenciada tanto na produção de biomassa quanto no acúmulo de alcalóides esteroidais. A redução de biomassa e alcalóides foi acompanhada por aumento na produção de calos basais nos tratamentos com citocinina-auxina, indicando a importância do metabolismo foliar e desenvolvimento de cloroplastos na produção de alcalóides (Zhao et al., 2001).

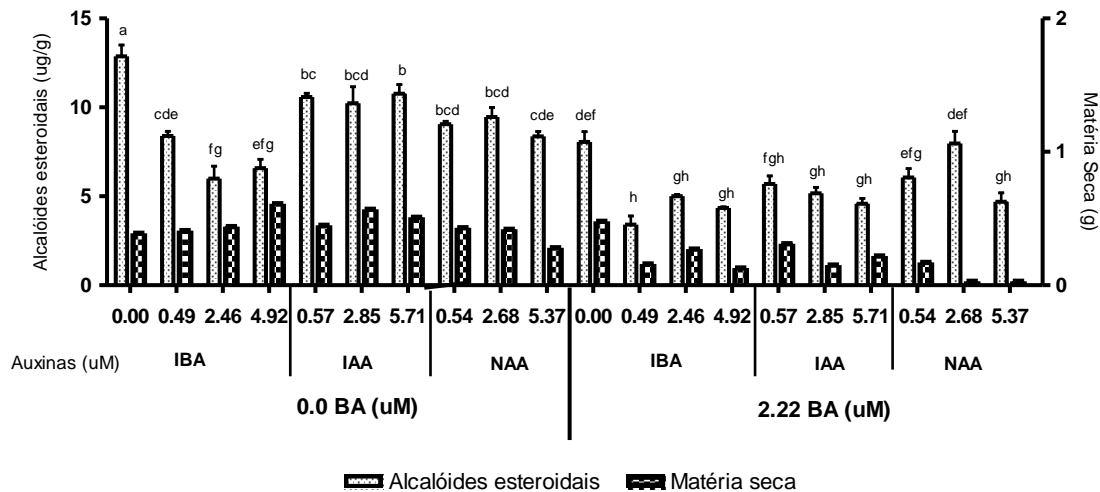


Figura 3. Efeito de auxinas e interação auxina-citocinina na produção de alcalóides esteroidais em plântulas *in vitro* de *S. pseudocapsicum*. Médias com a mesma letra não diferem significativamente a $P \leq 0.05$ de acordo com o teste de Tukey (Média \pm DP, $n = 20$).

O conteúdo de alcalóides em raízes de plântulas *in vitro* de *S. pseudocapsicum* (Tabela 2) foi significativamente inferior àquele das partes aéreas correspondentes (Fig. 3), com valores entre 1.09 e 6.68 $\mu\text{gEqS}\cdot\text{g}^{-1}$. A adição de auxinas estimulou a produção de raízes, com conseqüente aumento da biomassa radicular. Diferente do observado na parte aérea (Fig. 3), a adição de IBA em concentrações de 2.46 e 4.92 μM estimulou a produção de alcalóides nas raízes, fato não evidenciado na presença das outras auxinas avaliadas (Tabela 2).

Estudos realizados *in vitro* com distintas espécies do gênero *Solanum* indicam grande variação na resposta a reguladores de crescimento, tanto no desenvolvimento vegetal quanto na síntese de alcalóides esteroidais. Neste sentido, Bhatt et al. (2008) relataram efeito estimulante do IAA e da sacarose na produção de solasodina em culturas de *S. nigrum*, e Yogananth et al. (2009) obtiveram altas concentrações deste

glicoalcalóide em meios contendo combinações de auxinas e citocininas. Resultados semelhantes foram relatados em *S. jasmoides* e *S. verbascifolium* (Jain et al., 1995), *S. khasianum* (Bhalsing, 2000) e *S. platifolium* (Jaggi & Singh, 2001).

Tabela 2. Efeito de auxinas na concentração de alcalóides esteroidais em raízes de cultivos *in vitro* de *S. pseudocapsicum*.

BA (μM)	Dosagens de Auxinas (μM)	N	Matéria seca (g)	Alcalóides esteroidais (μg.g ⁻¹ de EqS)	
0	-	0	20	0.12	2.98 ± 0.19 ^{bcd}
		0.49	20	0.18	1.36 ± 0.46 ^{ef}
	IBA	2.46	20	0.21	6.68 ± 0.16 ^a
		4.92	20	0.25	4.16 ± 0.05 ^b
		0.57	20	0.33	2.32 ± 0.12 ^{def}
	IAA	2.85	20	0.50	1.68 ± 0.00 ^{ef}
		5.71	20	0.54	2.58 ± 0.34 ^{cde}
		0.54	20	0.13	3.57 ± 0.70 ^{bc}
	NAA	2.68	20	0.26	1.09 ± 0.18 ^f
		5.37	18	0.28	1.09 ± 0.00 ^f

* Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey P ≤ 0.05.

Quanto a produção de compostos fenólicos não foi observada variação significativa nas duas partes da planta analisadas (parte aérea e radicular) nas distintas auxinas e combinação auxinas-BA, apresentando valores médios de 0.54 ± 0.02 a 1.48 ± 0.01 mgEqGA.g⁻¹ para partes aéreas e de 0.61 ± 0.01 a 1.19 ± 0. mgEqGA.g⁻¹ para raízes.

REFERÊNCIAS

- Aberoumand, A. (2008). Comparison of protein values from seven wild edible plants from Iran. **Afr. J. Food Sci.** 2: 73-76.
- Aliero, A.A.; Grierson, D.S.;Afolayan, A.J. (2005). Chemical and nutrient characterization of *Solanum pseudocapsicum* berries. **Afr. J. Biothec.** 4: 1300-1303.
- Andrade, L.B.; Agostini, F.; Heinzen, H.; Echeverrigaray, S. (2010) A survey of steroid alkaloids and phenolic content in *Solanum* species form South Brazil. **Braz. J. Pharmacogn.** (submetido).
- Badami,S. ; Reddy, M.S.A; Kumor, E.P.; Vijayan, P.; Suresh, B. (2003). Antitumor activity of total alkaloids fraction of *Solanum pseudocapsicum* leaves. **Phytoh. Res.** 17: 1001-1004.
- Badami, S.; Prakash, O. ; Dongre, S.H.; Suresh, B. (2005). *In vitro* antioxidant properties of *Solanum pseudocapsicum* leaf extracts. **Ind. J. Pharmac.** 37: 251-252.
- Batten, A.; Bokelmann, H. (1966). Wild flowers of the Eastern Cape Province. Cape and Transvaal Printers Limited, Cape Town, 1128-1129.
- Bhalsing, S.R. (2000). Regeneration and heavy formation in some medicinally important members of family solanaceae In: Advances of Tissue culture in Medicinal plant. (Eds. Singh, R.P. and Jainwal, PK), 253-257.
- Bhat, M.A.; Ahmad, S.; Aslam, J.; Mujib, A.; Mahmooduzzfar. (2008). Salinity stress enhances production of solasodine in *Solanum nigrum L.* **Chem. Pharm. Bull.** 56: 17-21.
- Boericke, W. (1927). Pocket Manual of Homeopathic, Materia Medica. 9th Edn,

- Boericke and Runyon, New York, NY. 598.
- Birner, J. (1969) A method for the determination of total steroid bases, **J. Pharm. Sci.** 58:258-259.
- Chakravarty, A.K.; Das, B.; Ali, E.; Pakrashi S.C. (1984) Studies in Indian medicinal plants. Part 77. Structure and stereochemistry of some new steroidal alkaloids from *Solanum pseudocapsicum* and *Solanum giganteum* by nuclear magnetic spectroscopy. **J. Chem. Soc. Perkin Trans-1**, 467-474..
- Chandler, S.F.; Doods, J.H. (1983). The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasodine in callus cultures. **Plant Cell Rep.** 2:205-208.
- Collin, H.A. (2001) Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regul.** 34: 119-134.
- El-Ashaal, H.A.; Ghanem, S.A.; Melek, F.R.; Kohail, M.A.; Hilal, S.H. (1999). Alkaloid production from regenerated *Solanum* plants. **Fitoterapia** 70: 407-411.
- Friedman, M.; McDonald, G.M.(1997) Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety and plant physiology. **Crit. Rev. Plant Sci.** 16: 55-132.
- Jacob, A.; Malpathak, N. (2005). Manipulation of MS and B5 components for enhanced growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 80: 247-257.
- Jadhav, S.J.; Salunkhe, D.K. (1975). Formation and control of chlorophyll and glycoalkaloids in tubers of *Solanum tuberosum* and evaluation of glycoalkaloid toxicity. **Adv. Food Res.** 21:307-354.
- Jadhav, S.J.; Salunkhe, D.K.; Wyse, R.E.; Dalvi, R.R. (1973). *Solanum* alkaloids Biosynthesis and inhibition by chemicals. **J. Food Sci.** 38: 453-455.

- Jaggi, R.K.; Singh, J. (2001). Solasodine production in culture of *Solanum platonifolium*. **J. Med. Arom. Plant Sci.** 22: 192-200.
- Jain, S.C.; Sahoo, S.L.; Vijayvergia, R. (1995). Influence of light on growth and production of steroids and glycoalkaloids in solanum species in vivo and in vitro. **Ind. J. Pharm. Sci.** 57: 100-101.
- Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.** 37: 3954-3962.
- Kittipongpatana, N.; Hock, R.S.; Porter, J.R. (1998). Production of Solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 52: 133-143.
- Lavola, A.; Julkunen-Tiitto, R.; Roininen, H.; Aphalo, P.; (1998). Host-plant preference of an insect herbivore mediated by UV-B and CO₂ in relation to plant secondary metabolites. **Biochem. Syst. Ecol.** 26, 1-12.
- Manach, C.; Mazur, A. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Rev. 97 bioavailability studies, **Am. J. Clin. Nutr.** 81: 230S-242S.
- Manetas, Y. (2006). Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red. **Flora.** 201:163–177.
- Middleton, E.J.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharm. Rev.** 52: 673-751.
- Mitscher, L.A., Juvakar, J.V., Beal, J. L. (1976) Solanocapsine, a new steroidal alkaloid from *Solanum pseudocapsicum* possessing antimicrobial activity. **Experientia,** 32: 415.

- Mutlu, E.C; Turker, A.U. (2008) Efficient plant regeneration of bitterweet (*Solanum dulcamara* L.) a medicinal plant. **Act. Soc. Bot. Pol.** 77: 275-280.
- Murashige, T.; Skoog, F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Parisi, P.; Francia, A. (2000). A female with central anticholinergic syndrome responsive to neostigmine. **Paediatric Neurol.** 23: 185-18.
- Puupponen-Pimia, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kahkonen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K.M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **J. Appl. Microbiol.** 90: 494-507.
- Ribeiro, S.R.; Fortes, C.C.; Oliveira, S.C.C.; Castro, C.F.S. (2007). Avaliação da atividade de *Solanum paniculatum* (Solanaceae). **Arq. Ciên. Saúde Unipar;** Umuarama, 11, n°3,p. 179-183.
- Roesler, J. (2007). Important role of corticosteroids in cronic granulomatous disease. **J. Med. Microbiol** 56: 1253.
- Rout, G.R.; Samantaray, S.; Das, P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotech. Adv.** 18: 91-120.
- Sarin, R.(2005) Useful Metabolites from Plant Tissue Cultures. **Biotechnology** 4(2):79-93.
- Schreiber, K. (1966). Biochemistry of steroidal alkaloids. Abh. Dtsch. Akad. Wiss, Berlin, KI. **Chem. Geol. Biol.**, 3:65-91.
- Shrishailappa, B.; Reddy, S.A.M.; Kumar, E.D.P.; Vijayan, P.; Suresh, B. (2003). Anti tumour activity of total Alkaloid fracton of *Solanum pseudocapsicum*. **Phytotherapy** 17: 1001-1004.
- Singleton, V.L.& Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-posphotungustic acid reagent. **Am. J. Enol. Vit.** 16, 144.

- Van Den Berghe, D.A.; Ieven, M.; Mertens, F.; Vlietinck, A.J.; Lammens, E. (1987). Screening of higher plants for biological activities-11. Antiviral activity. **J. Natl. Prod.**, 11: 463-467.
- Verpoorte, R.; Contin, A.; Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochem. Rev.** 1: 13-25.
- Vijayan, P.; Kumar, V. S.; Preethi, V.; Dhanaraj, S.A.; Shrishailappa, B.; Suresh, B. (2002). *In vitro* cytotoxicity and anti-tumor properties of the total alkaloid fraction of unripe fruits of *Solanum pseudocapsicum*. **Pharm. Biol.** 40: 456-460.
- Vijayan,P.;Kumar, V.S.;Dhararaj, S.A., Badami,S.;Suresh, B. (2003) Hepatoprotective effect of the total alkaloid fraction of *S. pseudocapsicum* leaves. **Pharm. Biol.** 40: 456-460.
- Vijayan, P.; Vijayaraj, P.; Setty, P.H.C.; Hariharapura, R.C.; Godavarthi, A.; Badami,S.; Arumugam, D. S.; Bhojraj, S. (2004).The cytotoxic activity of the total alkaloids isolated from different parts of *Solanum pseudocapsicum*. **Biol. Pharm. Bull.** 27: 528-530.
- Villareal, M.L; Arias C.; Feria-Velasco, A.; Ramírez, O.T.; Quintero, R. (1997). Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* (Schldl.) - A plant producing an antifungal spirostanol saponin. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 50: 39-44.
- Watson, W.A.; Litovitz, T.L.; Klein-Schwartz, W. (2004). Annual report of the American Association of Poison Control Centers and Toxic Exposure Surveillance System. **Am. J. Emerg. Med.** 22: 335-404.
- Yogananth, N.; Bhakayaraj, R.; Chanthuru, S.; Palanivel, S. (2009). Comparative analysis of solasodine from in vitro and in vivo cultures of *Solanum nigrum* Linn. Kathmandu University **J. Sci. Eng. Techn.** 5: I 99-103.

- Zhao, J.; Zhu, Wei-Hua.; Hu, Q.; He, Xing-Wang. (2001). Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. **Plant Growth Regul.** 33: 33-41.
- Zeier, J. (2005). Age-dependent variations of local and systemic defense responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Molec. Plant Path.* 66: 30-39.

CAPÍTULO 4

Produção de alcalóides esteroidas em plantas regeneradas de *Solanum pseudocapsicum* L. transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834.

Produção de alcalóides esteroidas em plantas regeneradas de *Solanum pseudocapsicum* L. transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834.

Luciana Bavaresco ANDRADE^{*a}, Débora MONTEZANO^a , Alejandro Ruiz DIAZ^b, Horácio HEINZEN^b, Sergio ECHEVERRIGARAY^{*a}

^a Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, R. Francisco Getúlio Vargas 1130; 95001-970; Caxias do Sul, RS, Brasil ^b Departamento de Farmacognosia, Universidad de la República Federativa de Uruguay, Montevideo, Uruguay.

RESUMO

Raízes pilosas foram obtidas por co-cultivo de *A. tumefaciens* ATCC15834 sobre fragmentos internodais de *S. pseudocapsicum*. Plantas regenerantes surgiram de forma espontânea. Em casa de vegetação os transformantes exibiram redução de porte, aumento do número de ramos e do peso radicular e folhas pequenas e enrugadas. Análise de extratos de partes aéreas e raízes de plantas transformantes mostraram conteúdo médio de alcalóides esteroidais semelhante a plantas não transformadas. Entretanto, plantas derivadas de um evento de transformação exibiram um aumento significativo de 59,7% no conteúdo de alcalóides na parte aérea em relação aos mesmos tecidos de plantas não-transformadas. Os perfis cromatográficos e análises de NMR permitiram evidenciar a presença de solanocapsina como alcalóide majoritário, assim como alterações no padrão de substituições no anel esteroidal em plantas transformantes, indicando que as alterações decorrentes da transformação afetam direta ou indiretamente o processo de ciclização.

Palavras chave: *Solanum pseudocapsicum*, *Agrobacterium rhizogenes*, plantas transformantes, alcalóides esteroidais, solanocapsina.

INTRODUÇÃO

Solanum pseudocapsicum (Família – Solanaceae) conhecida mundialmente como “Jerusalem Cherry”, é uma planta ornamental normalmente cultivada em interiores (Aliero et al., 2005), a qual tem despertado interesse mundial por apresentar atividade antitumoral, anti-viral, hepatoprotetora, antimicrobiana, anti-hipertensiva, antiespasmódica, anticancerígena e antioxidante (Mitscher et al., 1976, Van Den Berghe et al., 1987, Shrishailappa et al., 2003, Vijayan et al, 2002, 2003, 2004, Badami et al, 2005) associada a presença de alcalóides esteroidais.

O gênero *Solanum*, segundo (Porter 1991), possui alta suscetibilidade a infecção por *Agrobacterium*. Rico na produção de glicoalcalóides esteroidais, esse gênero, tem sido alvo de diversos estudos quanto à produção desse importante grupo de metabólitos secundários com potencial na síntese de hormônios esteroidais, incluindo o uso de raízes transformadas via *A. rhizogenes* devido a elevada estabilidade genética e bioquímica e a possibilidade de produção de compostos fitoquímicos em sistemas controlados (Georgiev et al. 2007), Nestes sentido, várias espécies do gênero *Solanum* tem sido infectadas via *Agrobacterium rhizogenes* visando a produção de raízes transformadas e estudo da composição e produção de seus alcalóides esteroidais. Entre estas cabe citar, os trabalhos desenvolvidos como *S. aviculare*, *S. khasianum*, *S. surrattense* e *Solanum nigrum* (Kittipongpatana et al 1998; Argolo et al, 2000; Jacob & Malpathak, 2004, 2005). Por outro lado, poucos trabalhos tem sido realizados no sentido de avaliar a produção de alcalóides em plantas transformantes (Subroto et al., 2007).

Plantas regeneradas de raízes pilosas obtidas por transformação com *A. rhizogenes* apresentam fenótipos alterados caracterizados por folhas com diferentes

graus de enrugamento e pela redução de dominância apical, e consequente, aumento no número de ramos (Tepfer e Casse-Delbart, 1987). Estas alterações são decorrentes do aumento da produção endôgena de ácido indolacético por parte dos genes presentes na região T do plasmídeo Ri bacteriano transferida para as células vegetais (Gaudin e Jouanin, 1995). Dependendo do sítio de inserção da região T no genoma vegetal, pode ocorrer inativação insercional de genes vegetais e/ou expressão diferencial dos genes de produção de auxinas (Hamill, 1993). Além de características morfológicas, o aumento da concentração endogena de auxinas afeta tanto o metabolismo da planta (Echeverrigaray, 1995), podendo aumentar ou diminuir rotas metabólicas específicas, fato que justifica a avaliação de plantas regeneradas.

Até o presente momento não se tem registro da transformação de *S. pseudocapsicum* via *A. rhizogenes*. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi a transformação de *S. pseudocapsicum* utilizando uma cepa altamente virulenta de *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC 15834), a regeneração de plantas transformadas e a avaliação da produção de alcalóides esteroidais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Plantas de *S. pseudocapsicum* adultas (2 anos) (SAC Velling Holambra) mantidas em casa de vegetação em Caxias do Sul (Rio Grande do Sul, Brasil) foram utilizadas como matrizes para introdução da espécie no cultivo *in vitro*. Segmentos nodais com 2 a 3 cm de comprimento foram coletados durante a primavera e submetidos a desinfestação superficial com álcool 70% (2 min) e hipoclorito de sódio 0,1% (20min). Após, lavagens com água destilada e os segmentos nodais foram

dissecados e implantados verticalmente ao meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) sem adição de hormônio e cultivados sob fotoperíodo de 16h em sala de crescimento $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com e irradiância de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Linhagem bacteriana

Para a transformação genética de *S. pseudocapsicum* foi utilizada a linhagem ATCC 15834 de *Agrobacterium rhizogenes* (produtora de agropina e isopreno). A bactéria foi mantida e multiplicada em placas com meio MYA (manitol 0,8%, sulfato de amônio 0,2%, extrato de levedura 0,5%, caseína hidrolizada 0,05% e NaCl 0,5%, ágar 0,7%, pH 6,6) de acordo com Tepfer e Casse-Delbart (1987).

Transformação de *S. pseudocapsicum*

Para a transformação a linhagem bacteriana *A. rhizogenes* ATCC 15834 foi crescida em 5ml de meio MYA líquido sob agitação constante por 16 horas a 28°C . Após esse período, as mesmas foram centrifugadas e ressuspensas com solução salina 0,9% ajustando a densidade óptica para 0.5 em 600nm, correspondente a 10^7 bactérias/ml.

Segmentos internodais com 1,5 cm obtidos da porção mediana de plântulas *in vitro* de *S. pseudocapsicum* foram seccionados e colocados em posição invertidas em tubos de ensaio de contendo 10ml de ágar 0,7%. Estes segmentos foram inoculados com 0,5 μL da suspensão bacteriana (aprox. 5×10^3 bactérias), retirando-se imediatamente o excesso. Os segmentos inoculados foram incubados no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48h. Após este período, o explantes foram transferidos para tubos contendo meio MS acrescido de 200mg/L de cefotaxima, permanecendo no escuro por 40 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

As raízes pilosas típicas foram transferidas individualmente para placas Petri

com meio MS com 200 mg/L de cefotaxima e crescidas no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Repiques foram realizados em intervalos de 30 dias..

Regeneração e aclimatização de plantas transformantes

Plântulas oriundas de regeneração espontânea de raízes transformadas foram seccionadas em fragmentos nodais com uma gema axilar e transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento. Concomitantemente, segmentos nodais de plântulas micropropagadas de *S. pseudocapsicum* foram transferidos para o mesmo meio de cultivo a fim de serem utilizadas como controles. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16h em sala de crescimento $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com e irradiância de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 40 dias, as plântulas já enraizadas foram transferidas para caixas plásticas contendo casca de arroz carbonizada. As plântulas permaneceram por 7 dias com a tampa fechada e mais 7 dias com a tampa semi-aberta. Após esse período, as plântulas aclimatadas foram transferidas para vasos com 1kg de terra esterilizada e cultivadas em casa de vegetação no Instituto de Biotecnologia/UCS. Plantas com 40 dias foram retiradas dos vasos, lavadas, pesadas, secas a 40°C e conservadas a -80°C para posterior análise de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos.

Extração e quantificação de alcalóides esteroidais

Os alcalóides esteroidais foram determinados pelo método espectrofotométrico descrito por Birner (1969) com algumas modificações: 10 mg (peso seco) de material vegetal foram extraídos por 30 min a 70°C com 1ml de metanol (95%). As amostras foram centrifugadas por 5 min a $14000\times g$ e alíquotas de 0,5 ml do sobrenadante foram secas a 70°C (extrato metanólico seco). Amostras secas foram ressuspendidas em 150

μL de HCl 1M e hidrolisadas permanecendo em banho maria por 1h a 100°C . As amostras foram neutralizadas com $150 \mu\text{L}$ de NaOH 1M, sendo acidificadas com $100 \mu\text{L}$ de HCl 1M. Seu volume foi ajustado para 1ml utilizando água deionizada. Esse extrato bruto hidrolisado (HCE) foi conservado a -80°C .

Para a determinação dos alcalóides esteroidais, $250 \mu\text{L}$ of HCE foram misturados a $250 \mu\text{L}$ de HCl (5M), $500 \mu\text{L}$ de tampão acetato a 2.5 M e pH 4.7 e $100 \mu\text{L}$ de solução Laranja de Metila (0.05%). As amostras foram centrifugadas por 7 min, e $500 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram misturados por 3 min com $500 \mu\text{L}$ de clorofórmio. A fração clorofórmica foi coletadas e a fração aquosa re-extraída com $600 \mu\text{L}$ de clorofórmio. As duas frações foram misturadas e a sua absorbância determinada a 420nm em espectrofotômetro Biospectro SP220. A conteúdo de alcalóides esteroidais foi determinado comparando os valores com uma curva de calibração de solasodina (0 a $120 \mu\text{g}$ Os dados foram expressos em equivalentes de solasodina ($\mu\text{gEqS.g}^{-1}$).

Análise de alcalóides por cromatografia de camada delgada (TLC)

Amostras de folhas (50 mg peso seco) foram adicionadas a 5 mL de ácido acético a 1% usando vareta de vidro. A vareta foi lavada com 1mL da solução de extração, eos tubos foram tampados e agitados em sonicador por 5 min. Os tubos foram centrifugados a (5000 g, 5 min) e a solução foi removida com pipeta Pasteur, e o resíduo foi re-extraído como anteriormente com 5mL de ácido acético 1%. Os extratos foram aplicados e pré-acondicionados em (3 x 3 mL de metanol) em cartuchos Sep-Pack C_{18} (Millipore, Milford, MA, USA). O cartucho foi lavado com 40 % de metanol aquoso (10 mL), e os alcalóides esteroidais foram diluídos com metanol (10 mL). Os

resíduos foram dissolvidos em 500 μL de metanol e a solução foi utilizada para a etapa de quantificação.

Alíquotas de 5 μL das soluções foram aplicadas em duplicata em placas de sílica gel (5 x 8 cm, Marchery-Nagel, Düren, Germany). A separação foi realizada em câmara de 17.5 x 11.0 x 6.2 cm (com tempo de saturação de 30 min), usando uma solução de clorofórmio, metanol e solução aquosa de amônia a 2% (70:30:5) como fase móvel. Após a separação, as placas foram secas com ar, pulverizadas com reagente de Dragendorff e secas novamente. As manchas foram visualizadas e digitalizadas dentro de um período de 30 min.

Análise por ressonância magnética nuclear (NMR)

Folhas secas em pó (2g) foram tratadas com 20 ml de hexano. Material vegetal foi extraído com 20 ml de metanol amoniacal por a temperatura ambiente, filtrados e secos a pressão reduzida. O pellet foi diluído em 20 ml de 2% de ácido acético e filtrado. A fração líquida foi extraída 2x com clorofórmio. A fase aquosa foi ajustada a pH 8 com 25% de amônia e extraída 2x com clorofórmio. A fase orgânica foi seca, dissolvida e percolada através da coluna de sílica gel utilizando clorofórmio-metanol (70:30). Dez frações foram coletadas e avaliados por TLC. A fração alcaloidal (Fração 4) foi posteriormente analisada. Os Espectros ^1H - NMR foram obtidos a 30°C e 400MHz usando o espectrômetro Bruker Avance DPX 400. Os sinais foram relatados em ppm, usando 2,3,3-trimetil-2-butanol (δ_{H} 0.00) como referência interna.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de transformação de segmentos nodais de *S. pseudocapsicum*

com *A. rhizogenes* ATCC 15834 resultaram na formação de raízes pilosas (Figura 1) iniciando após 10 dias de inoculação e atingindo 45% dos explantes após 40 dias de cultivo. O número de raízes por explante variou entre 2 e 10 raízes. Explantes não inoculados, utilizados como controle, não apresentaram formação de raízes.

Taxas de transformação frequentemente não são relatadas, no entanto, alguns dados dentro do gênero *Solanum* podem ser utilizados como parâmetro de comparação com espécie em estudo. Kittipongpatana et al (1998) relataram taxas de transformação de 90% em *S. aviculare* utilizando a linhagem ATCC 15834, porém os mesmos autores relatam que utilizando outras linhagens, como por exemplo para a ATCC 43057 e ATCC 11325, os resultados obtidos foram 43 e 20% respectivamente. Por outro lado, Pawar e Maheshwari (2004) obtiveram taxa de transformação de 20% em *S. surattense* utilizando as linhagens MTCC 2364 e MTCC 532. Resultados obtidos em *S. americanum* utilizando a mesma linhagem bacteriana e procedimento de transformação levaram a taxas de transformação de 50% (dados não apresentados).



Figura 1. Raízes pilosas em segmento nodal de *Solanum pseudocapsicum* após 40 dias de cultivo.

Apesar de plantas do gênero *Solanum* serem reconhecidamente suscetíveis a

transformação por *Agrobacterium*, a grande variabilidade quanto a porcentagem de transformação pode ser atribuída a dois fatores principais: (1) a espécie e linhagem bacteriana utilizada e (2) a base genética da espécie vegetal ou mesmo cultivar utilizado.

Raízes transformantes de *S. pseudocapsicum* (36 raízes) foram isoladas, transferidas para meio MS sem a adição de hormônios e cultivadas por 30 dias. Após este período foi constatado crescimento lento das raízes, quando comparadas com raízes transformadas de *S. americanum* e *L. esculentum*. Além disso, presença de regiões escurecidas, indicativas de processo oxidativo, foram verificadas. Visando resolver estes problemas, raízes transformantes foram transferidas para meio MS com 0,5M de polivinilpirrolidona (PVP40) suplementado com ácido indolacético e ácido indolbutírico nas concentrações de 0 a 0,5 mg/L. Após 30 dias, foi constatado significativo aumento no crescimento radicular e redução da oxidação na presença de auxinas exógenas e PVP, particularmente em MS com 0,1mg/L de IBA. Assim sendo, este meio foi utilizado nas repicagens subsequentes. Aumento da velocidade de crescimento de raízes transformadas na presença de baixas concentrações de auxina exógena foi observado por Pawar e Maheshwari (2004) em *Whitania somnifera* e *Solanum surattense*.

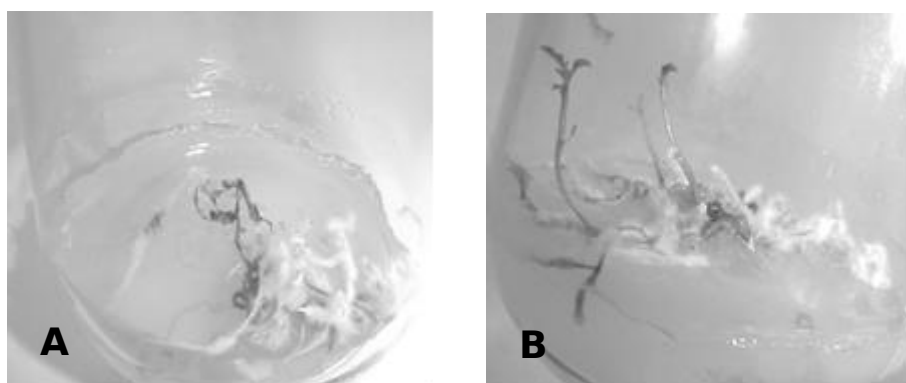


Figura 2. Raízes transformantes (A) e regeneração espontânea de plântulas (B) em *S. pseudocapsicum*.

Das 36 culturas de raízes transformantes, correspondentes a eventos de transformação independentes (Figura 2A), apenas quatro apresentaram regeneração espontânea de plântulas (11,1%) com média de 4,6 plântulas por cultura (Figura 2B).

Segmentos nodais das plântulas transformantes foram cultivados em meio MS sem adição de reguladores por 30 dias, obtendo-se 16 plântulas representativas dos quatro eventos de transformação com regeneração espontânea. Estas plantas, assim como plantas não transformantes com a mesma idade, foram aclimatadas e cultivadas em casa de vegetação por 40 dias. Conforme pode ser apreciado na Figura 3, as plantas transformantes exibiram as características típicas de regenerantes obtidos de raízes pilosas oriundas de transformação com *A. rhizogenes* (Tepfer e Casse-Delbart, 1987).

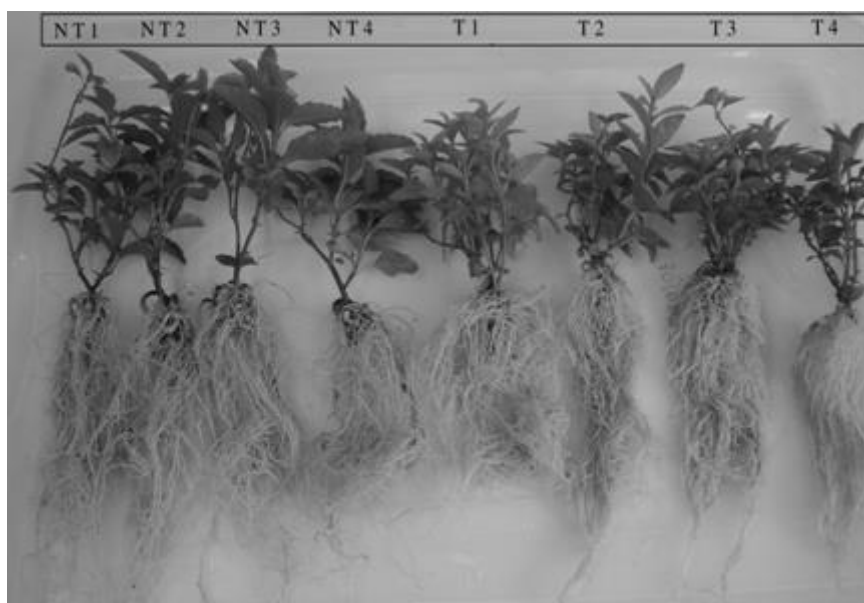


Figura 3. Aspecto geral de plantas controle (NT) e transformantes (T) de *S. pseudocapsicum*.

A quebra de dominância apical foi evidenciada pela redução de porte e pelo aumento no número de ramos, com média de 6,2 ramos em transformantes contra

apenas 2,3 ramos em plantas controle. Assim como enrugamento foliar e redução do tamanho de folhas de 6,2 x 2,9 cm para 2,5 x 1,6 cm em média para folhas completamente expandidas. As plantas transformantes e controles apresentaram massa aérea (peso seco) semelhante, $1,30 \pm 0,38\text{g/planta}$ e $1,62 \pm 0,31\text{g/planta}$, respectivamente. Porém, as plantas transformantes exibiram maior peso seco radicular com média de $2,44 \pm 0,28\text{ g/planta}$ contra apenas $1,42 \pm 0,34\text{ g/planta}$ nos controles.

De um modo geral, a avaliação do conteúdo de alcalóides esteroidais em parte aérea e e raízes de plantas transformantes e não-transformantes (Tabela 1) permitiu evidenciar maior acúmulo de alcalóides na parte aérea, diferindo dos resultados obtidos por Subroto et al. (2007) em *S. nigrum*. Considerando que transformantes e não-transformantes apresentam comportamento semelhante, esta discrepância pode ser atribuída a características da espécie em estudo.

O conteúdo de alcalóides esteroidais na parte aérea de plantas não-transformantes apresentou baixa variação com média de $11,43 \pm 0,64\ \mu\text{gSEq/g}^{-1}$, enquanto que plantas transformantes apresentaram média de $12,11 \pm 4,18\ \mu\text{gSEq/g}^{-1}$ (Tabela 1). Apenas uma das plantas transformantes (T2) exibiu conteúdo de alcalóides esteroidais significativamente superior às plantas controle. Variação na produção de alcalóides entre plantas transformantes tem sido evidenciada em outras espécies como *Atropa belladonna* (Aoki et al., 1997) e *S. nigrum* (Subroto et l., 2007). Tal variação pode ser atribuída a diferenças na produção de auxinas, decorrente de efeitos conformacionais nos locais de integração da região T, entre outros (Aoki et al., 1997, Curtis et al., 2000).

Tabela 1. Conteúdo de alcalóides esteroidais de parte aérea e raízes de plantas transformadas e não transformadas de *Solanum pseudocapsicum*.

<i>S. pseudocapsicum</i>	Alcalóides esteroidais ($\mu\text{g SEq/g}^{-1}$)	
	Parte Aérea	Raízes
Transformada (1)	$11,20 \pm 0,53^b$	$4,77 \pm 0,13^{ab}$
Transformada (2)	$18,26 \pm 2,47^a$	$5,89 \pm 0,37^{ab}$
Transformada (3)	$9,65 \pm 1,43^b$	$6,51 \pm 0,53^a$
Transformada (4)	$9,31 \pm 0,82^b$	$5,41 \pm 0,35^{ab}$
Não Transformada (1)	$10,70 \pm 1,23^b$	$4,59 \pm 0,31^b$
Não Transformada (2)	$11,25 \pm 0,61^b$	$5,39 \pm 0,34^{ab}$
Não Transformada (3)	$11,52 \pm 0,96^b$	$5,47 \pm 0,49^{ab}$
Não Transformada (4)	$12,24 \pm 0,56^b$	$5,30 \pm 0,33^{ab}$

* Valores seguidos da mesma letra, para cada parte da planta analisada, não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey $P \leq 0.05$.

Análises cromatográficas (TLC) de extratos da parte aérea mostraram que tanto plantas normais quanto transformantes acumulam um alcalóide esteroidal majoritário (Figura 3) e confirmam as diferenças quantitativas observadas pelas análises colorimétricas.

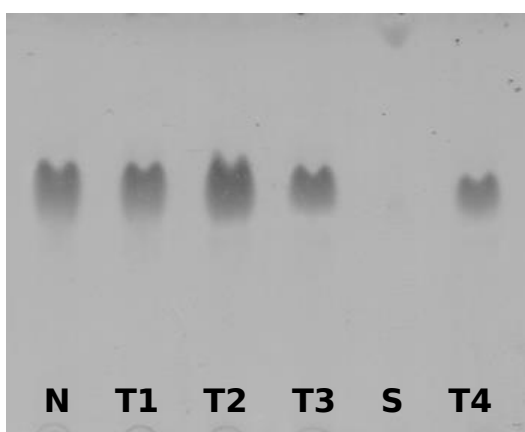


Figura 4. Perfil cromatográfico dos extratos de parte aérea de planta normal (N), os quatro transformantes (T1-T4) e o padrão de solasodina (S).

Diversos alcalóides esteroidais tem sido descritos em *S. pseudocapsicum* como solanocapsina, solacasina, solacapina, episolacapina, isosolacapina e metilsolanocapsina (Chakravarty et al., 1984).

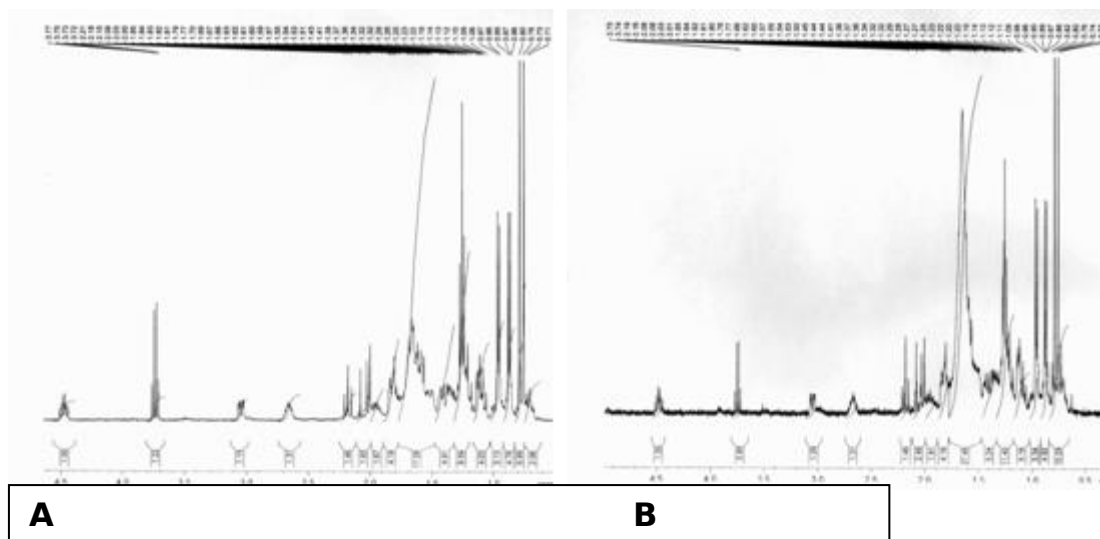


Figura 5. Espectros ^1H NMR da fração alcalóidal de partes aéreas de planta não-transformada (A) e transformada (B) de *S. pseudocapsicum*.

A análise de espectros de ^1H NMR da fração alcalóidal de plantas não transformantes e transformantes de *S. pseudocapsicum* permitiram caracterizar a solanocapsina como o alcalóide majoritário (Figura 5). Três grupos de substituintes químicos característicos de solanocapsina foram observados: o primeiro em $\delta=2,65$ correspondente a um próton ligado a C3-NH_2 , o segundo em $\delta= 4,57$ relativo a um próton presente na junção entre anéis, e o terceiro em $\delta= 3,02$ correspondente a dois prótons ligados no C26. Além destes, um pico $\delta= 3,75$ indica a presença de dois prótons ligados a um carbono que por sua vez está ligado a um oxigênio, e que corresponde a outro 3-aminoesteroide de estrutura desconhecida, presente em proporção distinta em plantas não transformantes e transformantes. As plantas não transformantes exibiram

uma relação próxima a 1, indicando que o esqueleto de solanocapsina é predominante, representando mais de 90% dos alcalóides. Por outro lado, nos transformantes a proporção de solanocapsina foi inferior indicando que, direta ou indiretamente, a transformação afeta a via de ciclização entre os anéis que compõem a estrutura esteroidal. A elucidação da estrutura destes metabólitos encontra-se em estudo.

REFERÊNCIAS

- Aliero, A.A.; Grierson, D.S.;Afolayan, A.J. (2005). Chemical and nutrient characterization of *Solanum pseudocapsicum* berries. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 1300-1303.
- Aoki T., Matsumoto H., Asako Y., Matsunaga Y, Shimomura K. (1997) Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep.* 16: 282-286.
- Argolo A.C., Charlwood B.V., Pletsch M. (2000) The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Solanum aviculare*. *Planta Med.* 66: 448-451.
- Badami, S., Prakash, O., Dongre, S.H., Suresh, B. (2005). *In vitro* antioxidant properties of *Solanum pseudocapsicum* leaf extracts. *Ind. J. Pharmac.* 37: 251-252.
- Birner, J. (1969) A method for the determination of totals steroid bases. *J. Pharm. Sci.* 58:258-259.
- Chakravarty A.K., Das B., Ali E., Pakrashi S.C. (1984) Studies in Indian medicinal plants. Part 77. Structure and stereochemistry of some new steroidal alkaloids

- from *Solanum pseudocapsicum* and *Solanum giganteum* by nuclear magnetic spectroscopy. *J. Chem. Soc. Perkin Trans-1*, 467-474.
- Curtis I.S., Power J.B., Hedden P., Phillips A., Lowe K.C., Ward D.A., Davey M.R. (2000) Transformation and characterization of transgenic plants of *Solanum dulcamara* L.- Incidence of transgene silencing. *Ann. Bot.* 86: 63-71.
- Echeverrigaray S. (1995) Changes in peroxidase and polypeptide profiles in *Nicotiana tabacum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Ciência Rural* 25: 229-232.
- Gaudin V., Jouanin L. (1995) Expression of *Agrobacterium rhizogenes* auxin biosynthesis genes in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 28: 123-136.
- Georgiev M.I., Pavlov A.I., Bley T. (2007) Hairy roots type plant in Vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1175-1185.
- Jacob, A., Malpathak, N. (2005). Manipulation of MS and B5 components for enhanced of growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 80: 247-257
- Hamill J.D. (1993) Alterations in auxin and cytokinin metabolism of higher plants due to expression of specific genes from pathogenic bacteria: a review. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 405 - 423
- Kittipongpatana N., Hock R.S., Porter J.R. (1998). Production of Solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 52: 133-143.
- Mitscher L.A., Juvakar J.V., Beal J. L. (1976) Solanocapsine, a new steroidal alkaloid from *Solanum pseudocapsicum* possessing antimicrobial activity. *Experientia* 32: 415.

- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pawar P.K., Maheshwari V.L. (2008) *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important members of family *Solanaceae*. *Ind. J. Biotechnol.* 3: 414-417.
- Porter J. R. (1991) Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit Rev Plant Sci* 10: 387–421.
- Shrishailappa B., Reddy S.A.M., Kumar E.D.P., Vijayan P., Suresh B. (2003). Anti tumour activity of total Alkaloid fraction of *Solanum pseudocapsicum*. *Phytotherapy* 17: 1001-1004.
- Subroto M.A., Tampubolon E., Simanjuntak P. (2007) Changes in solasodine accumulation in regenerated plants of *Solanum nigrum* transformed with *Agraobacterium rhizogenes* 15834. *Biotechnology* 6: 328-333.
- Tepfer M., Casse-Delbart C. (1987) *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiol. Sci.* 4: 21-28.
- Van Den Berghe D.A., Ieven M., Mertens F., Vlietinck A.J., Lammens E. (1987). Screening of higher plants for biological activities-11. Antiviral activity. *J. Natl. Prod.* 11: 463-467.
- Vijayan P., Kumar V.S., Preethi V., Dhanaraj S.A., Shrishailappa B., Suresh, B. (2002). *In vitro* cytotoxicity and anti-tumor properties of the total alkaloid fraction of unripe fruits of *Solanum pseudocapsicum*. *Pharm. Biol.* 40: 456-460.
- Vijayan P., Kumar V.S., Dhararaj S.A., Badami S., Suresh B. (2003) Hepatoprotective effect of the total alkaloid fraction of *S. pseudocapsicum* leaves. *Pharm. Biol.* 40: 456-460.

Vijayan P., Vijayaraj P., Setty P.H.C., Hariharpura R.C., Godavarthi A., Badami S., Arumugam D.S., Bhojraj S. (2004). The cytotoxic activity of the total alkaloids isolated from different parts of *Solanum pseudocapsicum*. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 528-530.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho é possível tecer as seguintes conclusões:

- 1- Plantas nativas e exóticas do *Solanum* frequentes na região serrana do Rio Grande do Sul apresentam alta variação no conteúdo de alcalóides esteroidais e compostos fenólicos.
- 2- Elevado conteúdo de alcalóides esteroidais foi constatado em tecidos aéreos de *S. pseudocapsicum* sendo o seu alcalóide majoritário identificado com solanocapsina.
- 3- O cultivo *in vitro* representa uma alternativa interessante para a multiplicação de *S. pseudocapsicum*. A melhor taxa de multiplicação foi obtida em meio MS com 4.4 μM BA e intenso enraizamento foi constatado em meio MS com 2.46 μM IBA or 5.71 μM IAA.
- 4- Em *S. pseudocapsicum* folhas apicais ou jovens apresentam maior concentração de alcalóides esteroidais, decrescendo em direção à base da planta.
- 5- Em cultivo *in vitro* foi evidenciada ação estimulante de concentrações de até 4.4 μM BA sobre a produção de biomassa vegetal e conteúdo de alcalóides esteroidais, atingindo concentrações superiores às evidenciadas em folhas apicais de plantas *in vivo*.
- 6- O conteúdo de alcalóides esteroidais em raízes *in vitro* foi em geral menor do que em tecidos da parte aérea, porém estimulado pela adição de auxinas, particularmente ácido indolbutírico.

- 7- A transformação genética de *S. pseudocapsicum* por *A. rhizogenes* é eficiente, ocorrendo regeneração direta de plantas com características fenotípicas alteradas.
- 8- Análise de extratos de partes aéreas e raízes de plantas transformantes mostraram conteúdo médio de alcalóides esteroidais semelhante a plantas não transformadas. Porém, um transformante apresentou um aumento de 56% no conteúdo de alcalóides, indicando que a obtenção e seleção de transformantes pode contribuir para o incremento da produção destes compostos.
- 9- Análise dos extratos permitiu constatar alterações no padrão de substituições no anel esteroidal em plantas transformantes, indicando que as alterações metabólicas decorrentes da transformação afetam direta ou indiretamente o processo de ciclização.

5. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Aberoumand, A. (2008). Comparison of protein values from seven wild edible plants of Iran. **Afr. J. Food Sci.** 2: 073-076.
- Abdullah, M.A.; Ali, A.M.; Marziah, M.; Lajes, N.H.; Ariff, A.B. (1998). Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of antraquinones. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 54: 173-182.
- Alvarez M.A; Rodriguez, T.J.; Paniego, N.B.; Giulietti, A.M. (1994) Solasodine production in transformed organ cultures (roots and shoots) OF *S. eleagrifolium* Cav. **Biotechnol. Lett.** 16: 393-396.
- Ankenbauer, R.G.; Nester, E.W. (1990). Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. **J. Bacteriol.** 172: 6442-6446.
- Atta-ur-Rahman, M.; Choudhary, M.I. (1997) Diterpenoids and steroidal alkaloids. **Nat. Prod. Rev.** 14: 191-203.
- Atta-ur-Rahman, M.; Muzaffar, A. (1988) In: The Alkaloids (ed. A. Brossi), Academic Press, San Diego, Vol. 32, p79.
- Babaoglu, M., Davey, M.R.; Power, J.B.; Porer, F.; Wink, M. (2004) Transformed roots of *Lupinus mutabilis*: induction, culture and isoflavone biosynthesis. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 78: 29-36.
- Badami, S.; Reddy, M.S.A; Kumor, E.P.; Vijayan, P.; Suresh, B. (2003) Antitumor activity of total alkaloids fraction of *Solanum pseudocapsicum* leaves. **Phytotherapy Res.** 17: 1001-1004.
- Baker, D.C.; Keeler, R.F.; Gaffield, W. (1989) Pathology in hamsters administered *Solanum* plant species that contain steroidal alkaloids. **Toxicol.** 27: 1331-1337.

- Baker, A.; Schaffner, E.; Boevé, J.L. (2002) Host specificity and host recognition in a chemically-defended herbivore, the tenthredinid sawfly *Rhadinoceraea nodicornis*. **Entomol. Exper. Appl.** 104: 61-68.
- Balandrin, M.J.; Klocke, J.A. (1988). Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: Bajaj, Y.P.S., editor. "Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic plant". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 1-36.
- Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Ortuno, A.; Del Rio, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. **J. Agricult. Food Chem.** 45:4505-4515.
- Bergers, W.W.; Alink, G.M. (1980) Toxic effect of the glycoalkaloids solanine and tomatine on cultured neonatal rat heart cells. **Toxicology Lett.** 6: 29-32.
- Brasileiro, A.C.M. (1993). Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCPT Notícias.** 20: .2-6.
- Brasileiro, A.C.M.; Dusi, D.M.A. (1999). Transformação Genética de Plantas. *In:* Torres, A.C, Caldas, L.S., Buso, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA.
- Cangelosi, G.A.; Ankenbauer, R.G.; Nester, E.W. (1990). Sugars induce *the Agrobacterium virulence* genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 87: 6708-6712.
- Carpin, S.; Ouelhazi, L.; Filali, M.; Chénieux, J.C.; Rideau, M.; Hamdi, S. (1997) The relationship between the accumulation of a 28kD polypeptide and that of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. **J. Plant Physiol.** 150: 452-457.
- Carvalho, J.C.T.; Gosman, G.; Schenkel, E.P. (2001) Compostos Fenólicos Simples e Heterosídeos (cap.20) *In:* Farmacognosia da planta ao medicamento organizado por

- Cláudia Maria Oliveira Simões...[et al.]. \$ ed. - Porto Alegre/Florianópolis : ED Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC.
- Chandler, S.F.; Dodds, J.H. (1983). The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasodine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. **Plant Cell Rep.** 2: 205-208.
- Charlwood, B.V.; Moustou, C. (1988) Essential oil accumulation in shoot-proliferation cultures of *Pelargonium* spp. In: Robins, R.J., Rhodes, M.J.C.(ed.). manipulating secondary metabolism in culture. Cambridge: Cambridge University, p.187-194.
- Charlwood, B.V.; Charlwood, K.A.; Molina-Torres, J. (1990). Accumulation of secondary compounds organised plant cultures. In: Secondary Products From Plant Tissue Culture (eds.) B.V. Charlwood & M.J.C. Rhodes. Clarendon Press. Oxford.
- Chiesa, F.A.F; Moyna, P.(2001) Alcalóides Esteroidales In: Farmacognosia da planta ao Medicamento Cláudia Maria Oliveira Simões et al.- 3.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/ UFRGS/Ed. da UFSC p.717-731.
- Chilton, M.D.; Drumond, M.H.; Merlo,D.J.; Sciaky,D.; Montoya, A.L.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell** 11: 263-271.
- Chilton, M.D.; Tepfer, D.A.; Petit, A.; Casse-Delbart, F.; Tempé, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into genomes of host plant root cells. **Nature** 295: 432-434.
- Choi, K. T.; Ahn, I.O.; Park, J. C. (1994).Production of ginseng saponin in tissue culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mayer). **Russ. J. Plant Physiol.** 41: 784-788.
- Collin, H.A. (2001) Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regul.** 34: 119-134

- Cooper, M.K.; Porter, J.A.; Young, K.E.; Beachy, P.A. (1998) Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. **Science** 280: 1603-1607.
- Cornelius, M.T.F.; Alves, C.C.F.; Silva, T.M.S.; Alves, K.Z.; Carvalho, M.G.; Braz-Filho, R.; Agra, M.F. (2004). Solasonina e flavonóides isolados de *Solanum crinitum* Lam. **Rev. Bras. Farmacol.** 85: 57 – 59.
- Craik, D.J.; Daly, L.N.; Plan, R.M.; Salim, A.A.; Sando, L. (2002). Structure and function of plant toxins (with emphasis on cystine knot toxins). **J. Toxicol. Toxin Rev.** 21: .229-271.
- Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G. (2000) Natural products (secondary metabolites) In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Buchman, B., Grissem, R., Jones, R. Eds. American Society of Plant Physiologists p.1250-1318.
- Dias, B.F.S. (1996) A implementação de convenção sobre a diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas: André Tosello, 10p.
- Dicosmo, F.; Misawa, M. (1995). Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. **Biotechn. Adv.** 13: 425-453.
- Dinan, L.; Harmatha, J.; Lafont, R. (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. **J. Chromatogr. A.** 935: 105 – 123.
- dos Reis, M.S.; Marlot, A. (2001) Diversidade Natural e Aspectos Agronômicos de Plantas Mediciniais. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões [et al.].- 3.ed.rev. - Porto Alegre/Florianópolis:: Ed. Universidade/UFRGS/ED.da UFSC.
- Doty, S.L.; Yu, N.C.; Lundin, J.I.; Heath, J.D.; Nester, E.W. (1996). Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Bacteriol.** 178: 961-970.

- Drewes, F.E.; van Staden, J. (1995). Initiation of and Solasodine production in hairy root cultures of *Solanum mauritianum*. **Scop.** 17: 27-31.
- Edmonds, J.M.; Chweya, J.A. (1997). Black nightshades – *Solanum nigrum* L. and related species. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.15. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Esteves-Souza, A.; Silva, T.M.S.; Alves, C.C.F; Carvalho, M.G.; Braz-Filho, R.I.; Echevarria, A. (2002) Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoids from two *Solanum* species. **J. Braz. Chem. Soc.** 13: 838-842.
- Fewell, A.M.; Roddick, J.G. (1993). Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids a-solanine and a-chaconine. **Phytochemistry** 33:323-328.
- Flores, H.E.; Curtis, W. (1992) Approaches to understanding and manipulating the biosynthetic potential of plant roots. **Ann. NY Acad. Sci.** 665: 188-209.
- Flores, H.E.; Hoy, M.W.; Pickard, J.J. (1987) Secondary metabolites from root cultures. **Trends Biotechn.** 5: 64-68.
- Fontanel, A.; Tabata, M. (1987). Production of secondary metabolites from plant tissue and cell cultures. **Nestle Research News:** 92-103.
- Franklin, C.I.; Dixon, R.A. (1994). Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Dixon, R. A., Gonzales, R. A. (eds.), *Plant Cell Culture-A Practical Approach*. 2nd edition. IRL Press, O
- França, S.C. (2001) Abordagens Biotecnológicas para a Obtenção de Substâncias ativas (cap.7) In: *Farmacognosia da planta ao medicamento* organizado por Cláudia Maria

- Oliveira Simões et al. Ed. -Porto Alegre/Florianópolis : ED Universidade /UFRGS/Ed.da UFSC.
- Friedman, M.; Renika, P.R.; Mackey, B.E. (1996) Feeding of potato, tomato and eggplant alkaloids effects food consumption and body and liver weights in mice. **J. Nutr.** 126: 989-999.
- Friedman, M.; McDonald, G.M. (1997) Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety and plant physiology. **Crit. Rev. Plant Sci.** 16: 55-132.
- Friedman, M. (2004). Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. **J. Chromatogr. A.** 1054: 143 – 155.
- Furmanowa, M.; Glowniak, K.; Syklovska-Baranek, K.; Kgórká, G.; Józefczyk (1997). Effect of picloram and methyl jasmonate and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media* var. Hatfieldii. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 49:75-79.
- Furuya, T. (1988). Saponins (ginseng saponins). In: Vasil, I.K. (Ed), Cell cultures and somatic Cell Genetics of Plants. S. Academic Press, San Diego, C A:213-234.
- Furuya, T.; Yoshikawa, T.; Orihara, Y.; Oda, H. (1984). Studies of the culture conditions for *Panax giseng* cells in jar fermentors. **J. Nat. Prod.** 47: 70-75.
- Furuya, T.; Yoshikawa, T.; Ushiyama, K.; Oda, H. (1986). Formation of plantlets from callus cultures of ginseng. **Experientia** 42: 193-194.
- Fusco, B.M.; Giacobozzo, M. (1997) Peppers and pain:the promise of capsaicin. **Drugs** 53:.909-914.
- Galanes, I.T.; Webb, D.T.; Rosario, O. (1984) Steroid productions by callus and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst, **J. Nat. Prod.** 47: 373 – 376.

- George, F.E. (1996). Plant propagation by tissue culture. Part 2. In Practice 2nd Edition, 1993/1996. Editora Exegetics Limited 575-1333.
- Gerstner, G.; Heyer, A.G.; Engel, K.H. (1999) Glycoalkaloids in transgenic potatoes. Abstr.14111 Trienn. Conf. EAPR, Sorrento, p. 680-681.
- Gonçalves, M.C.R.; Diniz, M.F.F.M.; Borba, J.D.C.; Nunes, X.P.; Barbosa-Filho, J.M. (2006). Berinjela (*Solanum melongena* L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias? **Rev. Bras. Farmacog.** 16: 252 – 257.
- Gottlieb, H.E.; Sinha, M.C.S.C.; Bagghi, A; Ali, A; Ray, A.B.W. (1987) Withaminimin, a vitanolídeos from *Physalis minima*. **Phytochemistry** 26: 1801.
- Goutarel, R. (1964) Les alcaloïds stéroïdiques des Apocynacées. Paris: Hermman,.
- Griffin, J.W.; Lin, G.D. (2000). Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry.** 53: 623 – 637.
- Groen, K. (1993) Bioavailability and disposition of a-solanine in rat and hamster. **Xenobiotica** 93: 995-1005.
- Guerra, M.P.; Nodari, R.O. (2001) Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Farmacognosia:da planta ao medicamento/organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões et al.- 3.ed. - Porto Alegre/Florianópolis:: Ed. Universidade/UFRGS/ED.da UFSC.
- Hamil, J.D.; Parr, A.J.; Rhodes, M.J.C.; Robins, R.J.; Walton, N.J. (1987) New routes to plant secondary products. **Bio/Technol.** 5: 1801.
- Harbone, J. B. (1985) An Introduction to Ecological Biochemistry, Academic Press London, p. 312.
- Harbone, J.B. (1997) Recent advances in chemical ecology. **Nat. Prod. Rep.** 14: 83-98.

- Henriques, A.T.; Kerber, V.A.; Moreno, P.R.H. (2001) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos In: Farmacognosia da planta ao Medicamento Cláudia Maria Oliveira Simões... et. al. - 3.ed.- Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC p.651-666.
- Hertog, H.K.; Fesknes, S. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. **Lancet** 342: 1007-1011.
- Hirasuna, T.; Pestchanker, L.J.; Srinivasan, V.; Shuler, M.L. (1996). Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 44: 95-102.
- Hunziker, A.T. (2001) Genera Solanacearum. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag 500p 136 Fig.
- Kadota, S.; Chen, S.Z.; Li, J.X.; Xu, GU-J.; Namba, T.A. (1995). A steroidal alkaloid from *Veratrum oblongum*. **Phytochemistry** 38: 777-781.
- Khan, F.; Ikram, M. (1983). *Solanum* species as a source of steroidal drugs. **Pakistan J. Sci. Ind. Res.** 26: 126-127
- Kittipongpatana, N.; Hock, R.S.; Porter, J.R. (1998) Production of Solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. **Plant Cell, Tissue Org. Cult.** 52: 133-143.
- Kodamatani, H.; Saito, K.; Niina, N.; Yamazaki, S.; Tanaka, Y. (2005). Simple and sensitive method for determination of glycoalkaloids in potato tubers by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **J. Chromatogr. A.** 1100: 26 – 31.
- Kul'kova, V.V.; Shakirov, R.; D'yakonov A.L. (1999). Steroid alkaloids of the plant and kingdoms. **Chem. Nat. Comp.** 35: 107-149.

- Kuldau, G.A.; DeVos, G.; Owen, J.; McGaffrey, G.; Zambryski, P. (1990). The *virB* operon of *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 encodes 11 open reading frames. **Molec. Gen. Genet.** 221: 256-266.
- Lachman, J.; Hamouz, K.; Orsák, M.; Pivec, V. (2001) Potato tubers as a significant source of antioxidants in human nutrition. **Rostlinná V'yroba** (Czechoslovakia) 47: 181-191.
- Leitão, S.G.; Kaplan, M.A.C.; Monache, F.D.; Nyandat, E.; Rwekika, E.F. (1997) Antifeedant activity of two phenylpropanoid glucosides from *Aegiphila obducta* against *Chilo partellus* larvae. **Insect Sci. Appl.** 16: 375-378.
- Lila, M.A. (2005) Valuable secondary products *In: Vitro* Culture. plant development and biotechnology, 285-289.
- Maga, J. A. (1994). Glycoalkaloids in *Solanaceae*. **Food Rev. Int.** 10: 385-418.
- Manach, C.; Mazur, A. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Rev. 97 bioavailability studies. **Am. J. Clin. Nutr.** 81: 230S-242S.
- Mann, J.D. (1978). Production of solasodine for the pharmacological industry. **Adv. Agron.** 30: 207-245.
- Marcano, D.; Hasegawa, M. (1991) Fitoquímica Orgánica. Caracas: Universidad Central de Venezuela.
- Matsubara, K.; Shigekazu, K.; Yoshioka, T.; Fujita, Y; Yamada, Y. (1989). High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. **J. Chem. Techn. Biotechn.** 46: 61-69.
- Mentz, L.A.; Oliveira, P.L. (2004). *Solanum* (Solanaceae) na região sul do Brasil. Pesquisas/Instituto Anchieta de Pesquisa. São Leopoldo:UNISINOS.

- Miz, R.B.; Mentz, L.A.; Souza-Chies, T.T. (2008). Overview of the phylogenetic relationships of some southern Brazilian species from section Torva and related sections of “spiny *Solanum*” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae) **Genetica** 132: 143-158.
- Middleton, E.Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharm. Rev.** 52: 673-751.
- Mulabagal, V.; Tsay, H-S. (2004). Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. **Int. J. Appl. Sci. Eng.** 1: 29-48
- Murashige, T.; Skoog, F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Nee, M. (1999). Synopsis of *Solanum* in the New World. In: Nee, M.; Symon, D.E.; Lester, R.N.; Jessop, J.P. (eds), Solanaceae IV. Royal Botanic Gardens Kew, pp.285-333.
- Pasquali, G.; Zanettini, M. H. B. (2003) Transformação Genética de Plantas In: Freitas, L. B. & Bered, F. Genética e Evolução Vegetal, Porto Alegre: Editora da UFRGS.
- Pio Correa, M. 1926-1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional/IBDF.6v
- Porter, J.R (1991) Host range and implications of plant infection by *A. rhizogens*. **Crit. Rev. Plant Sci.** 10: 387-421
- Puupponen-Pimia, R.; Nohynek,L.; Meier, C.; Kahkonen, M.;Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K.M. (2001) Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **J. Appl. Microbiol** 90: 494-507.

- Quecini, M.V.; Vieira, M.L.C. (2001) Plantas Transgênicas In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L (eds), Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria. Guaíba: Agropecuária.
- Ramachandra, R S.; Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechn. Adv.** 20: 101-153.
- Ramaval, K.G.; Rideau, M. ; Chenieux, J. (1988) **Phytochemistry** 24, 441.
- Randhir, R.; Lin, Y.T.; Shetty, k. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Asia Pacific J. Clin. Nut.** 13: 295-307.
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. (1999). Biology of Plants, 6nd Edition. W.H. Freeman and Company. Nova Iorque.
- Ream, W.; Gelvin, S.B (1996). Crown gall: advances in understanding interkingdom gene transfer. Saint Paul: APS Press, 148p.
- Renwick, J.H.; Claringbold, W.D.; Earthy, M.E.; Few, J.D.; McLean, A.C. (1984) Neural-tube defects produced in Syrian hamsters by potato glycoalkaloids. **Teratology** 30: 371-381.
- Ripperger, H. (1995) Steroidal alkaloids and sapogeninas from roots of same *Solanum* species. **Planta Med.** 61: 292.
- Ripperger, H.; Porzel, A. (1994). *Solanum* alkaloids, 128, Steroid alkaloid glycosides from *Solanum robustum* Liebig. Ann der Chemie o, 517-20. Contact: Ripperger, Helmut; Inst Plant Bioche, Weinberg 3-D-06120 Halle,Germany.
- Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E. (1996). Pharmacognosy & pharmacobiotechnology, Baltimore: William & Wikim, p.149-155.

- Roddick, J.G.; Osman, S.F.; Runenberg, A.L. (1988) Synergistic interaction between potato glyco alkaloids a-solanine and a-chaconine in relation to destabilization of cell membranes:ecological implications. **J. Chem. Ecol.** 14: 889-902
- Roesler, J. (2007). Important role of corticosteroids in cronic granulomatous disease. **J. Med. Microbiol.** 56: 1253.
- Rout, G.R.; Samantaray, S.; Das, P. (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechn. Adv.** 18: 91-120.
- Saez, J.; Cardona, W.; Espinal, D.; Blair, S.; Mesa, J.; Bocar, M.; Jossang, A. (1998). Five New Steroids from *Solanum nudum*. **Tetrahedron** 54: 10771 – 10778.
- Samman (1998) Flavonoids and coronary heart disease: dietary perspectives. *In*: C.A. Rice-Evans; L. Parker. Ed. Flavonoids in health and disease, Marcel Dekker, NY, p. 469-482.
- Sayed, K.A.E; Hamman, M.T.; El-Rahman, H.A.A.; Zaghoul, A.M. (1998). New Pyrrole Alkaloids from *Solanum sodomaeum*. **J. Nat. Prod.** 61: 848 – 850.
- Schakirov, R.; Yunusov, M.S. (1990) Steroidal alkaloids. **Nat. Prod. Rep.** 27: 557-564.
- Shimoda, N.; Toyoda-Yamamoto, A.; Aoki, S.; Machida, Y. (1990). Genetic evidence for a interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar binding protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Biol. Chem.** 268: 26552-26558.
- Shirasu, K.; Kado, C.I. (1993a). The virB operon of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence regulon has sequence similitries to B,C and D open reading frames downstream of the *Pertussis* toxin-operon and to the DNA transfer-operons of broad-host-range conjugative plasmids. **Nucleic Acid Res.** 21: 353-354.

- Shirasu, K.; Kado, C.I (1993b). Membrane location of Ti plasmid VirB proteins involved in the biosynthesis of a pilin-like conjugative structure on *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS Microbiol. Lett.** 111:287-294.
- Shirasu, K.; Morel, P.; Kado, C.I (1990). Characterization of the *virB* operon of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid: nucleotide sequence and protein analysis. **Molec. Microbiol.** 4: 1153-1163.
- Shirasu, K.; Koukolikova-Nicola, Z.; Hohn, B.; Kado, C.I (1994). An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. **Molec. Microbiol.** 11: 581-588
- Signs, M.; Flores, H.E. (1990) The Biosynthetic potential of plant roots. **Bioessays.** 12: 7-13.
- Silva, T.M.S.; Braz-Filho, R.; Carvalho, M.G.; Agra, M.F. (2002). Flavonoids and an Alkamide from *Solanum paludosum* Moric. **Biochem. Syst. Ecol.** 30: 479 – 481.
- Silva, T.M.S.; Câmara, C.A; Agra, M.F.; Carvalho, M.G.; Frana, M.T.; Brandoline, S.V.P.B.; Paschoal, L.S.; Braz-Filho, R. (2006). Molluscicidal activity of *Solanum* species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabarata*. **Fitoterapia.** 77: 449-452.
- Smith, M.A.L.; Kobayashi, H.; Gawienowski, M.; Briskin, D.P. (2002) An *in vitro* approach to investigate medicinal chemical synthesis by three herbal plants. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 70:105-111.
- Sree, A.; Rao, Y.R; Bauji, M; Roo, K.M.; Mahapatna, S.N. (1998) An improved process for the conversion of solasodine to 16-dehy duopregnonolona acetate. **Ind.. Pet.** 162, 446.

- Stephens, K.M.; Roush, C.; Nester, E.W. (1995) *Agrobacterium tumefaciens* Vir B11 protein requires a consensus nucleotide binding protein Vir E2 site for function in virulence. **J. Bacteriol.** 177: 27-36.
- Taiz, L.; Zeiger E. (2002). *Plant Physiology*, (Sinauer Associates, Inc., Massachusetts), pp.287-290.
- Takahashi, T.; Fujita, Y. (1991). In: *Plant Cell Culture in Japan*. Komamine, A., Missawa, M and Dicosmo, F., editors. *Cosmetic materials*: 72-78.
- Tanaka, N.; Takao, M.; Matsumoto, T. (1995). Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor*. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 41: 61-64.
- Tempé, J.; Schell, J. (1977). Is crown gall a natural instance of gene transfer? In: Legocki, A. B. (ed.) *Translation of natural and synthetic polynucleotides*. New York: Elsevier Publishers, 1997. p.415- 427.
- Thompson, D.V.; Melchers, L.S.; Idler, K.B.; Schilperoort, R.A.; Hooykaas, P.J.J. (1988). Analysis of the complete nucleotide sequence of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* vir B operon. **Nucleic Acids Res.** 16: 4621-4636.
- Tomoko, J.; Vassová, A.; Adam, G.; Schreiber, K. (1968) Über Veralkamin, ein neuer Steroidalkaloid-typ mit 17-b-Methyl-18-nor-17-iso-Cholestan-Kohlenstoffgerüst. **Tetrahedron** 24: 4865-4873.
- Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (1999). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq.

- Ulbrich, B.; Weisner, W.; Arens, H. (1985). In primary and secondary metabolism of plant cell cultures, (Neumann, K. h. & Reinhard, E., editors), Springer-Verlag (Berlin): 293-303.
- Usubillaga, A.; Aziz, I.; Tettamanzi, M. C.; Waibel, R.; Achenbach, H. (1997). Steroidal alkaloids from *Solanum sycophanta*. **Phytochemistry**. 44: 537 – 543.
- Usubillaga, A.N.; Meccia, G. (1987). Steroidal Sapogenins from *Solanum scorpioideum*. **J. Nat. Prod.** 50: 636 – 641.
- Valkonen, J.P.T.; Keskitalo, M.; Vasara, T.; Pietila, L. (1996) Potato glycoalkaloids: a burden or a lessing .**Crit. Rev. Plant. Sci.** 15: 1-20.
- Van Sluyus, M.A.; Hashimoto, R.Y.; Scortecci, K.C. (1992). Gene transfer from *Agrobacterium* to plants. **Ciencia e Cultura**, São Paulo, v.44, p.296-300.
- Vaz, N.P. (2008) Alcalóides Esteroidais dos Frutos Maduros de *Solanum caavurana* Vell. 101 p
- Vijayan,P.; Kumar, V.S.; Dhararaj, S.A.; Badami,S.; Suresh, B. (2003) Hepatoprotective Effect of the total Alkaloid Fraction of Unripe Fruits of *Solanum pseudocapsicum* leaves. **Pharm. Biol.** 40: 456-460.
- Vijayan, P.; Vijayaraj, P.; Setty, P.H.C.; Hariharpura, R.C.; Godavarthi, A.; Badami, S.; Arumugam, D.S.; Bhojraj, S. (2004) The cytotoxic activity of the total alkaloids isolated from different parts of *Solanum pseudocapsicum*. **Biol. Pharm. Bull.** 27: 528—530.
- Verpoorte, R.; Contin, A.; Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochem. Rev.** 1: 13-25.

- Villarreal , M^a L.; Arias, C.; Feria-Velasco, A.; Ramirez, O.T.; Quintero, R. (1997) Cell Suspension Culture of *Solanum chrysotrichum* (Schldl)- A Plant producing an Antifungal Spirostanol Saponin. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 50: 39-44
- Wall, M.E; Wani, M.C. (1996) Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharm.** 51:239-254
- Ward, E.R.; Barnes, W.M. (1988).Vir.D₂ protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. **Science** 242: 927-930.
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolff, K.; Meyer, W. (1995). DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Weissemberg, M. (2001). Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. **Phytochemistry** 58: 501 – 508.
- Whitmer, S.; Canel, C.; Heijden, R.; van der Verpoorte, R. (2003) Long-term instability of alkaloid production by stably transformed cell lines of *Catharanthus roseus*. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 74: 73-80.
- Wink, M. (1990). Physiology of Secondary Product Formation in Plants. In: Secondary Products from Plant Tissue Culture, ed. Charlwood, B. V. & Rhodes, M. J. C., p. 23. Clarendon Press, Oxford.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry.** 64: 3-19.
- Winans, S.C. (1992). Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. **Microbiol. Rev.** 56: 12-31
- Yencho, G.C.; Kowalski, S.P.; Kobayashi, R.S.; Sinden, S.L.; Bonierbale, M.W.; Deahl, K.L. (1998). QTL mapping of foliar glycoalkaloid aglycones in *Solanum tuberosum*

- x *S. berthaultii* potato progenies: quantitative variation and plant secondary metabolism. **Theor. Appl. Genet.** 97: 563-574.
- Yoshikawa, T.; Furuya, T. (1985) Morphinan alkaloid production by tissues differentiated from cultured cells of *Papaver somniferum*. **Planta Med.** 51: 110-113.
- Yoshimitsu, H.; Nishida, M.; Nohara, T. (2003). Steroidal glycosides from the fruits of *Solanum abutiloides*. **Phytochemistry** 64: 1361 – 1366.
- Zaha, A.; Passaglia, L.M.P. (2003). Técnicas de Biología Molecular cap 16 In: Zaha, A.; Ferreira, H. B.; Passaglia, L. M. P. 3^A ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 424p (378-413).
- Zhou, X.; He, X.; Wang, G.; Gao, H.; Zhou, G.; Ye, W.; Yao, X. (2006). Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. **J. Nat. Prod.** 69: 1158 – 1163.
- Zupan, J.; Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant host cell. **Plant Physiol.** 107: 1041-1047.