

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE PODOFILOTOXINA EM PLANTAS *IN VITRO*, CALOS E PLANTAS *EX VITRO* DE *HYPTIS LEUCOCEPHALA* MART. EX BENTH.

Paloma Oliveira dos Santos¹; Lenaldo Muniz de Oliveira²; Hugo Neves Brandão³; Cristina Ferreira Nepomuceno.

1. Bolsista PIBIC/CNPq, graduanda do curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: papy.paloma@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lenaldo.uefs@gmail.com
3. Co-orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hugo@uefs.br
4. Doutoranda em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: cfnbio@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Lamiaceae*; plantas aromáticas, fitoquímica.

INTRODUÇÃO

O gênero *Hyptis* apresenta amplo perfil farmacológico, com atividade antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, antiinflamatória, anti-HIV e inseticida (Falcão, 2003). Já foram identificados nesse grupo vários metabólitos secundários, como terpenóides e compostos fenólicos, a exemplo dos flavonóides e lignanas. Entre as lignanas encontram-se as podofilotoxinas, compostos bioativos em virtude de sua elevada capacidade de inibir o ciclo celular, detendo a duplicação dos cromossomos, sendo, por isso, muito eficiente no tratamento antitumoral (David *et al.*, 2001). As podofilotoxinas têm importância farmacológica e econômica muito grande, e sua extração indiscriminada em algumas espécies vegetais tem contribuído para elevar os riscos de extinção das mesmas, como tem ocorrido com o gênero *Podophyllum*, amplamente explorada para esse fim.

Nesse ínterim, a identificação de novas espécies produtoras de podofilotoxinas bem como o desenvolvimento de sistemas de produção desses compostos tornam-se necessários. O cultivo *in vitro* de células vegetais surge como uma alternativa viável, pois permite a obtenção de metabólitos secundários de interesse, especialmente para espécies que requerem períodos longos de cultivo e tem rendimentos baixos dos metabólitos secundários nos seus tecidos, além de possibilitar uma produção do metabólito de interesse em escala industrial utilizando espaço físico muito menor e sem depender de fatores como solo e clima. O cultivo de calos ou de células em meio líquido, por sua vez, tem sido uma nova abordagem para a produção de substâncias de alto valor agregado, possibilitando para algumas espécies a exploração econômica de compostos via cultura de células em biorreatores (França, 2001). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar qualitativamente a produção de podofilotoxina em plantas de *Hyptis leucocephala* estabelecida em condições de campo, em ambiente *in vitro* e em calos.

METODOLOGIA

O cultivo *in vitro* foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Unidade Experimental do Horto Florestal (UEHF) e a extração e quantificação das podofilotoxinas no Laboratório de Extração (LAEX) da Unidade Experimental do Horto Florestal (UEHF) e no Laboratório Central de Farmácia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Para o estabelecimento de plantas *in vitro*, as sementes de *Hyptis leucocephala* coletadas na coleção de plantas aromáticas do Horto Florestal, foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar com imersão em álcool a 70% durante um minuto e solução de

hipoclorito de sódio a 1,0%, com acréscimo de uma gota de detergente neutro por 10 minutos e, então, lavadas por quatro vezes em água destilada estéril e inoculadas em meio MS/2 (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. O pH do meio foi corrigido para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 15 minutos. Após a inoculação os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C , fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sessenta dias após a inoculação as plantas foram repicadas, utilizando-se apenas os segmentos nodais, para meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e o pH do meio corrigido para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. Após a repicagem as plantas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para a indução de calos foi utilizada a metodologia estabelecida por Nepomuceno *et al.* (2008). Os explantes foliares de *Hyptis leucocephala*, provenientes de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo oito mL de meio de cultura WPM (Wood Plant Medium) (Lloyd & McCown, 1980) suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (ANA). O pH do meio foi corrigido para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento no escuro e sob temperatura de 25°C durante 45 dias, quando foram coletados para caracterização morfológica, da coloração, da massa fresca e análise cromatográfica.

Amostras da parte aérea de plantas cultivadas *in vitro* e de calos foram utilizadas nas análises cromatográficas. Como controle, analisou-se também amostras de folhas, caules e raízes de plantas mantidas em canteiros a pleno sol. As análises cromatográficas foram realizados com sistema HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW HITACHI L-2130, tendo a fase móvel constituída de metanol, água, acetonitrila e ácido acético, todos com grau HLPC de procedência. O tempo total de corrida foi de 22 minutos, fluxo da fase móvel de $1,1 \text{ mL/min}$, volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ e temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes de *Hyptis leucocephala* ocorreu entre 10 e 15 dias de inoculação, obtendo-se 100% de germinação e contaminação inferior a 10%. Quarenta e cinco dias após a germinação das sementes obtiveram-se plantas com altura média de 4,0 cm, média de 12 folhas, com 0,8 cm de comprimento médio e coloração verde escuro (Figura 1).



Figura 1: - Plantas de *Hyptis leucocephala* estabelecidas *in vitro*. A - Plantas com 45 dias de germinação; B - Material de 5ª repicagem. Feira de Santana, 2011.

Obteve-se 100% de formação de calos na presença dos reguladores de crescimento e nenhuma formação de brotos (Figura 2). Após 45 dias de inoculação os calos apresentaram diâmetro médio de 2,0 cm, 0,4832 g de massa fresca e coloração esverdeada. Na superfície de alguns calos obtiveram-se células mais esbranquiçadas e formação de raízes (Figura 2).



Figura 2 – Calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Hyptis leucocephala*. A – Superfície de calo com a presença de células esbranquiçadas. B – calo apresentando raízes. Aumento 20x. Feira de Santana, 2011.

Amostras de calos, de plantas cultivadas *in vitro* e de plantas cultivadas em canteiros (controle) não apresentaram picos referentes às podofilotoxinas. Entretanto, na amostra obtida a partir de raiz, um pico (figura 3-A) apresentou similaridade com o padrão. O pico significativo apresentou tempo de retenção de 9,487 min, muito próximo do tempo de retenção do padrão (9,613 min), no entanto, o espectro de UV apresentou uma absorção diferente, como evidencia a sobreposição de espectros na figura 4.

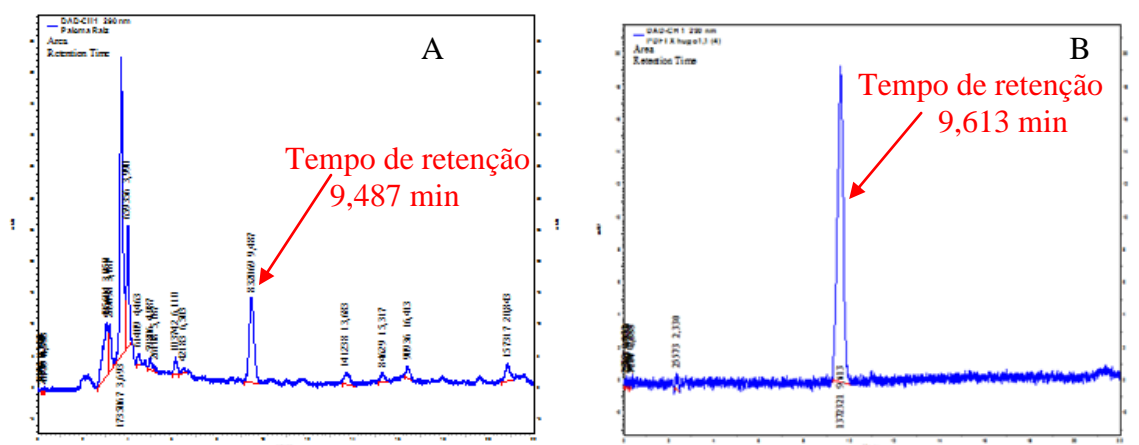


Figura 3: A - Cromatograma da amostra de raiz de *Hyptis leucocephala ex vitro*. B - Cromatograma do padrão de podofilotoxina.

A análise o espectro de UV representado na figura 3-B permite afirmar que o composto presente no cromatograma da figura 3-A não se trata da podofilotoxina, pois apesar de apresentar um tempo de retenção muito similar ao da podofilotoxina o espectro UV da amostra é diferente (271 nm) daquele estabelecido como padrão (291 nm).

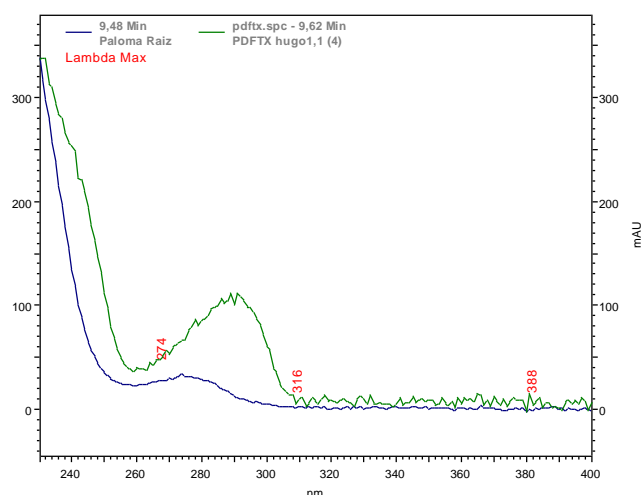


Figura 4: Sobreposição de espectros de UV do padrão de podofilotoxina (—) da amostra de raiz de *H. leucocephala ex vitro* (—).

Ressalta-se que dados da literatura demonstram a ocorrência desse grupo de substância em espécies de *Hyptis*, com o observado por Vera *et al.* (2007), em análise qualitativa por CLAE, que identificou uma lignana análoga à podofilotoxina, com tempo de retenção de 16,9 minutos em *Hyptis verticillata* cultivada *in vitro*. De modo semelhante, Brandão *et al.* (2009) verificaram a presença de lignanas ariltetralínicas (podofilotoxina, α -peltatina e β -peltatina) ao analisar nove espécies do gênero *Hyptis*.

CONCLUSÕES

Sementes de *H. leucocephala* germinam em meio MS/2 na presença de luz e sem a adição de fitorreguladores. O uso de BAP e ANA para a indução de calos em *H. leucocephala* é eficaz, permitindo que se obtenha calos brancos e compactos. A análise por CLAE não possibilitou a identificação de podofilotoxinas nos extratos de *Hyptis leucocephala* (*ex vitro*, *in vitro* e de calos).

REFERENCIAS

- DAVID *et al.* Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope Blanchetii* **Química Nova**, Vol. 24, No. 6, 730-733, 2001.
- FALCÃO, D. Q. & MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, 84(3): 69-74, 2003.
- FRANÇA, S.C. **Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas.** In: SIMÕES *et al* Farmacognosia da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC, capítulo 7, p. 105-124. 2001.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**. Alexandria, v.15, p.415, 1980.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NEPOMUCENO, C.F; PEREIRA, D.M.S; FONSECA, P.T; SILVA, S.T; OLIVEIRA, L.M. **Indução de calos em explantes foliares de *hyptis leucocephala*.** II Workshop bioprospecção de plantas nativas do semi-árido, Aracaju - SE, 2008.