

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

**ESTUDO BIOTECNOLÓGICO E PERFIL QUÍMICO DE
PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS DE *Hyptis*
marrubioides Epling**

Autora: Rita Cássia Nascimento Pedroso
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Helena Januário

Rio Verde – GO
Fevereiro – 2015

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

**ESTUDO BIOTECNOLÓGICO E PERFIL QUÍMICO DE
PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS DE *Hyptis*
marrubioides Epling**

Autora: Rita Cássia Nascimento Pedroso
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Helena Januário

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde - Área de concentração Agroquímica.

Rio Verde – GO
Fevereiro – 2015

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

**ESTUDO BIOTECNOLÓGICO E PERFIL QUÍMICO DE
PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS DE HYPTIS
MARRUBIODES EPLING**

Autora: Rita Cássia Nascimento Pedroso
Orientadora: Ana Helena Januário

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2015.

Prof.^a Dr.^a Rosemeire Cristina
Linhari Rodrigues Pietro
Avaliador externo
UNESP

Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Avaliador interno
IF Goiano/RV

Prof.^a Dr.^a Ana Helena Januário
Presidente da banca
IF Goiano/RV

DEDICATÓRIA

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.” - Cora Coralina.

Dedico este trabalho
primeiramente a Deus, aos meus pais, Vitor
e Néia e aos meus irmãos Raiane e Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre caminhar junto comigo.

Aos meus pais, por me apoiarem em todas as minhas decisões me incentivar a nunca desistir.

Aos meus irmãos mesmo estando longe sempre junto comigo me apoiando, aconselhando e pelo carinho recebido.

À minha orientadora Dr.^a Ana Helena Januário, pela confiança, pelo incentivo, pela amizade, pela orientação, me ajudando sempre a me tornar uma pessoa melhor e pelo aprendizado que hoje me ajudou a chegar aonde estou.

Ao meu coorientador Dr. Fabiano Guimarães Silva, pela oportunidade, orientação e por oferecer toda a estrutura de laboratório necessária.

À minha coorientadora Dr.^a Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro Hara, por me orientar, aconselhar, ouvir, pela amizade oferecida, e por fazer com que minha caminhada neste período não fosse tão árdua e difícil.

Ao Instituto Federal Goiano, *Campus* Rio Verde e ao Curso de Pós-Graduação em Agroquímica.

Aos professores e servidores do programa de Pós-Graduação em Agroquímica.

Aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pela amizade oferecida, pelo apoio nos trabalhos, em especial a Núbia por sempre estar do meu lado nessa caminhada, acredito que ganhei uma verdadeira amiga, que estará sempre no meu coração.

Aos meus colegas do Laboratório GPNUF, pela amizade, apoio nos trabalhos, sempre com muito carinho, respeito e dedicação.

Aos colegas de mestrado por fazer esta caminhada mais alegre e divertida, mesmo nos momentos difíceis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), por ter me fornecido a bolsa de mestrado durante o período de realização de meus trabalhos.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Rita Cássia Nascimento Pedroso, natural de Cássia-MG, filha de Vitor Bastos Pedroso e Néia Lucia do Nascimento Pedroso, é graduada em química pela Universidade de Franca - Unifran possui curso técnico em Enfermagem pelo Cefan. Em março de 2013, iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Agroquímica, no Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, sob a orientação da professora Dr.^a Ana Helena Januário.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xiii
ABSTRACT	17
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Importâncias das plantas e seus metabólitos especiais	18
1.2 <i>Hyptis marrubioides</i> Epling	19
1.3 Cultura de tecidos	23
1.4 Elicitores abióticos	24
1.5 Esquistossomose	26
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
OBJETIVOS GERAIS	32
CAPÍTULO 2 – CULTIVO DE PLÂNTULAS DE <i>HYPTIS MARRUBIOIDES</i> COM INFLUÊNCIA DE DIVERSAS CORES DE LUZ	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
2.1 INTRODUÇÃO	35
2.2 METODOLOGIA	36
2.2.1 Material Vegetal e Cultivo <i>in vitro</i>	36
2.2.2 Crescimento das plântulas	39
2.2.3 Constituição química das plântulas <i>in vitro</i>	40
2.2.3.1 Obtenção dos extratos brutos	40
2.2.3.2 Preparo das soluções estoque e construção da curva do padrão externo	40

2.2.4 Análise cromatográfica	41
2.2.5 Delineamento Experimental	41
2.3 RESULTADOS	42
2.3.1 Composição Espectral do Armário colorido	42
2.3.2 Crescimento das plântulas	42
2.3.2 Análise Quantitativa da Rutina	45
2.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	50
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO 3 – CULTIVO DE PLÂNTULAS DE <i>HYPTIS MARRUBIOIDES</i> COM INFLUÊNCIA DE ELICITORES ABIOTICOS.....	54
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
3.1 INTRODUÇÃO.....	56
3.2 METODOLOGIA	57
3.2.1 Material Vegetal e Cultivo <i>in vitro</i>	57
3.2.2 1º procedimento	58
3.2.3 2º procedimento	58
3.2.4 Constituição química das plântulas <i>in vitro</i> elicitadas	59
Obtenção dos extratos brutos e construção da curva do padrão para a quantificação.....	59
3.2.5 Análise cromatográfica	59
3.2.6 Delineamento Experimental	60
3.3 RESULTADOS	60
3.3.1 Crescimento das plântulas	60
3.3.2 1º Procedimento.....	61
3.3.3 2º Procedimento.....	62
3.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	71
3.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA	73
CAPÍTULO 4 – PERFIL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE <i>HYPTIS</i> <i>MARRUBIOIDES IN VITO E EX VITRO</i>.....	75
RESUMO.....	75

ABSTRACT.....	76
4.1 INTRODUÇÃO.....	77
4.2 METODOLOGIA.....	78
4.2.1 <i>Hyptis in vitro</i>	78
4.2.2 Material Vegetal <i>in vitro</i>	78
4.2.3 Obtenção do extrato bruto	79
4.2.4 <i>Hyptis ex vitro</i>	79
4.2.5 Material Vegetal e obtenção do extrato bruto.....	79
4.2.6 Análise cromatográfica.....	80
4.2.7 Análises por CG/EM	80
4.2.8 Atividade Biológica.....	81
4.2.9 Ensaio da atividade esquistossomicida	81
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	83
4.3.1 Estudo fitoquímico	83
4.3.2 Análise por CG-EM dos extratos.....	84
4.3.3 Atividade biológica.....	87
4.3.4 Atividade esquistossomicida dos extratos	87
4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
5. CONCLUSÃO GERAL.....	92

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2	Página
Tabela 1. Classes de comprimento de onda.....	40
Tabela 2. Composição espectral, em porcentagem, dos comprimentos de onda das fontes de luz utilizadas.....	43
Tabela 3. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas expandidas de plântulas de <i>Hyptis marrubioides</i> , submetidas a 20 e 30 dias de avaliação.....	44
Tabela 4. Acúmulo de massa fresca e seca de plântulas de <i>H. marrubioides</i> cultivadas sob luzes coloridas	46
CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas de plântulas de <i>Hyptis marrubioides</i> , submetidas a 20 dias de tempo de elicitação.....	62
Tabela 2. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas de plântulas de <i>Hyptis marrubioides</i> , submetidas a 3 e 6 dias de tempo de elicitação.....	63
Tabela 3. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas expandidas de plântulas de <i>Hyptis marrubioides</i> , submetidas a 20 dias de avaliação.....	65
Tabela 4. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas expandidas de plântulas de <i>Hyptis marrubioides</i> , submetidas a 3 e 6 dias de avaliação.....	66

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Composição química dos extratos <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de <i>H. marrubioides</i>	86
Tabela 2. Potencial esquistossomicida de <i>Hyptis marrubioides in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	90
Tabela 3. Potencial esquistossomicida da redução da atividade motora não significativa e significativa de <i>Hyptis marrubioides in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	91

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Página
Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.....	20
Figura 2. Dados atualizados de 2014 sobre o gênero <i>Hyptis</i> nos bancos de dados da web of Science.....	21
Figura 3. Fotos da espécie <i>Hyptis marrubioides</i> Epling.....	22
Figura 4. Dados atualizados de 2014 sobre a espécie <i>Hyptis marrubioides</i> nos bancos de dados da Web of Science.....	23
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Sementes de <i>Hyptis marrubioides</i> (A), Germinação da semente (B), Crescimento da Plântula (C), Plântula de <i>Hyptis marrubioides</i> Epling (D)...	38
Figura 2. Plântulas de <i>H. marrubioides</i> com 10 dias de estabelecimento, destinadas ao tratamento de luzes. Luz branca (a), luz azul (b), luz verde (c), luz vermelha (d), luz amarela (e).....	39
Figura 3. Armário de luzes (a), Armário de luzes vedado com tecido preto (b).....	40
Figura 4. Condição Analítica Gradiente 5%, variação da concentração de metanol (CH ₃ OH) pelo tempo.....	42
Figura 5. Plântulas de <i>Hyptis marrubioides</i> com tratamento de luzes coloridas. Luz branca (a), luz azul (b), luz verde(c), luz vermelha (d) e luz amarela (e) no período de 20 e 30 dias.....	45
Figura 6. Curva padrão de calibração do padrão rotina, plotadas através da área do pico versus concentração em mg mL ⁻¹	47
Figura 7. Cromatograma e o espectro de UV obtido por CLAE-DAD da rotina.....	47
Figura 8. Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos extratos metanólicos das plântulas de <i>Hyptis marrubioides</i> , cultivadas sob luz branca (A), azul (B), verde (C),	

vermelha (D) e amarela (E), no período de 20 dias e espectro de UV relacionado a luz branca.....48

- Figura 9. Perfil cromatográfico obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marrubioides*, cultivadas sob luz branca (A), azul (B), verde (C), vermelha (D) e amarela (E), no período de 30 dias.....49
- Figura 10. Teor e rendimento da rutina aos 20 dias (A), e 30 dias (B) em plântulas de *H. marrubioides*, submetidas a diferentes comprimentos de onda de luz.....51

CAPÍTULO 3

- Figura 1. Condição Analítica Gradiente 5%, variação da concentração de metanol (CH_3OH) pelo tempo.....61
- Figura 2. Plântulas de *H. marrubioides* tratadas com elicitores. Controle (A), AgNO_3 30 μM (B), AgNO_3 60 μM (C), AS 30 μM (D), AS 60 μM (E). Período de 20 dias.....63
- Figura 3. Plântulas de *H. marrubioides* tratadas com elicitores. Controle (A), AgNO_3 30 μM (B), AgNO_3 60 μM (C), AS 30 μM (D), AS 60 μM (E). Período de 3 e 6 dias.....64
- Figura 4. Curva padrão de calibração do padrão rutina, plotadas através da área do pico *versus* concentração em mg mL^{-1} 67
- Figura 5. Perfil cromatográfico obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marrubioides* elicidadas, Controle (A), AgNO_3 30 μM (B), AgNO_3 60 μM (C), AS 30 μM (D), AS 60 μM (E), no período de 20 dias.....68
- Figura 6. Perfil cromatográfico obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marrubioides* elicidadas, Controle (A), AgNO_3 30 μM (B), AgNO_3 60 μM (C), AS 30 μM (D), AS 60 μM (E), no período de 3 dias.....69
- Figura 7. Perfil cromatográfico obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marrubioides* elicidadas, Controle (A), AgNO_3 30 μM (B), AgNO_3 60 μM (C), AS 30 μM (D), AS 60 μM (E), no período de 6 dias.....70
- Figura 8. Teor e rendimento de rutina. Tratamento 20 dias - 1º Procedimento (A). Tratamento 3 dias - 2º Procedimento (B). Tratamento 6 dias - 2º Procedimento (C) em plântulas de *H. marrubioides*, submetidas a diferentes concentrações de AgNO_3 e AS. MS = matéria seca.....72

CAPÍTULO 4

Figura 1. Germinação de <i>Hyptis marrubioides</i> Epling.....	80
Figura 2. Condição Analítica Gradiente 5%, variação da concentração de metanol (CH ₃ OH) pelo tempo.....	81
Figura 3. Inoculação das cercarias por via subcutânea em camundongos.....	83
Figura 4. Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> , vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	84
Figura 5. Cromatograma obtido por CLAE do extrato bruto da planta <i>ex vitro</i> de <i>Hyptis marrubioides</i>	84
Figura 6. Cromatograma obtido por CLAE do extrato bruto da planta <i>in vitro</i> de <i>Hyptis marrubioides</i>	85
Figura 7. Cromatograma total obtido via CG-EM de HM <i>ex vitro</i>	85
Figura 8. Cromatograma total obtido via CG-EM de HM <i>in vitro</i>	86
Figura 9. Proposta de estrutura química para os extratos obtidos de <i>H. marrubioides</i> : Aromadendrenepóxido (1), (3 beta,24S) stigmast-5-en-3ol (2).....	87
Figura 10. Espectro de massa obtido via CG-EM de HM <i>ex vitro</i>	88
Figura 11. Espectro de massa obtido via CG-EM de HM <i>in vitro</i>	89

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

μW – microwatts

AgNO₃ – Nitrato de Prata

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EM – Espectrometria de Massa

Hac – Ácido acético

HM – *Hyptis marruboides*

MF – massa fresca

MS – massa seca

MeOH – Metanol ou álcool metílico

MS – Murashigue e Skoog (meio de cultivo)

nm – nanômetro

S – Sul

SA – ácido salicílico

UNIFRAN – Universidade de Franca

UV – Ultravioleta

UV-VIS – Ultravioleta e Visível

W – Oeste

RESUMO

PEDROSO, RITA CÁSSIA NASCIMENTO, Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, fevereiro de 2015. **Estudo Biotecnológico e Perfil Químico de Plântulas de Micropropagadas de *Hyptis marrubioides* Epling.** Orientadora: Ana Helena Januário. Coorientadores (as): Alessandra Bolfino Hara e Fabiano Guimarães Silva.

Hyptis marrubioides é uma planta do Cerrado brasileiro e com nome popular descrito como hortelã-do-campo, que apresenta grande diversidade morfológica e potencial antioxidante. A investigação desta espécie, utilizando técnicas de cultura de tecidos através da elicitación abiótica se torna interessante para promover o aumento da produção de plantas saudáveis com elevado teor das substâncias de interesse. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da elicitación abiótica em plântulas de *Hyptis marrubioides in vitro* e explorar seu perfil químico e biológico. Utilizou-se como elicitores diferentes comprimentos de luz, nos espectros branco, azul, verde, vermelho e amarelo, além de ácido salicílico e nitrato de prata nas concentrações de 30 e 60 μM em dois cultivos distintos. Os parâmetros de crescimento, comprimento de parte aérea, o número de folhas, a massa fresca e seca foram investigados, bem como o teor de rutina por HPLC-DAD. O comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas apresentaram diferença significativa, para o período de 30 dias de exposição às luzes, aonde para a luz vermelha o comprimento chegou a 15,46 cm e em relação à luz branca com 9,20 cm. Maior abundância de massa seca foi observada no período de trinta dias para as plântulas cultivadas em luz vermelha com 26% de aumento em relação ao controle. Os extratos metanólicos das folhas do cultivo *in vitro* foram avaliados quanto ao teor do flavonoide rutina, sendo que para o período de 30 dias, para a luz azul e luz branca (controle) apresentaram valores semelhantes. Já as plântulas cultivadas sob luz amarela, vermelha e verde no período de vinte dias apresentaram valores médios bem semelhantes a 0,10 mg g^{-1} MS. Porém, o tratamento com os elicitores abióticos apresentaram semelhanças entre si quanto ao parâmetro de crescimento, enquanto o teor de rutina se apresentou abundante para o tratamento com AS na concentração de 30 μM , cultivado na segunda metodologia no período de 6 dias, com 4,80 mg g^{-1} MS enquanto o

controle com 0,27 mg g⁻¹ MS (17 vezes mais que o controle). Os extratos em acetato de etila foram analisados por CG-EM, respectivamente permitindo a identificação de duas substâncias o sesquiterpeno Aromadendrenepoxido e o fito esteroide estigmasterol. O potencial esquistossomicida do extrato bruto destes dois tipos de cultivo foi avaliado *in vitro* frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Os resultados indicaram que o extrato do campo (*ex vitro*), foi o mais ativo dentre os dois extratos brutos testados.

PALAVRAS-CHAVES: cultivo *in vitro*, elicitores abióticos, flavonoide, *Hyptis marrubioides*, HPLC-DAD.

ABSTRACT

PEDROSO, RITA CÁSSIA NASCIMENTO, Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, February 2015. **Biotechnologic Study and Chemical Profile of micropropagated seedlings of *Hyptis marruboides* Epling.** Advisor: Dra. Ana Helena Januário. Co-Advisors: Alessandra Bolfino Hara and Fabiano Guimarães Silva.

Hyptis marruboides is a Brazilian Cerrado plant and popular name described as mint field, which presents great morphological diversity and antioxidant potential. The investigation of this specie, using tissue culture techniques through abiotic elicitation becomes interesting to promote increased production of healthy plants with high levels of substances of interest. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of abiotic elicitation in seedlings of *Hyptis marruboides* in vitro and explore its chemical and biological profile. There were using as elicitors different wavelengths of light in the white, blue, green, red and yellow spectral, plus salicylic acid and silver nitrate in concentrations of 30 uM and 60 into two separate crops. Growth parameters, shoot length, number of leaves, fresh and dry weight were investigated, as well as rutin content by HPLC-DAD. The average length of shoots and average number of leaves showed significant differences for the period of 30 days of exposure to light, where to the red light the length reached 15.46 cm and the white light with 9.20 cm. Greater abundance of dry mass was observed in the 30 days period for the seedlings grown in red light with 26% increase compared to the control. The seedlings grown under yellow, red and green light in the twenty days period had similar average values of 0.10 mg g⁻¹ DM. However the treatment with abiotic elicitors were similar among them for growth parameter, while rutin content was high to treatment with SA at a concentration of 30 uM in the second method within 6 days, with 4.80 mg g⁻¹ DM while the control with 0.27 mg g⁻¹ DM (17 times more than the control). The ethyl acetate extrac were analyzed by CG-MS, respectively, allowing the identification of the two compounds aromadendrenepoxide and (3 beta, 24S) stigmast-5-on-3LO. The schistosomicide potential of crude extract of these two types of crop was evaluated *in*

vitro against adults worms of *Schistosoma mansoni*. The results indicated that the extract field (*ex vitro*), was the most active among both crude extracts tested.

KEY WORDS: *in vitro* cultivation, Abiotic elicitors, Flavonoid, *Hyptis marrubioides*, HPLC-PDA.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Importâncias das plantas e seus metabólitos especiais

Nos últimos anos tem crescido muito o interesse por substâncias extraídas de plantas para a produção de medicamentos para o homem. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem para os estudos multidisciplinares e a investigação preliminar de constituintes químicos presentes. (GOBBO-NETO E LOPES, 2007).

De fato, os metabólitos secundários ou também chamados de metabólitos especiais representam a interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais. (NAGAO et al., 2004). A idade e o desenvolvimento da planta, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (CASTRO et al., 2002).

Estudos relatam que a composição de metabólitos secundários da planta pode variar apreciavelmente durante as condições oferecidas para o desenvolvimento desta planta. A intensidade luminosa é um fator bastante relevante para determinadas espécies, influenciando na produção destes metabólitos especiais, seguido de outros fatores tão importantes para a adaptação e sobrevivência necessárias da planta.

Portanto, o metabolismo secundário pode variar significativamente dependendo de vários fatores (Figura 1). O efeito no crescimento, desenvolvimento e teor de princípios ativos em plantas, nada mais é do que a combinação dos fatores ambientais (vento, temperatura, luz umidade) que ocorrem de maneira diferente das quatro estações do ano (PINTO E BERTOLUCCI, 2002).

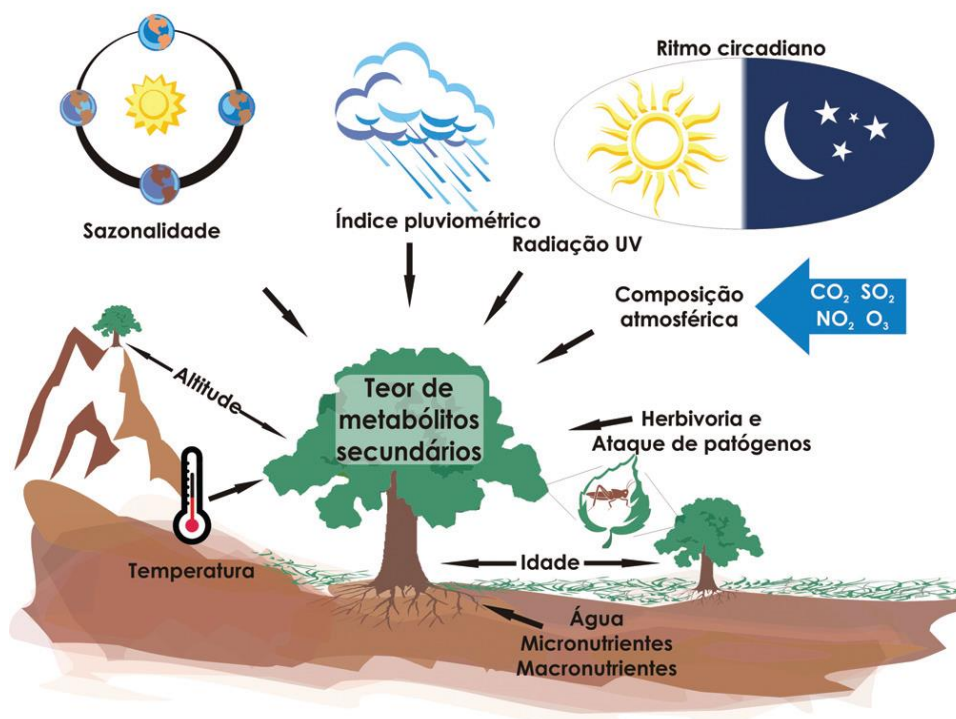


Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta. (GOBBO-NETO E LOPES, 2007).

A utilização da técnica de micropropagação possui grandes vantagens, na produção de mudas de excelente qualidade, melhorando seu potencial farmacológico (RAO E RAVISHANKAR, 2002), concedendo o aumento de plantas iguais a partir de plantas com alta qualidade (SERAFINI et al., 2001).

Além de combinar técnicas para o cultivo de plantas de alta qualidade e espécies com elevado potencial terapêutico, estimulando assim a biossíntese de metabólitos especiais (BHUIYAN E ADACHI, 2003; ZHAO et al., 2005).

1.2 *Hyptis marruboides* Epling

A Família Lamiaceae que pertence a ordem Tubiflorae, abrange cerca de 200 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies distribuídas em todo mundo, destacando o gênero *Hyptis* que inclui cerca de 75 espécies na América Tropical. A família Lamiaceae é relativamente bem estudada do ponto de vista químico. A respeito do seu metabolismo especial, apresenta grande variedade de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do ácido acético, da via do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista.

O gênero *Hyptis* é composto por aproximadamente 580 espécies e muitas destas possuem grande importância econômica e etnofarmacológica, são utilizadas para diversos fins medicinais, não apenas no Brasil (BARBOSA e RAMOS, 1992), mas também em outras localidades, tais como, Índia (MISRA et al, 1981; MUKHERJEE et al., 1984), Panamá (GUPTA et al., 1996).

Segundo dados atualizados na web of Science são encontrados 450 citações do gênero *Hyptis*.



Figura 2. Dados atualizados até novembro de 2014 sobre o gênero *Hyptis* nos bancos de dados da web of Science.

O gênero *Hyptis* possui grande diversidade morfológica, caracterizados por seus componentes aromáticos presentes nos óleos essenciais, os quais são usados como anestésicos, antiespasmódicos, anti-inflamatórios e podem induzir aborto em doses elevadas por causa de suas propriedades medicinais (BOTREL et al., 2010a e PORTER, 2010).

Este gênero se caracteriza por apresentar plantas com inflorescência composta, os frutos são 4 núculas ovoides, algumas vezes achatadas, mucilaginosas ou não, são ervas, arbustos ou raramente árvores com caules quadrangulares, folhas opostas com glândulas aromáticas (HARLEY, 1988). Muitas espécies são utilizadas como plantas ornamentais e condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que comunicam aos alimentos (FALCÃO E MENEZES, 2003). Esta espécie vegetal apresenta diversas atividades biológicas dentre elas, ação antitumoral, antifertilidade, antimicrobiana, mitotóxica e fitotóxica.

Hyptis Marrubioides conhecida como hortelã-do-campo, é uma espécie do Cerrado brasileiro, com uso popular consagrado contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras (HARLEY, 1988; CASTRO et al., 2002).

A espécie *H. marrubioides*, apresenta alto teor de substâncias fenólicas, especialmente flavonoides, indicando possível potencial antioxidante segundo Falcão e Menezes, 2003 e Povh et al., 2012.



Figura 3: Fotos da espécie *Hyptis marrubioides* Epling. Foto: (Rita Pedroso)

A maioria dos estudos químicos a *H. marrubioides* está relacionada com a composição química de óleos essenciais, cujos principais componentes são os sesquiterpenos, o cariofila-4(14), 8(15)-dien-5 β -ol, eudesma-4(15), 7-dien-1 β -ol, óxido de cariofileno e (β)-cariofileno. (BOTREL et al., 2010).

São poucos relatos na literatura sobre esta espécie, seguem os dados referentes a *H. marrubioides* encontrados na web of Science até novembro de 2014.



Figura 4. Dados atualizados até novembro de 2014 sobre a espécie *Hyptis marrubioides* nos bancos de dados da web of Science.

Botrel et al. (2010a), descreveram a composição química do óleo essencial de *H. marrubioides* cultivada no campo e na estufa, constatando porcentagem mais elevada de seus compostos no óleo essencial da espécie cultivada no campo. Em outro estudo, Botrel et al. (2010b) avaliaram a influência da sazonalidade no teor destes óleos e na sua composição, delineando experimentos nas quatro estações do ano. A estação verão foi a mais satisfatória, sendo a quantidade de óleo essencial encontrada nesta estação maior do que nas demais. Adicionalmente, Botrel et al. (2010b) constatou que a idade da planta, inteirada com a disponibilidade nutricional, também constitui fator de variação para a composição química do óleo essencial desta espécie, além dos fatores genéticos, eco fisiológicos e ambientais.

Em estudos prévios realizados no IF - Goiano com plântulas de *H. marrubioides*, estabelecidas por Vitorino, (2012), revelou a capacidade de isolados endofíticos da raiz desta espécie na solubilização com fosfato de cálcio em GELP médio e com fosfato de ferro nas modificações em meio basal. Em outro estudo complementar a comunidade endofítica radicular de *H. marrubioides* foi caracterizada, detectando as bactérias e fungos endofíticos presentes (VITORINO, 2012b).

O potencial antifúngico de *H. marrubioides* é pouco explorado, no entanto estudos recentes realizados por da Silva et al. (2012a) revelaram que o óleo essencial desta espécie tem prevenido o tratamento da ferrugem da soja Asiática, assim os testes *in vivo* apresentaram 100% de inibição da germinação de *Phakopsora pachyrhizi*, principal agente etiológico desta doença. Também foram relatados por Silva et al. (2014) que óleos de *H. marrubioides*, *Cordia verbenacea* e *Aloysia gratissima* inibem a

germinação e a produção de conídios, bem como o crescimento de *Colletotrichum truncatum*, em análises de semente de soja infectadas.

Costa et al. (2014) relatam a avaliação da eficiência fotossintética das plantas. Neste estudo, os autores utilizaram a metodologia convencional para medir trocas gasosas de plantas cultivadas *in vitro*, analisando o efeito da irradiância, taxa de fluxo, e umidade relativa do ar na taxa fotossintética em duas espécies de plântulas. E demonstraram que ambas as espécies *H. Marrubioides* e *H. speciosa* plântulas crescidas *in vitro* tem aparato fotossintético funcional, respondendo as variações de certas condições de medição que exhibe uma taxa de assimilação de CO₂.

1.3 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos hoje no Brasil é uma realidade não apenas em muitos laboratórios acadêmicos, senão também em empresas privadas. A micropropagação *in vitro* possibilitou avanços no campo do melhoramento por meio de transformação de plantas, ou seja, permitiu a ocorrência de rearranjos genéticos no material vegetal, sob condições *in vitro*, os quais, por meio exclusivo do melhoramento tradicional, seriam muito demorados e caros. Assim, a técnica de cultura de tecidos de planta *in vitro*, permite o aumento da produção e causa menos danos ambientais, por isso contribui para que os laboratórios e os países que adotam tenham mais vantagens competitivas. (BARRUETO, 2000; 2010).

A propagação *in vitro* de plantas, chamada também de micropropagação é a técnica de propagar plantas dentro de tubos de vidro, sob condições adequadas de assepsia, nutrição, e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂, requer a análise de alguns parâmetros, tais como explante, assepsia, meio nutritivo, etc., os quais são importantes na compreensão do trabalho *in vitro*.

Existem vários fatores que influenciam o crescimento *in vitro*, de plantas, dentre eles pode-se citar o meio de cultura, a orientação do explante, a posição do seguimento nodal e a origem do explante (BOTREL, 2012).

Em geral a cultura de tecidos permite a obtenção de muitos outros benefícios tais como taxas mais elevadas de multiplicação, menos necessidade de espaço físico, ausência de pragas e de doenças, além de ser uma técnica mais segura, por causa do maior controle dos fatores envolvidos. Logo, as realizações de novos estudos

direcionados nesta área são de grande importância (JURADO, 2010). A determinação da taxa de multiplicação *in vitro* pode depender do tipo da espécie estudada (BOTREL, 2012).

A seleção e o desenvolvimento do meio de cultura são essenciais para qualquer trabalho em cultura de tecidos de plantas. Dentre os componentes essenciais do meio de cultivo estão a água, sais inorgânicos, vitaminas, fonte de carbono e os fitoreguladores (COHEN, 1995). Há numerosos meios de cultura citados na literatura para a indução de calogênese e morfogênese, porém o meio de Murashige & Skoog (MS) (1962) é o mais utilizado (FLORES et al., 2006).

A utilização de elicitores (agentes químicos, físicos e biológicos), para alterar as rotas metabólicas afeta qualitativamente e quantitativamente as moléculas produzidas (DJILIANOV et al., 2005). Sendo que o tempo de elicitação a concentração utilizada e o estágio de crescimento da cultura bem como a maneira como o elicitor é administrado na espécie são fatores importantes para a promoção de alterações nas rotas metabólicas de interesse (DÖRNENBURG E KNORR, 1996).

1.4 Elicitores abióticos

Trabalhos têm mostrado a utilização de elicitores para controle de fitopatógenos, produção e aumento de síntese de vários metabólitos vegetais, além disso, a utilização de elicitores (agentes químicos e estressantes) permite alterar as rotas metabólicas afetando qualitativamente e quantitativamente as moléculas bioativas produzidas (DJILIANOV et al., 2005).

Elicitores bióticos e abióticos vêm sendo utilizados em cultura de tecidos vegetais, com o intuito de maximizar a produção de compostos químicos de interesse, conhecidos como metabólitos especiais incluindo terpenos, flavonoides, alcaloides, betacianinas e fenilpropanoides, entre outros (BHUIYAN E ADACHI, 2003; ZHAO et al., 2005).

A luz é um fator fundamental para as plantas, denominada também como um elicitor abiótico atua na ação direta ou indireta do crescimento e desenvolvimento da planta (MORINI E MULEO, 2003). As respostas da planta não dependem apenas de ausência ou presença de luz, mas também da variação em qualidade luminosa (FELIPPE, 1986).

A luz é um fator físico que desencadeia sinais internos de ativação ou inativação de vias metabólicas nas sementes e nas plantas (BHATTACHARYA E KHUSPE, 2001; KERBAUY, 2008). A ação da luz na regulação fisiológica do vegetal é precedida pela absorção de três fotorreceptores: Fitocromo, Criptocromo e Fotorreceptor (FERRI, 1985; HOPKINS, 2000; SALISBURY, 1991). Além do fator luz como elicitador abiótico empregado na planta, pode-se citar outros tipos de elicitores abióticos, tais como o ácido salicílico e nitrato de prata.

Dados de literatura relatam o acréscimo do ácido salicílico (AS) nas plantas regulando a via de formação dos flavonoides, sendo considerado por alguns autores como um fitohormônio envolvido nas reações de defesa da planta, induzindo a resposta sistêmica adquirida (CURTIS et al., 2004). Além de desencadear tais respostas, também estão envolvidos na ativação de genes relacionados a respostas de estresse a seca, ao frio, ao calor, a salinidade e a radiação UV (PENG E JIANG, 2006).

O ácido salicílico é um fitohormônio pertencente ao grupo bastante diversificado das substâncias fenólicas, sintetizado por via fenilpropanoide, a partir da L-fenilalanina, que, por ação da fenilalanina amônio-liase (PAL), origina o ácido trans-18 cinâmico (KERBAUY, 2008). É amplamente distribuído nas plantas tanto nas folhas quanto nas estruturas reprodutivas (COLLI, 2008).

De acordo com Sánchez et al. (2010), os resultados de uma extensa pesquisa sobre as duas últimas décadas têm demonstrado que ácido salicílico desempenha papel importante em vários aspectos de respostas de defesa após o ataque do patógeno.

Outro elicitador com alguns estudos é o nitrato de prata, diversos autores descrevem a ação do nitrato de prata (AgNO_3) inibindo a ação do etileno (AL-KHAYRI E AL-BAHRANY, 2001; OZDEN-TOKATLI et al., 2005). De acordo com Giridhar et al. (2001), o uso de nitrato de prata tem efeito positivo nos estudos de enraizamento de plantas *in vitro*. Outro fator observado é a produção de etileno podendo estimular a resposta embriogênica em alguns sistemas, enquanto a inibição em outros. Ambos os efeitos do etileno foram observados na resposta embriogênica de café e que está de acordo com as respostas geralmente observadas para os reguladores de crescimento: um efeito estimulante na concentração e a inibição de níveis supraótima. (PASCAL et al., 2001).

Íons de prata são considerados um dos inibidores mais eficazes desta ação do etileno. Embora o seu efeito não seja bem compreendido, supõe-se que o íon de prata se liga ao possível receptor de etileno na membrana plasmática, inibindo assim a ligação

do etileno com o receptor e, conseqüentemente provocando sua ação específica. (TEIXEIRA et al., 2002).

De acordo com as condições em que se encontram as células em cultura e dos estímulos recebidos (bióticos ou abióticos), estas passarão a produzir, em maior ou menor escala, produtos do seu metabolismo secundário. Diversas estratégias têm sido empregadas a fim de aumentar os valores de produtividade de determinados compostos que apresentam grande valor do ponto de vista social e econômico (MARASCHIN et al., 2002).

1.5 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada que afeta mais de 207 milhões de pessoas, sendo que aproximadamente 20 milhões têm conseqüências graves. Causada pelo parasita trematódeo da espécie *Shistosoma mansoni*, conhecido no Brasil com o nome popular de doença do caramujo ou barriga d'água, (BRASIL, 2009), esta parasitose está distribuída em 74 países dos continentes Africano, Asiático e Americano, e cerca de 779 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair algum tipo de esquistossomose (STEINMAMM et al., 2006 ; WHO, 2010).

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) a esquistossomose humana continua avançando em novas áreas, impulsionadas por fatores sociais, econômicos e a má organização nos projetos de irrigação e ocupação de terras nos países em desenvolvimento (CHITSULO et al., 2000).

A área endêmica no Brasil abrange 19 estados com aproximadamente 42 milhões de habitantes expostos ao risco, e cerca de 7 milhões de indivíduos infectados pelo parasita, provocando 505 óbitos no Brasil entre os anos de 2000 a 2010, as pessoas acometidas com esta doença apresentam graves deficiências, provocando assim sérios problemas de saúde em um país em desenvolvimento (LAMBERTUCCI E BARRAVIEIRA, 1994; KING, 2009; MELO E COELHO, 2005; BRASIL, 2011b).

A infecção severa crônica desta doença pode resultar em hipertensão portal caracterizada por hepatoesple no-megalia, varizes esofágicas e ascite. Pela inexistência de vacinas e de ações eficazes em saúde pública, as drogas são as principais ferramentas no controle da esquistossomose. Frente a este quadro, o desenvolvimento e a descoberta de novos fármacos são de extrema necessidade como alternativa para o praziquantel,

medicamento mais utilizado no controle da esquistossomose em todo o mundo, no entanto, ocasiona efeitos colaterais indesejados (HAGAN et al., 2004). Esta substância é efetiva contra todas as espécies de *Schistosoma* (KOROLKOVAS,1998; DOENHOFF et al.,2000; FENWICK et al., 2003) porém sua administração em grávidas deve ser evitada, podendo provocar aborto (PARASITOLOGIA, 2011).

Além disso, o praziquantel não previne a reinfeção, e há relatos de linhagens resistentes a este medicamento (FALLON et al., 1988;MAGNUSSEN et al., 2003). A importância da busca de novos fármacos é uma possibilidade para o tratamento da esquistossomose frente ao uso do praziquantel.

1.6 Referências Bibliográficas

AL-KHAYRI, J.M.; AL-BAHRANY, A.M. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date. **Current Science**, v.81, p.1166-1170, 2001.

BARBOSA, P.P.P.; RAMOS, C.P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq in rats. **Phytother. Res.**, v.6, p.114-115, 1992.

BARRUETO CID, L.P. (Ed.). Embrapa Informação Tecnológica. Brasília: **Cultivo in vitro de plantas**, p. 303, 2010.

BARRUETO CID, L.P. (Ed.). Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília: **Introdução aos hormônios vegetais**, p. 205, 2000.

BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 91, p. 39-49, 2001.

BHUIYAN, N.H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v.160, p.1117-1124, 2003.

BOTREL, P.P. et al. Teor E Composição Química Do Óleo Essencial De *Hyptis marrubioides* Epl. Lamiaceae em Função Da Sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 533-538, 2010 a.

BOTREL, P.P. et al. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marrubioides* Epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Quim. Nova**, v. 33, p. 33-37, 2010b.

BRASIL (b). Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Esquistossomose mansoni no Brasil. Coordenação Geral de Doenças Negligenciadas. Programa de

Vigilância e Controle da Esquistossomose. Junho de 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresent_esquistossomose_mansoni_30_05_2011.pdf. Acessado em 22 de junho de 2011.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistencia Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM**, Brasília, 2009.

CASTRO, D.M.; MING, L.C.; MAREQUES, M.O.M. Composição fito química dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (MILK).N.E.Br e diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 75-79, 2002.

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control *Nat Genet*, v. 35, p.139-147, 2000.

COLLI, S. Outros Reguladores: Brassinosteróides, Poliaminas, Ácidos Jasmônico e Salicílico.In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.296-302. 2008.

CURTIS, H.; NOLL, U.; STORMANN, J.; SLUSARENKO, A.J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.65, p.79-89, 2004.

DJILIANOV, D. et al. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.115-118, 2005.

DOENHOFF, M.; KIMANI, G.; CIOLI, D. Praziquantel and the control of schistosomiasis **Parasitol Today**, v.16, p. 364-366, 2000.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Rev. Bras. Farm.**, v. 84, p.68-74, 2003.

FALLON, G.P. et al. Investigation of plants used in Jamaican folk medicine for anti bacterial activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p.1455” 1460, Dez. 1999.

FELIPPE, G.M. Fotomorfogênese. In: FERRI, M.G. (coord.) **Fisiologia Vegetal 2**. São Paulo: EPU, 2.ed., p.231-280, 1986.

FENWICK, A. et al. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol**, v.19, p. 509-515, 2003.

FERRI, M. G. (Coord.) **Fisiologia Vegetal, volumes 1. e 2.** 2nd ed. São Paulo: EPU,p 361,1985.

FLORES, R.; JOSEILA, M.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia Tuberosa* (spreng). Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, p. 845-851, 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P; Plantas Mediciniais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p.374-381, 2007.

GUPTA, M. P. et al. Screening of Panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. **Int. J. Pharmacognosia**, v. 34 (1), p. 19-27, 1996.

HAGAN, P. et al. Schistosomiasis control: keep taking the tablets **Trends Parasitol**, v. 20, p. 92-97, 2004.

HARLEY, R. M. Evolution and distribution of Eriope (Labiatae) and its relatives in Brasil; Vanzolini, P. E.; Heyer, W. R., **Academia Brasileira de Ciências**, v.17, 1988.

HATANAKA, T. et al. O papel do etileno na embriogênese somática a partir de discos de folhas de *Coffe. CANEPHORA*. **Usina Ciência**, v 107, p. 199-204, 1995.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., p.512, 2000.

JURADO, L. R.S. Jr-**Empresa Júnior de Engenharia Biotecnológica, 2010**. Disponível em: <<http://www.biotecjr.com/>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

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

KING, C.H. Toward the elimination of schistosomiasis **N Engl J Med** v. 360, p.106-109, 2009.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Ed. Guanabara Koogan, p.10-18, 1997/1998.

LAMBERTUCCI, J. R. & BARRAVIERA, B. Esquitossomose monsonica: estudo clínico. **Jornal Brasileiro Medicina** v.67, p.59-100, 1994.

MAGNUSSEM, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. **Acta Trop.** V.86, p.243-254, 2003.

MARASCHIN, M. et al. Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical approach in *Mandevilla velutina* cultured cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.633-643, 2002.

MELO, A.L. & COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed São Paulo: Atheneu p 193-212, 2005.

MISRA, T. N. et al. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. Part I. Spectral and biological studies on a triterpene acid. **Journal of Natural Products**, v. 44 (6), p. 735-738, 1981.

MORELLI, G.; RUBERTI, I. Shade avoidance response, driving auxin along lateral routes. **Plant Physiology**, v. 122, p. 621-626, 2000.

MUKHERJEE, K. S.; MUKHERJEE, R. K.; GHOSH, P. K. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. **Journal of Natural Products**, v. 47 (2), p. 377-378, 1984.

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

NAGAO, E. O.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; MEDEIROS FILHO, S.; MARCO, C. A.; **Rev. Ciên. Agron**, v.35, p.355, 2004.

OZDEN-TOKATLI, Y. et al. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, v.106, p.415-426, 2005.

PARASITOLOGIA Integrada. Universidade Federal do Tocantins (UFT). **Estudos de Fármacos: Praziquantel.** Disponível em: <http://www.uft.edu.br/parasitologia/pt_BR/farmacos/praziquantel/>. Acesso em 15 dez.2011.

PENG, L.; JIANG, Y. 2006. Exogenous salicylic acid inhibits browning of fresh-cut Chinese water chestnut. **Food Chemistry**, v.94, p.535-540, 2006.

PORTER, R.; FACEY, P.; MCNEIL, M. Essential Oils from the *Hyptis* genus – A Review (1909-2009). **NPC Natural Product Communications**, v.6, p.1775-1796, 2011.

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

SALISBURY, F. B., ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4th ed. California: Wadsworth Publishing Company, Inc., p.682, 1991.

SÁNCHEZ, G. R.; MERCADO, E. .C.; PEÑA, E. B.; DE LA CRUZ, H. R.; PINEDA E. G. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. **Revista de la DESciencias Biológico Agropecuarias**. v. 12, p. 90-95, 2010.

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

SILVA, A.C. et al. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 305-313, 2012b.

SILVA, A.C. et al. Essential oils for preventative treatment and control of Asian soybean rust. **Eur J.Pathol**, v.134, p. 865-871, 2012a.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review meta-analysis and estimates of people at risk *Lancet Infect Dis*, v. 6, p. 411-425, 2006.

TEIXEIRA, JB, et al. Otimização da Metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.) . Brasília: **EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p.26. (Documentos, 79), 2002.

VITORINO, L.C. **Caracterização da Comunidade Endofítica Radicular de *Hyptis marruboides* Epling, Potencial Biotecnológico e Perfil Químico induzido por essa comunidade em Plântulas Micropropagadas.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Câmpus Rio Verde, Rio Verde, 2011.

VITORINO, L.C. et al. Solubilization of calcium and iron phosphate and in vitro production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae). **International Research Journal of Biotechnolog**, v. 3, p. 47-54, 2012a.

WHO-WORD HEALTH ORGANIZATION GLOBAL HEALTH.
<<http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>> Acesso em: 30 de agosto de 2013.

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

OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve por objetivo estabelecer plântulas *in vitro* de ***Hyptis marrubioides* Epling** com o emprego de elicitores abióticos, investigar o seu perfil fitoquímico e potencial esquistossomicida.

CAPÍTULO 2 – CULTIVO DE PLÂNTULAS DE *HYPTIS MARRUBIODES* COM INFLUÊNCIA DE DIVERSAS CORES DE LUZ.

RESUMO

Hyptis marruboides conhecida como hortelã-do-campo, é uma espécie do Cerrado brasileiro, com uso popular consagrado contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras. A maioria dos estudos químicos à *H. marruboides* está relacionado à composição química de óleos essenciais. O objetivo do trabalho foi cultivar plantas *in vitro* sob elicitación de diversos espectros de luz como branca, azul, verde, vermelha e amarela, sob irradiância de 47 a 50 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16h com período de 20 e 30 dias de cultivo. Após o cultivo foi avaliado teor de rutina por HPLC-DAD. Avaliou-se comprimento da planta e número de folhas/planta, massa fresca da parte aérea e massa seca e posteriormente o teor de rutina nestas amostras. O comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas apresentaram diferença significativa, para o período de 30 dias de exposição às luzes, e para a luz vermelha o comprimento chegou a 15,46 cm e em relação a luz branca com 9,20 cm. Maior abundância de massa seca foi observada no período de trinta dias para as plântulas cultivadas em luz vermelha com 26% de aumento em relação ao controle. Para a luz azul e luz branca (controle) apresentaram valores semelhantes e superiores ao teor obtido em 20 dias. Já as plântulas cultivadas sob luz amarela, vermelha e verde no período de vinte dias apresentaram valores médios em torno de 0,10 mg g^{-1} MS.

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecidos, *Hyptis marruboides*, qualidades da luz.

ABSTRACT

Hyptis marrubioides known as mint field, is a species of the Brazilian Cerrado, with popular use established against gastrointestinal infections, skin infections, pain and cramps. Most chemical studies are related to *H. marrubioides* chemical composition of essential oils. The objective was to grow plants under *in vitro* elicitation of various spectrums of light as white, blue, green, red and yellow, under irradiance 47 to 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and photoperiod of 16 h with period of 20 and 30 days of cultivation. After culture it was evaluated the rutin content by HPLC-DAD evaluated the plant length and number of leaves by plant, fresh weight of shoot and dry mass and subsequently the rutin content in these samples. The average length of shoots and average number of leaves showed a significant difference, for the period of 30 days of exposure the lights where for red light the length reached 15.46 cm, compared to white light with 9.20 cm. Greater abundance of dry mass was observed in the thirty day period for the seedlings grown in red light with 26% of increase compared to the control. The blue and white light (control) had higher and similar values of the amount observed in 20 days. The seedlings grown under yellow, red and green light in the twenty day period showed similar average values around 0.10 mg g^{-1} DM.

KEY WORDS: Tissue culture, *Hyptis marrubioides*, qualities of light.

2.1 Introdução

Hyptis marruboides conhecida como hortelã-do-campo é uma espécie do Cerrado brasileiro, com uso popular consagrado contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras. O resultado do balanço entre a formação e sua transformação, que ocorrem durante o crescimento desta planta é a composição dos metabólitos secundários (HARLEY, 1988; CASTRO et al., 2002).

A maioria dos estudos químicos a *H. marruboides* está relacionada com a composição química de óleos essenciais, cujos principais componentes são os sesquiterpenos, cariofila-4(14), 8(15)-dien-5 β -ol, eudesma-4(15), 7-dien-1 β -ol, óxido de cariofileno e (β)-cariofileno.

Botrel et al. (2010a), descreveram a composição química de *H. marruboides* cultivada no campo e na estufa, constatando porcentagem mais elevada de seus compostos no óleo essencial da espécie cultivada no campo.

Contudo a utilização da técnica de micropropagação possui grandes vantagens, na produção de mudas de excelente qualidade, melhorando seu potencial farmacológico (RAO E RAVISHANKAR, 2002), concedendo o aumento de plantas iguais e de alta qualidade (SERAFINI et al., 2001). Além de combinar técnicas para o cultivo de plantas de alta qualidade e espécies com elevado potencial terapêutico, estimulando assim a biossíntese de metabólitos especiais (BHUIYAN E ADACHI, 2003; ZHAO et al., 2005). A espécie *H. marruboides*, apresenta alto teor de substâncias fenólicas segundo Falcão e Menezes, 2003.

A luz é um fator fundamental para as plantas, denominada também como elicitor abiótico atua na ação direta ou indireta do crescimento e desenvolvimento da planta (MORINI E MULEO, 2003). As respostas da planta não dependem apenas de ausência ou presença de luz, mas também da variação em qualidade luminosa (FELIPPE, 1986). A ação da luz em plantas ocorre principalmente em dois aspectos. Primeiro, a luz fornece a fonte de energia exigida pela planta através da fotossíntese. Em segundo lugar, a luz é um sinal recebido por fotorreceptores para regular o crescimento, a diferenciação e o metabolismo vegetal (WANG et al., 2001).

De acordo com o comprimento de onda de luz, a planta desencadeia reposta específica, a luz vermelha (660 nm), por exemplo, controla germinação, o cloroplasto, o crescimento de caule e pecíolo, e ambos os comprimentos exercem influência na floração e na expressão de genes (CARVALHO E FLOTA, 2014).

A luz é um fator físico que estimula sinais internos de ativação ou inativação de vias metabólicas nas sementes e nas plantas (BHATTACHARYA E KHUSPE, 2001; KERBAUY, 2008). A ação da luz na regulação fisiológica do vegetal é precedida pela absorção por três fotorreceptores, tais como:

Fitocromo – apresenta absorção no azul; Criptocromo – absorve a luz azul e ultravioleta (UV-A, 320 a 400nm); Fotorreceptor de UV-B – absorvem radiação ultravioleta na faixa de 280 a 320 nm. (FERRI, 1985; HOPKINS, 2000; SALISBURY, 1991).

Este trabalho objetivou avaliar a influência da qualidade da luz no cultivo de *Hyptis marruboides*, e quantificar o teor do flavonoide rutina.

2.2 Metodologia

O cultivo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, e a análise do perfil químico foi conduzida no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UNIFRAN – Universidade de Franca – SP.

2.2.1 Material Vegetal e Cultivo *in vitro*

Os materiais vegetais utilizados foram sementes das espécies *H. marruboides* Epling, as mesmas foram imersas em solução contendo 2 fungicidas sistêmicos, 0,2% de Bendazol (Carbendazin) e 0,2% Alterno (Tebulonazole), durante 1 hora e em seguida, em hipoclorito de sódio puro por 30 minutos, lavadas em água estéril por (3x), o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar e pH 5,8. Foram utilizados tubos contendo 20 mL de meio. As culturas foram incubadas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de 23± 1°C.

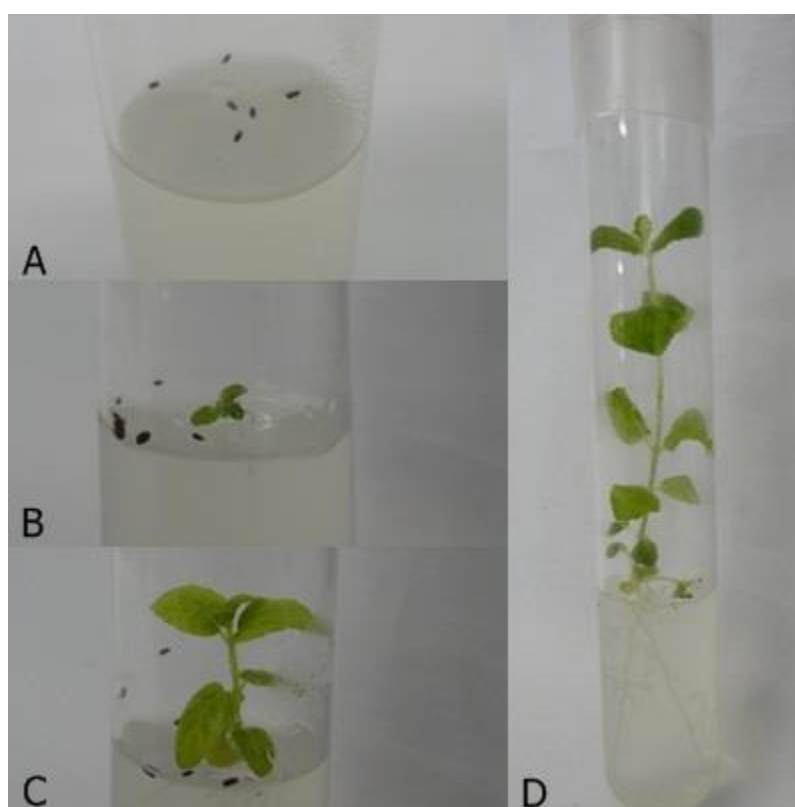


Figura 1. Sementes de *Hyptis marrubioides* (A), Germinação da semente (B), Crescimento da Plântula (C), Plântula de *Hyptis marrubioides* Epling (D).

Após trinta dias as plântulas obtidas foram repicadas, utilizando explantes da espécie, oriundo da multiplicação *in vitro*. As plântulas foram padronizadas com cerca de 1,0 a 1,5 cm de comprimento contendo uma ou duas gemas axilares, novamente o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar e pH 5,8. Foram utilizados frascos contendo 50 mL de meio nutritivo, com 5 explantes em cada, totalizando 40 plantas. Foram encaminhados para a sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de 23± 1°C.

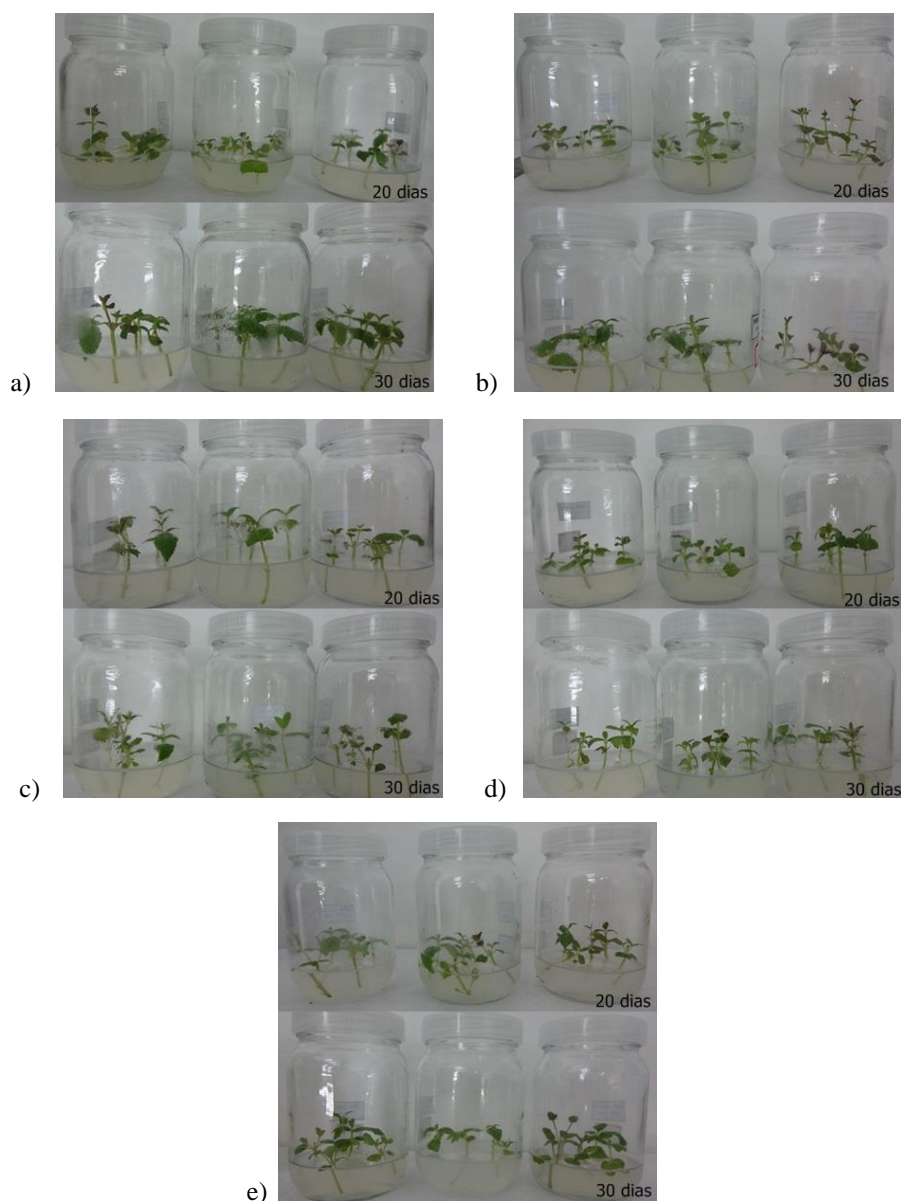


Figura 2. Plântulas de *H. marrubioides* com 10 dias de estabelecimento, destinadas ao tratamento de luzes. Luz branca (a), luz azul (b), luz verde (c), luz vermelha (d), luz amarela (e).

Após 10 dias de estabelecimentos (figura 2) as plantas foram transferidas para ambientes iluminados com diferentes lâmpadas coloridas, que emitiam a cor branca, azul, verde, vermelha e amarela na região do espectro visível (Tabela 1). As lâmpadas da marca Taschibra[®] TP 40w, numa irradiância de 47 a 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sob fotoperíodo de 16h. As plântulas permaneceram nestes ambientes por 20 e 30 dias. O armário de luzes utilizado foi vedado com tecido preto para evitar interferência das luzes umas com as outras e com o ambiente externo.

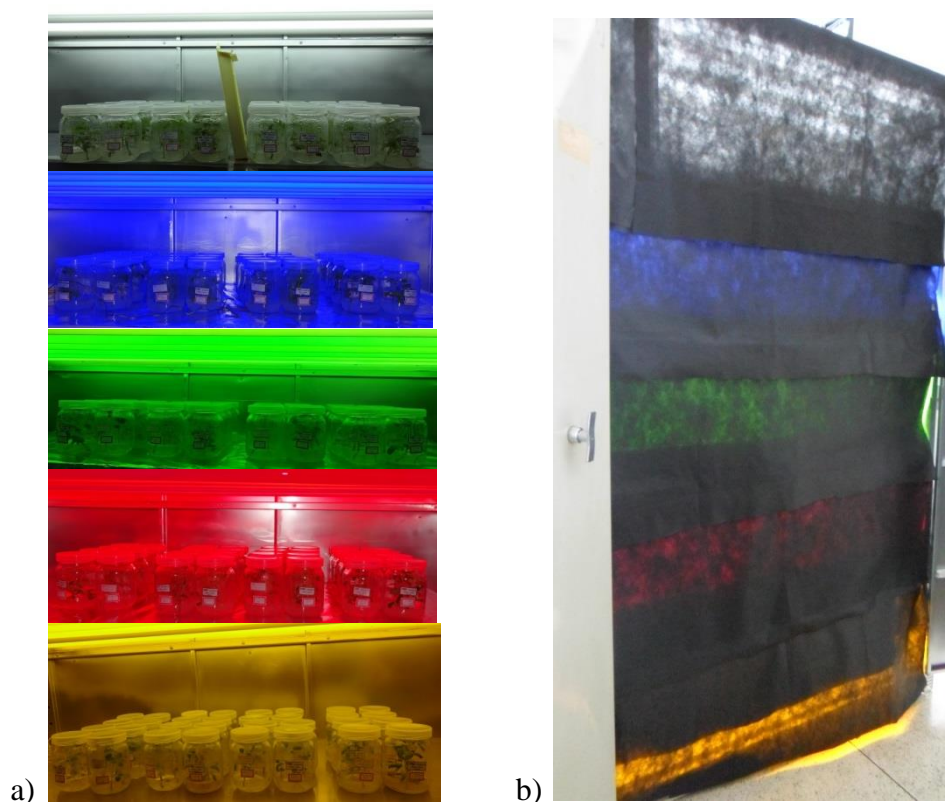


Figura 3. Armário de luzes (a), Armário de luzes vedado com tecido preto (b).

Tabela 1. Classes de comprimento de onda.

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

Fonte: TAIZ e ZEIGER, 2013.

2.2.2 Crescimento das plântulas

A avaliação final das plantas foi realizada observando se a massa fresca, massa seca, e comprimento da parte aérea e número de folhas /planta, após 20 e 30 dias de crescimento no armário. Ao final as plantas foram retiradas dos frascos e em seguida foram pesadas individualmente. De imediato estas plântulas foram levadas a estufa de

ventilação forçada a 35 °C até atingirem massa constante, e novamente pesadas, obtendo a massa seca, o material seco foi armazenado em local fresco e seco para a realização das análises químicas.

2.2.3 Constituição química das plântulas *in vitro*

2.2.3.1 Obtenção dos extratos brutos

Foram utilizadas partes aéreas das plantas de *H. marruboides* cultivadas *in vitro*, secas em estufa de ventilação forçada a 35 °C até estabilização da massa. Após maceração e pesagem de 100 mg deste material, fez-se a extração adicionando 4 mL de metanol - HPLC, e banho em ultrassom por 30 min. Posteriormente, foi realizada a filtragem dos extratos com algodão e em filtro com membrana (Advantec HP020AN – 20 µm). Alíquotas de 1000 µL foram pipetadas, com auxílio de pipeta automática, para frascos de 1 ml e analisadas por HPLC-DAD. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.2.3.2 Preparo das soluções estoque e construção da curva do padrão externo

Para obtenção da curva padrão de calibração, empregou-se o flavonoide rutina como padrão. Foi pesado 1 mg deste padrão e adicionado 2000 µL de metanol - HPLC a fim de se obter a solução estoque na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Partindo da solução estoque se realizou a sequencia de dissoluções seriadas nas concentrações 0,25; 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹.

As soluções diluídas nas diferentes concentrações foram transferidas (~ 1 mL) para frascos de 1 mL em triplicata, para subsequente corrida em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo SHIMADZU Proeminence-LC-20AD. Os dados da área do pico de interesse deste padrão foram tabelados e construção da curva de calibração obtida.

2.2.4 Análise cromatográfica

Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, de sistema binário SHIMADZU Proeminence-LC-20AD, equipado com injetor automático SIL-20A HT, acoplado ao detector: UV-VIS modelo SPD-M20A com arranjo de diodo. A coluna analítica usada foi da Phenomenex Phase GEMINI, (250 x 4,6 mm, 5 μ m), C18, equipada com pré-coluna de mesmo material, e forno CTO-20A. O volume injetado foi de 20 μ L, fluxo foi de 1 mL min^{-1} e λ 254 nm. A temperatura permaneceu constante em 40 °C. A análise foi efetuada em 60 min com eluente em gradiente linear: CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (5: 94,9: 0, 1 v/v/v), CH₃OH 100% em 30 min, 10 min em MeOH 100% e 20 min para retornar a condição inicial (figura 4). O padrão externo utilizado foi a rutina. A aquisição de dados foi realizada através de um microcomputador.

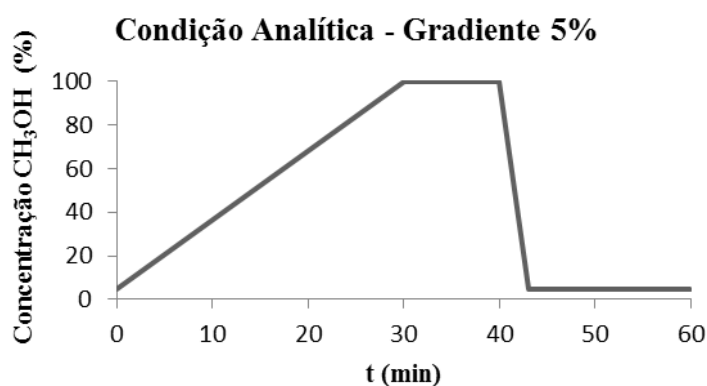


Figura 4. Condição Analítica Gradiente 5%, variação da concentração de metanol (CH₃OH) pelo tempo.

2.2.5 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 5x2 (5 tipos de luzes x 2 tempos de avaliação) e cada tratamento continha 4 repetições, constituída por 2 frascos por tempo de avaliação (20 e 30 dias). Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), utilizando o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011).

2.3 Resultados

2.3.1 Composição Espectral do Armário colorido

Segundo GAZZOLLA, 2014 a Composição espectral, em porcentagem, dos comprimentos de onda das fontes de luz utilizadas no cultivo das plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz, realizada em condição aberta, estão descritos na tabela 2. Portanto foram utilizados os mesmos comprimentos de onda para cultivar as plântulas de *Hyptis marrubioides*.

Tabela 2. Composição espectral, em porcentagem, dos comprimentos de onda das fontes de luz utilizadas. (GAZZOLLA, 2014).

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

2.3.2 Crescimento das plântulas

Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas

Os parâmetros de crescimento no cultivo *in vitro* de plântulas de *Hyptis marrubioides*, sob diversos espectros de luz apresentaram diferença significativa. Os dados neste trabalho dos diversos valores de comprimento de onda empregados estão apresentados na tabela 3. Para comprimento médio de parte aérea, o cultivo no período de 20 dias, apresentou melhor resultados com as luzes azul, verde, vermelho e amarelo frente à luz branca (controle). No período de 30 dias o cultivo nas luzes verde, vermelha

e amarelo também nos mostrou ótimo crescimento em relação à luz branca no caso, o nosso controle. A luz amarela com 16,60 cm, comparada à luz branca com 9,20 cm, representa 1,80 vezes a mais em relação ao controle. Comparando os dois períodos, aos 20 dias o melhor desenvolvimento foi no cultivo com a luz vermelha que possui 10,17 cm em relação à luz branca com 6,03 cm e no período de 30 dias a luz amarela se destaca. Em relação a número de folhas por planta, para o período de 20 dias os dados analisados não diferem entre si, se comparados ao controle. Mas para o período de 30 dias o cultivo de *H. marruboides*, obteve-se melhor resultado com a luz verde e vermelha com 22,72 folhas/planta e 23,42 folhas/planta respectivamente, comparado ao cultivo na luz branca (controle) com 20,13 folhas /planta. Plântulas de *Hyptis marruboides* cultivadas em diferentes qualidades de luzes podem ser observadas na figura 5.

Tabela 3. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas expandidas de plântulas de *Hyptis marruboides*, submetidas a 20 e 30 dias para tempos de avaliação.

Tratamentos de luz	Tempos de avaliação (dias)		Tempos de avaliação (dias)	
	20	30	20	30
	Comprimento médio de parte aérea (cm)		Número médio de folhas	
Branca	6,035 Bb ¹ ± 0,511 ²	9,203 Ca ± 0,388	12,475 Ab ± 0,927	20,133 Ba ± 0,827
Azul	8,400 Ab ± 0,453	13,030 Ba ± 0,865	13,143 Ab ± 0,667	17,750 Ba ± 1,293
Verde	9,900 Ab ± 0,823	14,677 Aa ± 0,737	13,514 Ab ± 0,676	22,725 Aa ± 1,814
Vermelho	10,175 Ab ± 0,669	15,465 Aa ± 0,461	12,600 Ab ± 1,223	23,425 Aa ± 1,138
Amarelo	9,871 Ab ± 0,462	16,603 Aa ± 0,790	11,143 Ab ± 1,166	20,067 Ba ± 0,935
CV(%)	15,46		18,87	

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5% de probabilidade.

² ± Erro padrão da média.

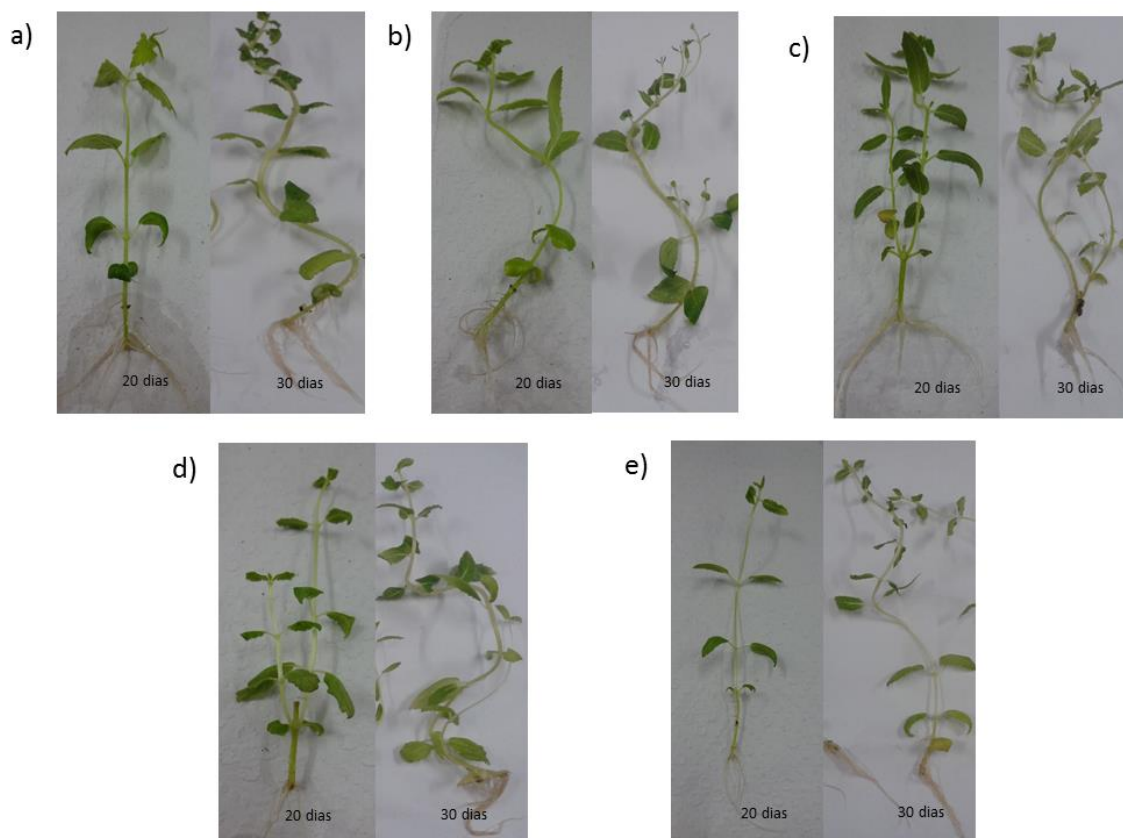


Figura 5. Plântulas de *Hyptis marrubioides* com tratamento de luzes coloridas. Luz branca (a), luz azul (b), luz verde(c), luz vermelha (d) e luz amarela(e) no período de 20 e 30 dias.

Matéria Fresca e Matéria Seca

As plantas cultivadas *in vitro* foram avaliadas quanto a matéria fresca e seca nos 2 períodos de tempos selecionados (20 e 30 dias). Maior abundância de massa seca foi observada no período de trinta dias para as plântulas cultivadas sob luz vermelha em comparação com o controle (luz branca). Para as demais luzes não houve diferença significativa. E, para o período de 20 dias nenhum tratamento utilizado apresentou diferença significativa. O mesmo foi observado em relação à massa fresca, em todos os comprimentos de luz avaliados nos dois períodos. Verificam-se os resultados na tabela 4.

Tabela 4. Acúmulo de massa fresca e seca de plântulas de *Hyptis marruboides*.

	Tempos de avaliação (dias)		Tempos de avaliação (dias)	
	20	30	20	30
	Massa fresca de folhas (g)		Massa seca de folhas (g)	
Branca	0,311 Ab ± 0,059	0,553 Aa ± 0,048	0,028 Ab ± 0,003	0,052 Ba ± 0,004
Azul	0,306 Ab ± 0,024	0,549 Aa ± 0,042	0,033 Ab ± 0,002	0,057 Ba ± 0,004
Verde	0,334 Ab ± 0,046	0,534 Aa ± 0,053	0,034 Ab ± 0,003	0,053 Ba ± 0,004
Vermelho	0,404 Ab ± 0,067	0,665 Aa ± 0,048	0,035 Ab ± 0,004	0,066 Aa ± 0,005
Amarelo	0,246 Ab ± 0,018	0,426 Aa ± 0,025	0,025 Ab ± 0,001	0,045 Ba ± 0,002
CV(%)	29,77		22,14	

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5% de probabilidade.

² ± Erro padrão da média

Análise Quantitativa da Rutina

Curva padrão de calibração

A curva de calibração, bem como os parâmetros inerentes a ela, os coeficientes angular, linear e de correlação R^2 , foram obtidos com auxílio do *software* Excel 2010. Pela figura 6 é possível observar que os pontos apresentam boa linearidade e isso pode ser confirmado pelo valor do coeficiente de correlação linear, sendo $R^2 = 0,998$ (figura 6). Deste modo pode utilizar a equação para quantificação do teor de rutina nas amostras analisadas. Na figura 7, está apresentado o cromatograma obtido por CLAE-DAD e o espectro de UV da rutina. f

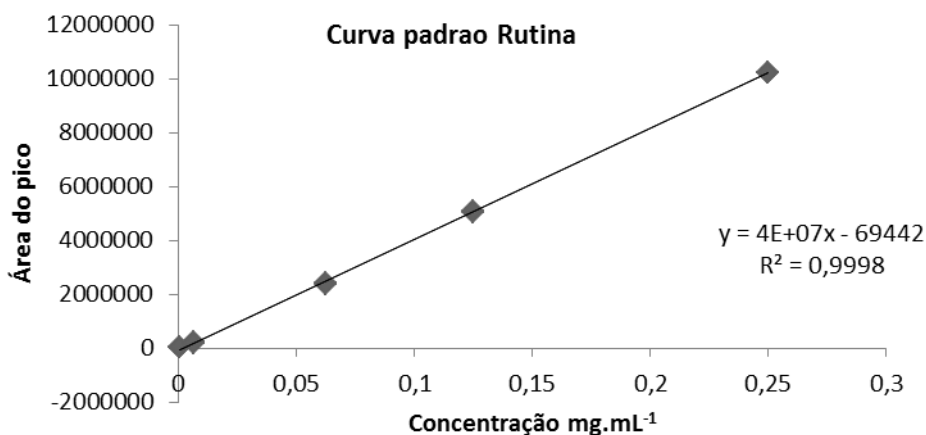


Figura 6. Curva padrão de calibração do padrão rutina, plotadas através da área do pico *versus* concentração em mg mL⁻¹.

No cromatograma, pode-se observar o tempo de retenção e os espectros de UV da substância a ser quantificada a rutina.

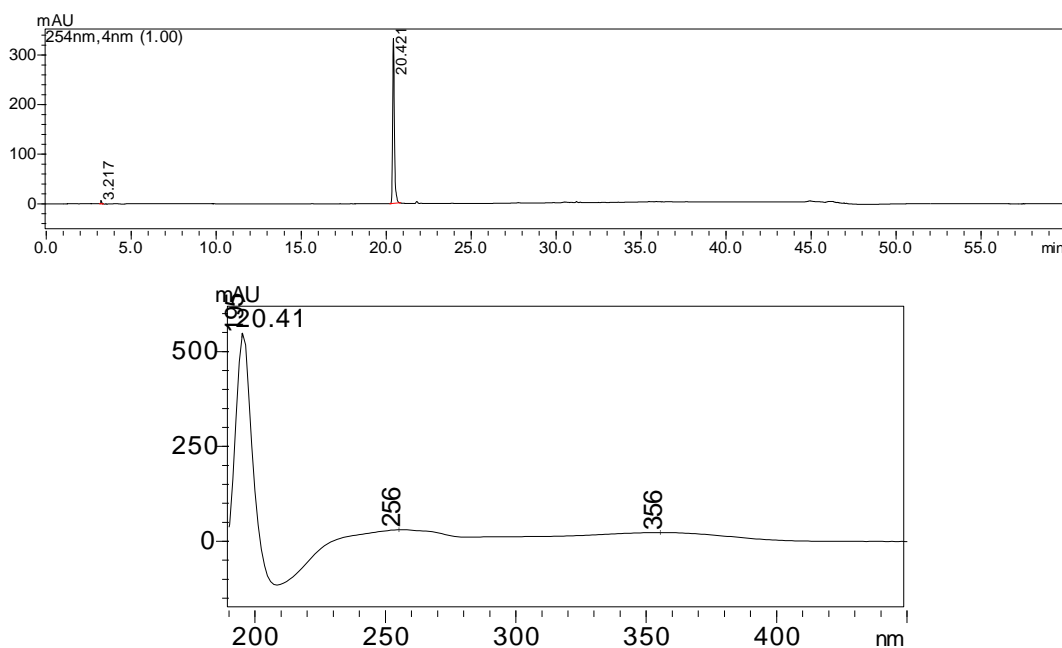


Figura 7. Cromatograma e o espectro de UV obtido por CLAE-DAD da rutina.

Os cromatogramas das seguintes luzes: branca, azul, verde, vermelha e amarela, respectivamente com tratamento de 20 dias estão apresentados na figura 8.

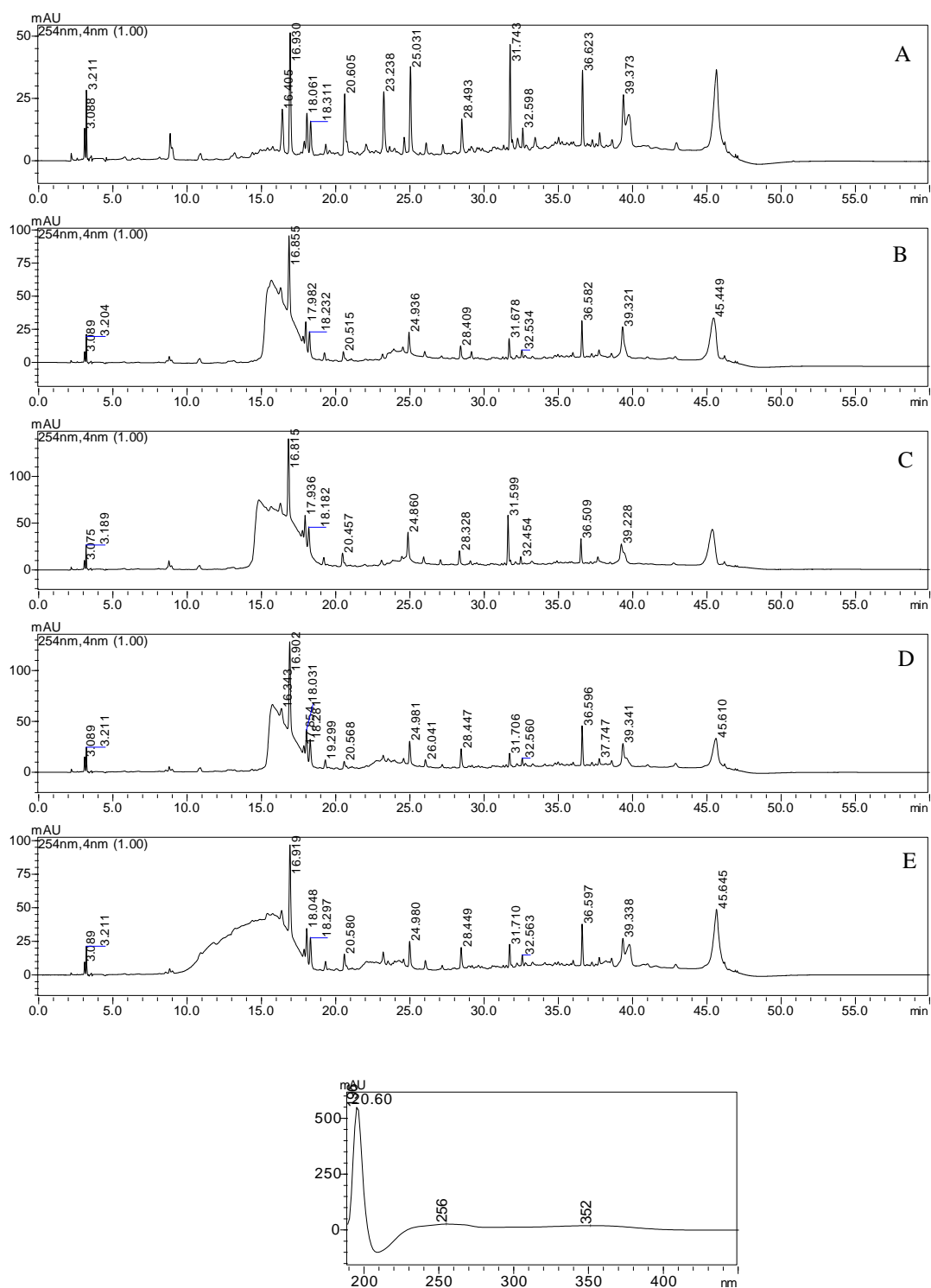


Figura 8. Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marruboides*, cultivadas sob luz branca (A), azul (B), verde (C), vermelha (D) e amarela (E), no período de 20 dias e espectro de UV relacionado a luz branca.

Os cromatogramas com o tempo de retenção de cada substância quantificada nas seguintes luzes: branca, azul, verde, vermelha e amarela, respectivamente com tratamento de 30 dias. Está presente na figura 9.

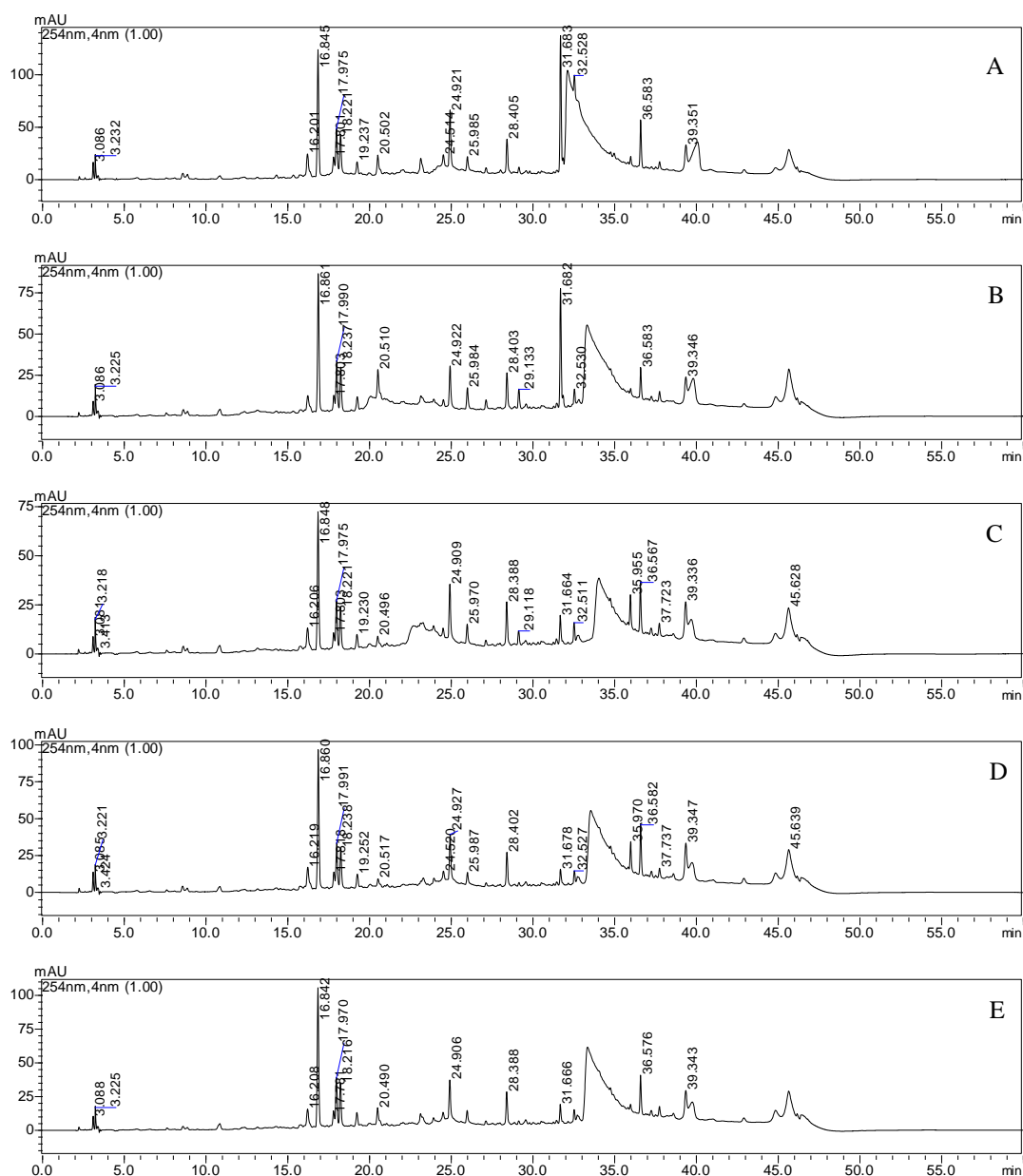
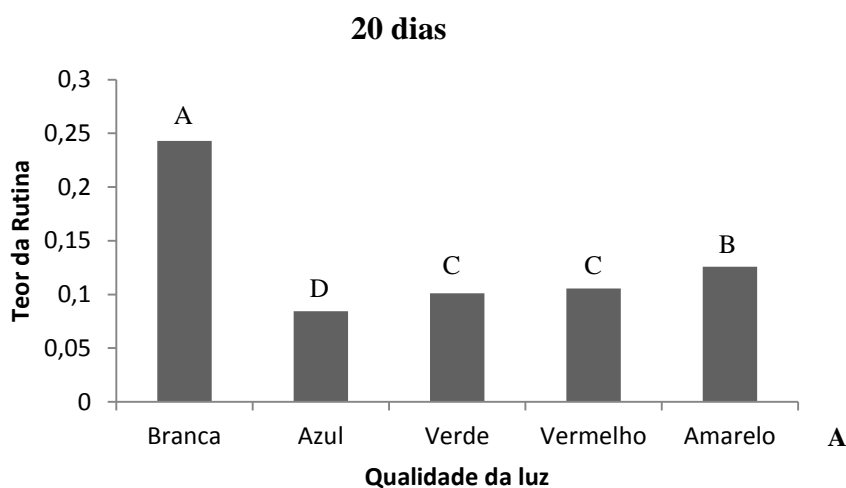


Figura 9. Perfil cromatográfico obtido a partir dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marrubioides*, cultivadas sob luz branca (A), azul (B), verde (C), vermelha (D) e amarela (E), no período de 30 dias.

Segundo Falcão et al., 2003 plântulas de *H. marrubioides* apresentam grande teor de flavonoides, estes são importantes antioxidante. Desta forma este trabalho realizou a quantificação do teor de rutina presente nesta espécie *in vitro* elicidadas com

diversos comprimentos de onda. Após a obtenção da curva de calibração, foram obtidos os valores das áreas dos picos correspondentes a cada substância a ser quantificada nas amostras analisadas. Utilizando a equação da reta encontrada no gráfico gerado da curva padrão e substituindo os valores das áreas foi possível determinar a concentração do flavonoide rutina em cada uma das amostras.

Maiores rendimentos do teor de rutina ocorreram em plântulas cultivadas em luz branca no período de 20 e 30 dias. Luz branca (20 dias) com $0,24 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ e (30 dias) com $0,30 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$. Já as plântulas cultivadas sob luz amarela, vermelha e verde no período de vinte dias apresentaram valores médios bem semelhantes a $0,10 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$. Sendo que neste mesmo período plantas cultivadas (mantidas), sob luz azul apresentaram menor teor de rutina $0,08 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$. Para o período de 30 dias, a luz azul obteve o teor de rutina de $0,29 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ bem semelhante a luz branca (controle) com $0,30 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$, as demais luzes verde e vermelho observam-se teores variados e semelhantes, enquanto a luz amarela apresentou teor superior a estas duas luzes.



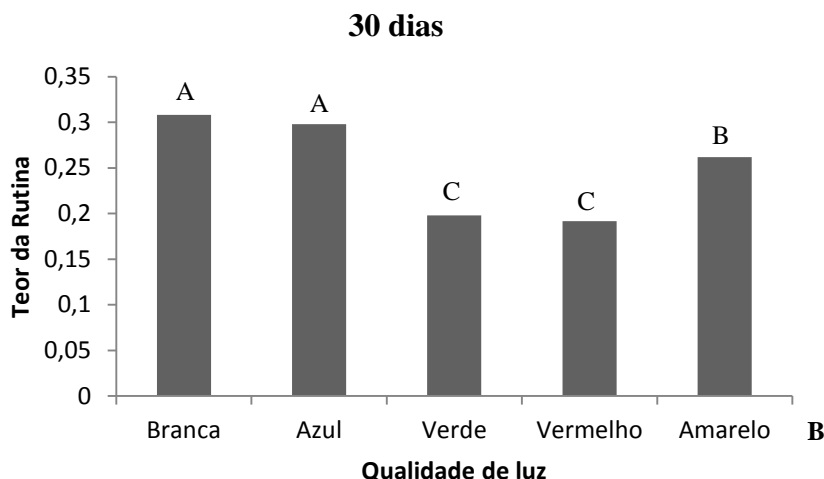


Figura 10. Teor e rendimento da rutina aos 20 dias (A), e 30 dias (B) em plântulas de *H. marrubioides*, submetidas a diferentes comprimentos de onda de luz. MS = Matéria seca. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.4 Discussão e Conclusão

Gazolla, 2014 verificou que os resultados encontrados demonstram que a qualidade espectral da luz influencia a biomassa produzida pelas plântulas *in vitro* de *A. othonianum* Rizz. Em que o maior acúmulo de matéria fresca e seca foi observado em plântulas que foram cultivadas sob luz vermelha e amarela, com o aumento proporcional de 1,08 e 1,15 vezes em relação ao tratamento de luz branca (controle). Em comparação ao trabalho apresentado o maior acúmulo de massa seca foi de 0,066 g em relação a 0,052 g ao controle, demonstrado na planta cultivada sobre luz vermelha, no período de 30 dias de exposição a esta luz.

Em contraste, Maluta et al., 2013 relatou nos seus trabalhos o efeito de diferentes comprimentos de onda no desenvolvimento *in vitro* de mudas de cana-de-açúcar, em que se constatou a diminuição do porte da planta com o aumento na incidência de luz vermelha.

Para verificar os efeitos da mudança na qualidade da luz sobre a emissão de afilhos e na sua acumulação de massa seca no cultivar de trigo, Almeida & Mundstock, (2001) descreve que a baixa qualidade da luz (filtros verde e vermelho) induziu a planta a emitir menos afilhos com menos massa seca/afilho.

Gazolla, 2014 demonstrou que a qualidade espectral da luz influencia no teor de compostos fenólicos produzidos pelas plântulas *in vitro* de *A. othonianum* Rizz. Os teores e rendimentos de ácido gálico e amentoflavona foram aumentados na presença de luz azul. A luz vermelha estimulou os teores e o rendimento de ácido 3,4 diidroxibenzoico. Flavonoides foram largamente acumulados com a irradiação de luz de emissão máxima a 575 nm (faixa da luz vermelha) e ocorreram com escassez em tecido paliádico exposto a 552 nm (faixa da luz verde) em folhas de *Ligustrum vulgare* (TATTINI et al, 2004).

Calos de *C. subternata* foram cultivadas sob variação das condições de luz e temperatura para determinar a influência na acumulação de biomassa e bioflavonoides. Foram utilizadas modificações experimentais de luz, incluindo completa escuridão, luz de diferentes qualidades espectrais (branco, vermelho, azul e amarelo) e ultravioleta (UVC), com temperaturas elevadas. Entre os regimes de luz testados, o cultivo sob luz azul resultou em níveis mais altos de isoflavonas, assim a acumulação de biflavonoides em calo de *C. Subternata* se mostrou fortemente afetada pela luz e em temperatura elevada. (KOKOTKIEWICZ et al., 2014).

SZOPA et al., 2012 cultivou *Rutra Graveolens in vitro* sob diferentes condições de luz (vermelha distante, vermelha, azul, UV-A, na escuridão e luz branca) foram testadas para quantidades de ácidos fenólicos e ácido cinâmico, bem como furanocumarinas, utilizando métodos HPLC. Tanto para a luz branca e luz azul foram igualmente benéficas para a produção total de ácidos fenólicos, ao passo que a produção total de furanocumarinas foi claramente melhor estimulado pela luz azul na *R. graveolens* e por escuridão na subespécie, ou seja os valores foram, respectivamente, 1,44 e 1,7 vezes maior do que na biomassa cultivada sob luz branca.

Em relação a este trabalho com *H. marrubioides in vitro* com a presença destas qualidades de luzes, o teor de rutina analisado para a luz azul e luz branca (controle) apresentaram valores semelhantes para o cultivo no período de 30 dias, sendo superior as outras condições testadas. Conclui-se que as plântulas de *H. marrubioides* cultivadas *in vitro* na presença de diversos comprimentos de onda e tempo, favorecem seu crescimento e a variação do teor deste flavonoide analisado.

2.5 Referências Bibliográficas

ALMEIDA ,MILTON LUIZ ; MUNDSTOCK ,CLAUDIO MARIO. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, p.401-408, 2001.

BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 91, p. 39-49, 2001.

BHUIYAN, N.H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v.160, p.1117-1124, 2003.

BOTREL, P.P. et al. Teor E Composição Química Do Óleo Essencial De *Hyptis marrubioides* Epl. Lamiaceae em Função Da Sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 533-538, 2010 a.

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

CASTRO, D.M.; MING, L.C.; MAREQUES, M.O.M. Composição fito química dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (MILK).N.E.Br e diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 75-79, 2002.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Rev. Bras. Farm**, v.84, p.68-74, 2003.

FELIPPE, G.M. Fotomorfogênese. In: FERRI, M.G. (coord.) **Fisiologia Vegetal 2**. São Paulo: EPU, 2.ed., p.231-280, 1986.

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

GAZOLLA, A. P. **Produção de compostos fenólicos por eliciação abiótica em plântulas de *anacardium othonianum* rizz cultivadas *in vitro***. Rio verde, 2014. Dissertação(Mestrado em ciências agrárias)- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde.

HARLEY, R. M. Evolution and distribution of Eriope (Labiatae) and its relatives in Brasil; Vanzolini, P. E.; Heyer, W. R., **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, p.17, 1988.

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

KOKOTKIEWICZ, ADAM ; BUCINSKI, ADAM; LUCZKIEWICZ, MARIA. Light and temperature conditions affect bioflavonoid accumulation in callus cultures of *Cyclopia subternata* Vogel(honeybush). **Plant Cell Tiss Organ Cult** 118:589–593, 2014.

MORELLI, G.; RUBERTI, I. Shade avoidance response, driving auxin along lateral routes. **Plant Physiology**, v. 122, p. 621-626, 2000.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. Micropropagation of woody trees and fruits. **Dordrecht, Kluwer Academic Publishers**. p.3-35, 2003.

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

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

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

SZOPA, AGNIESZKA; EKIERT, HALINA; SZEWCZYK, AGNIESZKA; FUGAS, EL_ZBIETA. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in in vitro cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. **Plant Cell Tiss Organ Cult** v.110, p.329-336, 2012.

TATTINI, M. et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v. 163, p. 547-561, 2004.

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

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

CAPÍTULO 3 – CULTIVO DE PLÂNTULAS DE *HYPTIS MARRUBIOIDES* COM INFLUÊNCIA DE ELICITORES ABIOTICOS.

RESUMO

O gênero *Hyptis* é composto por aproximadamente 580 espécies e muitas destas possuem grande importância econômica e etnofarmacológica. *Hyptis marruboides* uma espécie deste gênero, conhecido como hortelã-do-campo, com uso popular consagrado contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras. Apresenta alto teor de compostos fenólicos, com possível potencial antioxidante. Contudo sua propagação *in vitro* permite a utilização de elicitores, para alterar possíveis rotas metabólicas afetando qualitativamente e quantitativamente as moléculas produzidas. Este trabalho objetivou avaliar a influência de elicitores abióticos como o ácido salicílico (AS) e nitrato de prata (AgNO_3) nas concentrações de 30 e 60 μM no cultivo de plântulas de *Hyptis marruboides*, em duas metodologias de cultivo distintas, quantificando a presença do teor de rutina. Este mesmo foi analisado por CLAE-DAD, além dos parâmetros de crescimento como o crescimento por parte aérea, número de folhas, massa fresca e seca. Os resultados obtidos para esta espécie demonstram semelhanças entre si quanto ao parâmetro de crescimento, enquanto o teor de rutina apresenta abundante para o tratamento com AS na concentração de 30 μM cultivado na segunda metodologia no período de 6 dias, com 4,80 mg g^{-1} MS enquanto o controle com 0,27 mg g^{-1} MS.

PALAVRAS-CHAVE: ácido salicílico, CLAE-DAD, cultura de tecido, nitrato de prata.

ABSTRACT

The *Hyptis* genus comprises about 580 species and many of these have great economic importance and ethnopharmacological. *Hyptis marrubioides* a species of this genus, known as mint field, with popular use established against gastrointestinal infections, skin infections, pain and cramps. Has a high content of phenolic compounds with possible antioxidant potential. However their *in vitro* propagation allows the use of elicitors to alter metabolic pathways affecting qualitatively and quantitatively produced molecules. This work aimed to evaluate the influence of abiotic elicitors such as salicylic acid (SA) and silver nitrate (AgNO₃) in concentrations of 30 and 60 μ M in the growing of *Hyptis marrubioides* seedlings in two different cultivation methods quantifying the presence of the rutin content. The same was analyzed by HPLC-DAD, besides the growth parameters such as shoots growth, number of leaves, fresh and dry mass. The results obtained for this species show similar to each other for growth parameter, while rutin content was high to treatment with SA at a concentration of 30 μ M in the second method within 6 days with 4.80 mg g⁻¹ DM while the control with 0.27 mg g⁻¹ DM.

KEY WORDS: Salicylic acid, HPLC-DAD, tissue culture, silver nitrate.

3.1 Introdução

A família Lamiaceae é relativamente bem estudada do ponto de vista químico. A respeito do seu metabolismo secundário, apresenta grande variedade de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do ácido acético, da via do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista.

O gênero *Hyptis* é composto por aproximadamente 580 espécies e muitas destas possuem grande importância econômica e etnofarmacológica, utilizadas para diversos fins medicinais, (BARBOSA E RAMOS, 1992). Uma das espécies é conhecida como hortelã-do-campo, com uso popular consagrado contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras. Proveniente do Cerrado brasileiro, denomina-se *Hyptis marrubioides* epling, apresentando maior teor de substâncias fenólicas, relatando possível potencial antioxidante segundo falcão et al., 2003.

Botrel et al. (2010a), descreveram a composição química de *H. marrubioides* cultivada no campo e na estufa, constatando porcentagem mais elevada de seus compostos no óleo essencial da espécie cultivada no campo. Em outro estudo, Botrel et al. (2010b) avaliaram a influência da sazonalidade no teor destes óleos e na sua composição, delineando experimentos nas quatro estações do ano. A estação verão foi a mais satisfatória, sendo a quantidade de óleo essencial encontrado nesta estação maior do que nas demais. Adicionalmente, Botrel et al. (2010b) constatou que a idade da planta, inteirada com a disponibilidade nutricional, também constitui um fator de variação para a composição química do óleo essencial desta espécie.

Contudo sua propagação *in vitro* permite a utilização de elicitores (agentes químicos, físicos e biológicos), permite alterar as rotas metabólicas afetam qualitativamente e quantitativamente as moléculas produzidas (DJILIANOV et al., 2005). Dados da literatura relatam o acréscimo do ácido salicílico (AS) nas plantas regulando a via de formação dos flavonoides, sendo considerado por alguns autores como um fitohormônio envolvido nas reações de defesa da planta, induzindo a resposta sistêmica adquirida (CURTIS et al. 2004). Outros autores descrevem a ação do o nitrato de prata (AgNO_3) inibindo a ação do etileno (AL-KHAYRI E AL-BAHRANY, 2001; OZDEN-TOKATLI et al., 2005). De acordo com GIRIDHAR et al. (2001), o uso de

nitrato de prata tem efeito positivo nos estudos de multiplicação e enraizamento *in vitro*. De acordo com as condições em que se encontram as células em cultura e dos estímulos recebidos (bióticos ou abióticos), estas passarão a produzir, em maior ou menor escala, produtos do seu metabolismo secundário. Diversas estratégias têm sido empregadas a fim de aumentar os valores de produtividade de determinados compostos que apresentam grande valor do ponto de vista social e econômico (MARASCHIN et al., 2002).

Este trabalho objetivou avaliar a influência de elicitores abióticos em diferentes concentrações no cultivo de plântulas de *Hyptis marruboides*, quantificando a presença de um flavonoide.

3.2 Metodologia

O cultivo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, a análise do perfil químico foi conduzido no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UNIFRAN – Universidade de Franca – SP.

3.2.1 Material Vegetal e Cultivo *in vitro*

Os materiais vegetais utilizados foram sementes das espécies *H. marruboides* Epling, as mesmas foram imersas em solução contendo 2 fungicidas sistêmicos, 0,2% de Bendazol (Carbendazin) e 0,2% Alternó (Tebulonazole), durante 1 hora e em seguida, em hipoclorito de sódio puro por 30 minutos, lavadas em água estéril por (3x), o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar e pH 5,8. Foram utilizados tubos contendo 20 mL de meio. As culturas foram incubadas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de 23± 1°C. As plântulas estabelecidas *in vitro* foram subcultivadas, visando à multiplicação de brotos. Estes subcultivos foram realizados para se obter o número de plantas suficiente para a instalação dos experimentos. Os elicitores abióticos testados foram o ácido salicílico (AS) e o nitrato de prata (AgNO₃), ambos nas concentrações de 30 e 60 µM. Foram realizados dois procedimentos.

3.2.2 1º procedimento

Para esse procedimento meio de cultivo semelhante ao utilizado para o cultivo, foi preparado e aditivado com os elicitores supracitados. As plântulas estabelecidas foram subcultivadas para meio fresco permanecendo por 10 dias para se reestabelecerem. Posteriormente, as mesmas foram transferidas para meio fresco contendo os elicitores, permanecendo neste por 20 dias. As plantas do tratamento controle foram transferidas para um meio fresco, sem a adição de elicitores.

Ao final do período de elicitação, as partes aéreas foram colhidas e foi obtida a massa fresca de cada plântula. Em seguida, estas foram secas em estufa de ventilação forçada a 35 °C até atingirem massa constante, sendo posteriormente pesadas para a obtenção de massa seca. O material seco foi armazenado em ambiente seco e fresco para posterior análise química. Foram utilizados frascos contendo 50 mL de meio nutritivo adicionado com o elicitor, com 5 explantes em cada, sendo 4 frascos para cada tratamento, totalizando 20 frascos, comum total de 100 plantas.

3.2.3 2º procedimento

Para esse 2º procedimento o meio de cultivo semelhante ao utilizado para o cultivo foi preparado sem a adição dos elicitores (AS e AgNO₃). As plântulas estabelecidas foram subcultivadas para meio fresco permanecendo por 20 dias para se reestabelecerem. Posteriormente, após os 20 dias foi adicionado sob o meio solução dos elicitores descritos acima, permanecendo em contato com o meio por 3 e 6 dias. Ao final do período de elicitação, as partes aéreas foram colhidas e foi obtida a massa fresca de cada plântula. As mesmas foram secas em estufa de ventilação forçada a 35 °C até atingirem massa constante, em seguida pesadas para a obtenção de massa seca. Este material seco foi armazenado adequadamente para análise química. Foram utilizados frascos contendo 50 mL de meio nutritivo, com 5 explantes em cada, sendo 4 frascos para cada tratamento, totalizando 40 frascos, comum total de 200 plantas.

As plântulas dos dois procedimentos foram padronizadas com cerca de 1,0 a 1,5 cm de comprimento contendo uma ou duas gemas axilares, o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar e pH 5,8. Foram encaminhados para a sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de 23± 1°C. A avaliação final das plantas foi realizada

observando a massa fresca da parte aérea, massa seca, e comprimento da parte aérea e número de folhas /planta, após todos os tratamentos realizados.

3.2.4 Constituição química das plântulas *in vitro* elicitadas

Obtenção dos extratos brutos e construção da curva do padrão para a quantificação

Foram utilizadas partes aéreas das plantas de *H. marruboides* cultivadas *in vitro*, secas em estufa de ventilação forçada a 35 °C até estabilização da massa. Após maceração e pesagem de 100 mg deste material, fez-se a extração adicionando 4 mL de metanol - HPLC, e banho em ultrassom por 30 min. Posteriormente, foi realizada a filtração dos extratos com algodão e em filtro com membrana (Advantec HP020AN – 20 µm). Alíquotas de 1000 µL foram pipetadas, com auxílio de pipeta automática, para frascos de 1mL e analisados em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência.

Para obtenção da curva padrão de calibração, empregou-se o flavonoide rutina como padrão. Foi pesado 1 mg deste padrão e adicionado 2000 µL de metanol - HPLC a fim de se obter a solução estoque na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Partindo da solução estoque, realizou-se a sequência de dissoluções seriadas nas concentrações 0,25; 0,125 e 0,0625 mg mL⁻¹.

As soluções diluídas nas diferentes concentrações foram transferidas (~ 1 mL) para frascos de 1 mL em triplicata, para subsequente corrida em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo SHIMADZU Proeminence-LC-20AD. Os dados da área do pico de interesse deste padrão foram tabelados e a construção da curva de calibração obtida.

3.2.5 Análise cromatográfica

Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, de sistema binário SHIMADZU Proeminence-LC-20AD, equipado com injetor automático SIL-20A HT, acoplado ao detector: UV-VIS modelo SPD-M20A com arranjo de diodo. A coluna analítica usada foi da Phenomenex Phase GEMINI, (250 x 4,6 mm, 5 µm), C18, equipada com pré-coluna de mesmo material, e forno CTO-20A. O volume

injetado foi de 20 μL , fluxo foi de 1 mL min^{-1} e λ 254 nm. A temperatura permaneceu constante em 40 $^{\circ}\text{C}$. A análise foi efetuada em 60 min com eluente em gradiente linear: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (5: 94,9: 0,1 v/v/v), CH_3OH 100% em 30 min, 10 min em MeOH 100% e 20 min para retornar a condição inicial. O padrão externo utilizado foi a rotina. A aquisição de dados foi realizada através de um microcomputador.

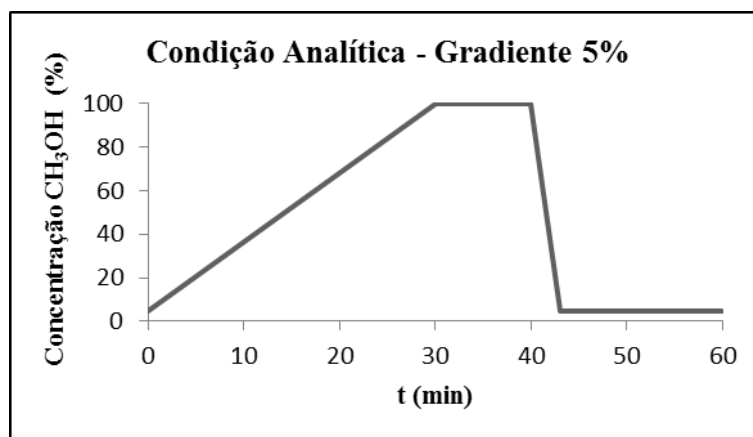


Figura 1. Condição Analítica Gradiente 5%, variação da concentração de metanol (CH_3OH) pelo tempo.

3.2.6 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 (elicitores x concentrações) para 20 dias. E no período de 3 e 6 dias foi um arranjo fatorial 2 x 2 x 2 (elicitores x concentrações x tempo) cada tratamento continha 4 repetições, constituída por 4 frascos. Para as análises químicas, as amostras foram analisadas em triplicata. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), utilizando o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.3 Resultados

3.3.1 Crescimento das plântulas

Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas

Os resultados obtidos para comprimento médio de parte aérea e o número médio de folhas expandidas, não foram influenciados pela interação dos elicitores com as duas metodologias aplicadas, dados observados nas tabelas 1 e 2. As plantas cultivadas no 1º procedimento para verificar comprimento médio de parte aérea não apresentaram diferença das plantas cultivadas no 2º procedimento, no período de 20 dias de contato com os elicitores, as plantas do 1º procedimento obtiveram a média de 4,4 cm em relação ao controle de 5,4cm. Para número médio de folhas observou a média de 12,3 cm para todas as concentrações de 30 e 60 µM tanto para AS quanto para AgNO₃ quando comparadas ao controle de 12,7 cm. Contudo no 2º procedimento para comprimento médio de parte aérea e o número médio de folhas com 3 e 6 dias de elicitação os resultados não diferem entre si tanto para AS nas concentrações de 30 e 60 µM quanto para AgNO₃ de 30 e 60 µM nestes dois períodos de tempo de elicitação. As plantas cultivadas nestes dois procedimentos podem ser observadas pelas figuras 2 e 3.

3.3.2 1º Procedimento

Tabela 1. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas de plântulas de *Hyptis marruboides*, submetidas a 20 dias de tempos de elicitação.

Tratamentos	Comprimento médio de parte aérea (cm)	Número médio de plantas
Ácido Salicílico 30 µM	4,200 A ¹ ± 0,287 ²	13,950 A ± 0,395
Ácido Salicílico 60 µM	4,085 A ± 0,389	11,771 A ± 1,079
Nitrato de Prata 30 µM	4,812 A ± 0,546	11,550 A ± 0,715
Nitrato de Prata 60 µM	4,800 A ± 0,386	12,400 A ± 0,534
Controle	5,412 A ± 0,481	12,775 A ± 0,479
CV (%)	25,68	14,71

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5% de probabilidade.

² ± Erro padrão da média

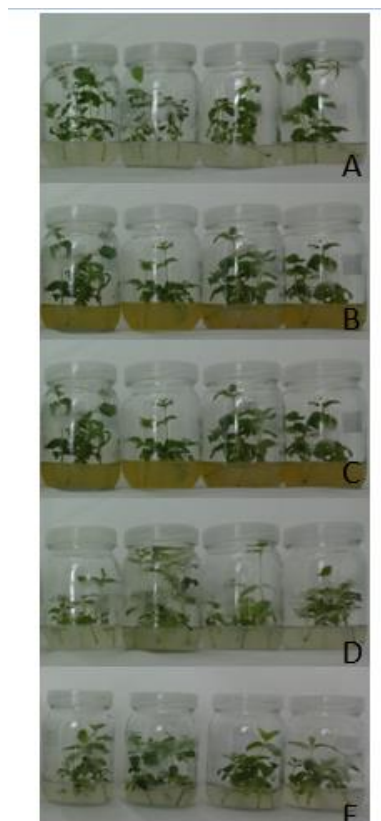


Figura 2. Plântulas de *H. marrubioides* tratadas com elicitores abióticos. Controle (A), AgNO_3 30 μM (B), AgNO_3 60 μM (C), AS 30 μM (D), AS 60 μM (E). Período de 20 dias.

3.3.3 2º Procedimento

Tabela 2. Comprimento médio de parte aérea e número médio de folhas de plântulas de *Hyptis marrubioides*, submetidas a 3 e 6 dias tempos de elicitação.

Tratamentos	Tempos de avaliação (dias)	
	3	6
Número médio de folhas		
Ácido Salicílico 30 μM	14,300 Aa ¹ \pm 1,526 ²	15,600 Aa \pm 1,665
Ácido Salicílico 60 μM	14,700 Aa \pm 2,068	15,100 Aa \pm 1,034
Nitrato de Prata 30 μM	15,500 Aa \pm 1,567	16,800 Aa \pm 1,564
Nitrato de Prata 60 μM	12,350 Aa \pm 1,008	16,700 Aa \pm 1,382
Controle	14,400 Aa \pm 1,071	14,450 Aa \pm 0,865
CV(%)	18,62	

Tratamentos	Tempos de avaliação (dias)	
	3	6
	Comprimento médio de parte aérea (cm)	
Ácido Salicílico 30 μ M	6,620 Aa ¹ \pm 0,364 ²	7,500 Aa \pm 0,896
Ácido Salicílico 60 μ M	6,780 Aa \pm 0,510	6,475 Aa \pm 0,501
Nitrato de Prata 30 μ M	6,845 Aa \pm 0,339	7,290 Aa \pm 0,547
Nitrato de Prata 60 μ M	5,235 Bb \pm 0,304	7,655 Aa \pm 0,519
Controle	7,390 Aa \pm 0,694	7,405 Aa \pm 0,351
CV(%)	14,54	

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5% de probabilidade.

² \pm Erro padrão da média

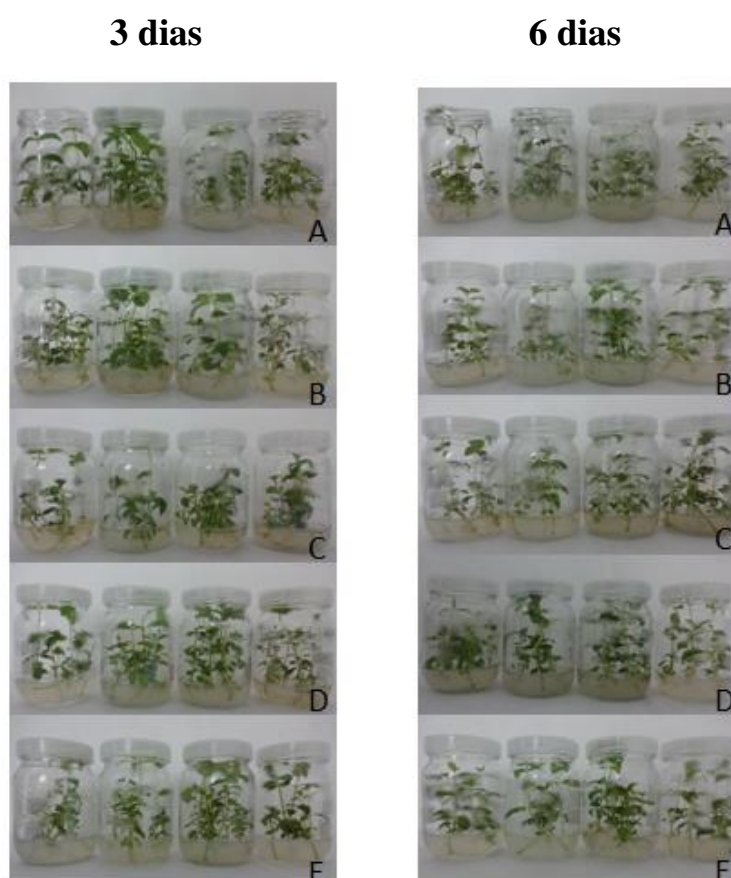


Figura 3. Plântulas de *H. marrubioides* tratadas com elicitores abióticos. Controle (A), AgNO_3 30 μ M (B), AgNO_3 60 μ M (C), AS 30 μ M (D), AS 60 μ M (E). Período de 3 e 6 dias.

Matéria Fresca e Matéria Seca

As plantas cultivadas *in vitro* foram avaliadas quanto a matéria fresca e seca nos dois procedimentos de cultivo distintos realizados com elicitores abióticos. Em relação à massa fresca e massa seca não houve diferença significativa entre todos os tratamentos testados, tanto para o 1º procedimento, quanto para o 2º procedimento, o rendimento foi semelhante para todos os elicitores nas concentrações de 30 e 60 µM em relação ao controle. Estes dados estão apresentados nas tabelas 3 e 4 a seguir.

1º Procedimento

Tabela 3. Massa seca e massa fresca de plântulas de *Hyptis marrubioides*, submetidas a 20 dias de avaliação.

	Massa fresca de folhas (g)	Massa seca de folhas (g)
Ácido Salicílico 30 µM	0,192 A ± 0,013	0,023 A ± 0,001
Ácido Salicílico 60 µM	0,263 A ± 0,025	0,026 A ± 0,003
Nitrato de Prata 30 µM	0,256 A ± 0,039	0,027 A ± 0,003
Nitrato de Prata 60 µM	0,241 A ± 0,019	0,030 A ± 0,002
Controle	0,251 A ± 0,024	0,026 A ± 0,002
CV (%)	30,26	26,34

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5% de probabilidade.

² ± Erro padrão da média

2º Procedimento

Tabela 4. Massa seca e fresca de plântulas de *Hyptis marrubioides*, submetidas a 3 e 6 dias de avaliação.

Tratamentos	Tempos de avaliação (dias)	
	3	6
Massa seca de folhas (g)		
Ácido Salicílico 30 µM	0,039 Aa ± 0,005	0,042 Aa ± 0,002
Ácido Salicílico 60 µM	0,039 Aa ± 0,004	0,044 Aa ± 0,006
Nitrato de Prata 30 µM	0,044 Aa ± 0,005	0,038 Aa ± 0,002
Nitrato de Prata 60 µM	0,035 Aa ± 0,003	0,042 Aa ± 0,004
Controle	0,044 Aa ± 0,004	0,051 Aa ± 0,003
CV(%)	19,28	

Tratamentos	Tempos de avaliação (dias)	
	3	6
Massa fresca de folhas (g)		
Ácido Salicílico 30 µM	0,289 Aa ± 0,039	0,364 Aa ± 0,071
Ácido Salicílico 60 µM	0,312 Aa ± 0,025	0,434 Aa ± 0,131
Nitrato de Prata 30 µM	0,356 Aa ± 0,064	0,336 Aa ± 0,033
Nitrato de Prata 60 µM	0,284 Aa ± 0,036	0,362 Aa ± 0,051
Controle	0,273 Ab ± 0,036	0,504 Aa ± 0,055
CV(%)	34,39	

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3.3.4 Análise Quantitativa da Rutina e Curva padrão de Calibração.

Pela Figura 4 é possível observar que os pontos apresentam boa linearidade confirmados pelos valores dos coeficientes de correlação linear, sendo $R^2 = 0,9998$ sendo possível criar uma equação para quantificar o teor de rutina presente nesta espécie de *H. marrubioides*. A curva de calibração, bem como os parâmetros inerentes a ela, os coeficientes angular, linear e de correlação R^2 , foram obtidos com auxílio do *software* Excel 2010. Deste modo foi possível criar a equação para quantificação do teor de rutina nas amostras analisadas..

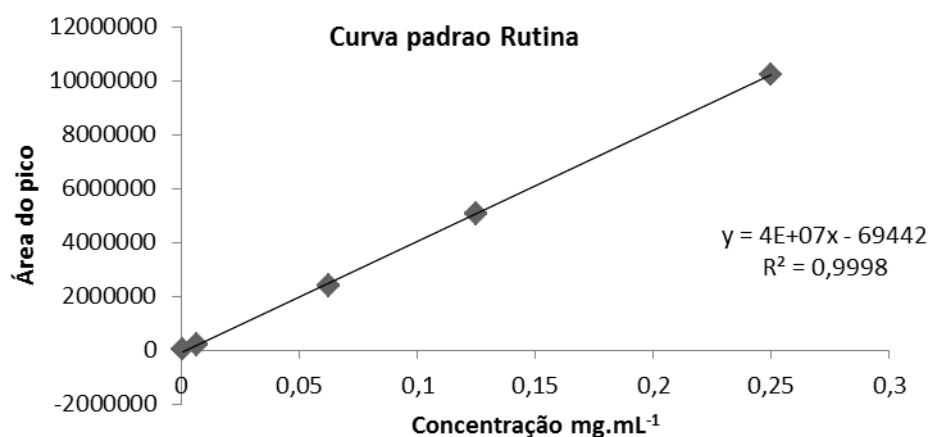


Figura 4. Curva padrão de calibração do padrão rutina, plotadas através da área do pico *versus* concentração em mg mL⁻¹.

Quantificação da Rutina

Após a obtenção da curva de calibração, foram obtidos os valores das áreas dos picos correspondentes a substância a ser quantificada nas amostras analisadas. Utilizando as equações e substituindo os valores das áreas foi possível determinar a concentração da rutina em cada uma das amostras. Os cromatogramas com o tempo de retenção de cada substância quantificada com os seguintes tratamentos com elicitores AS e AgNO₃ nas concentrações de 30 e 60 µM no 1º procedimento (20 dias de elicitação) estão apresentados na figura 5.

20 dias

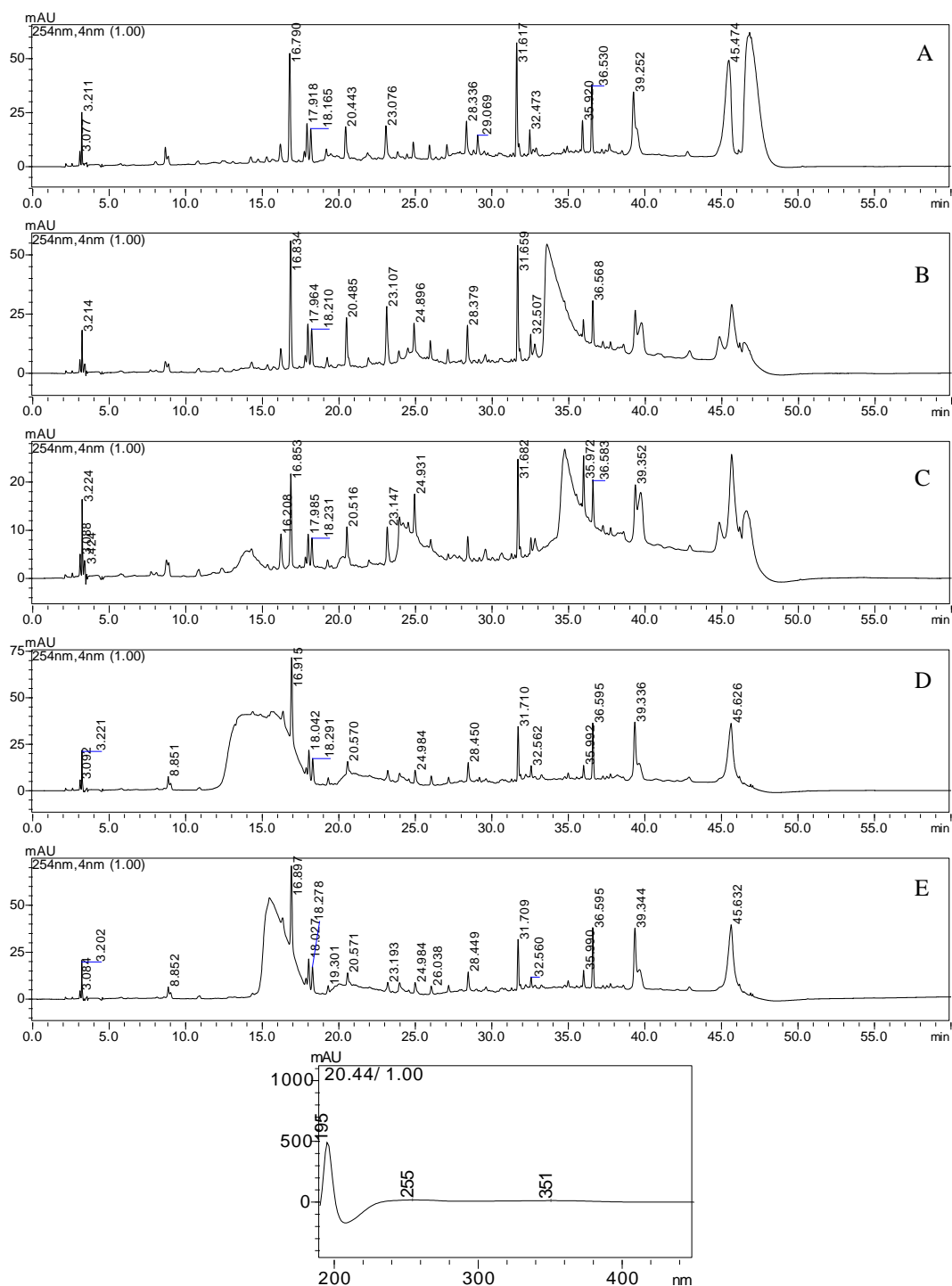


Figura 5. Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marrubioides* elicidadas. Controle (A), AgNO₃ 30µM (B), AgNO₃ 60µM (C), AS 30µM (D), AS 60µM (E), no período de 20 dias e espectro de uv relacionado ao controle (A).

Os cromatogramas com o tempo de retenção da substância quantificada com os seguintes tratamentos com elicitores AS e AgNO_3 nas concentrações de 30 e 60 μM no 2º procedimento (3 e 6 dias de elicitação) estão apresentados na figura 6 e 7 respectivamente.

3 dias

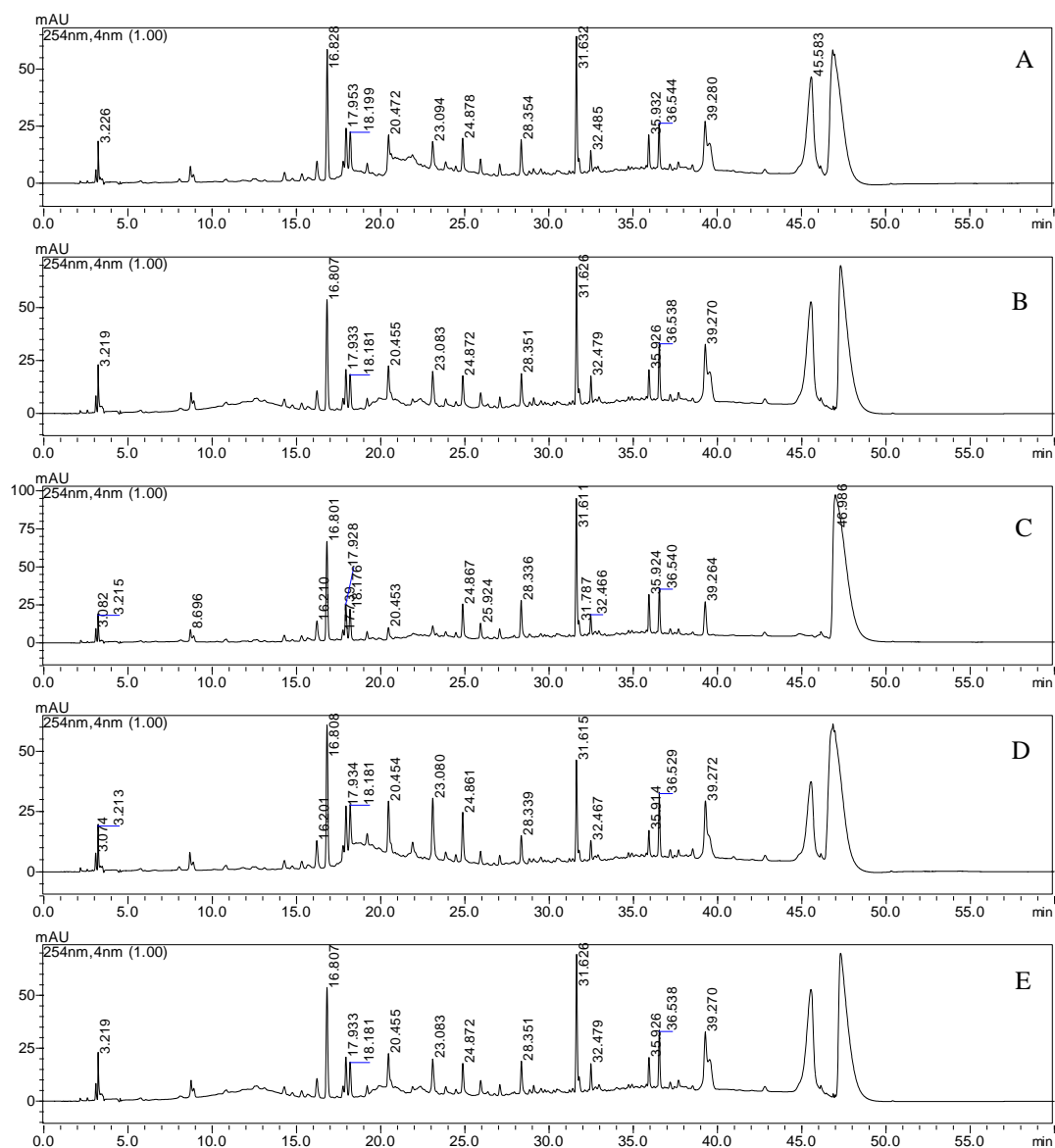


Figura 6. Perfil cromatográfico obtidos por CLAE dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marrubioides* elicidadas. Controle (A), AgNO_3 30 μM (B), AgNO_3 60 μM (C), AS 30 μM (D), AS 60 μM (E), no período de 3 dias.

6 dias

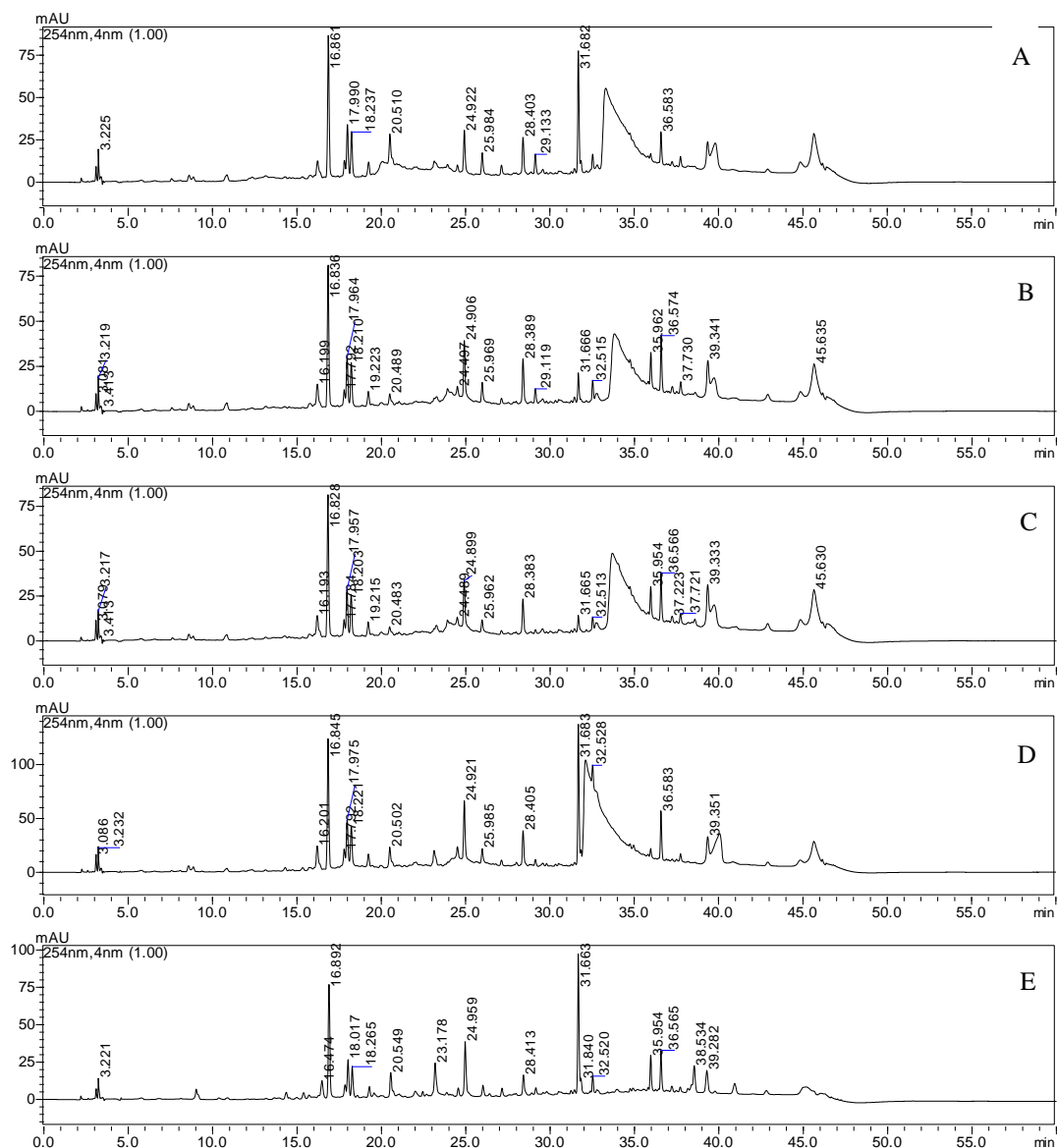
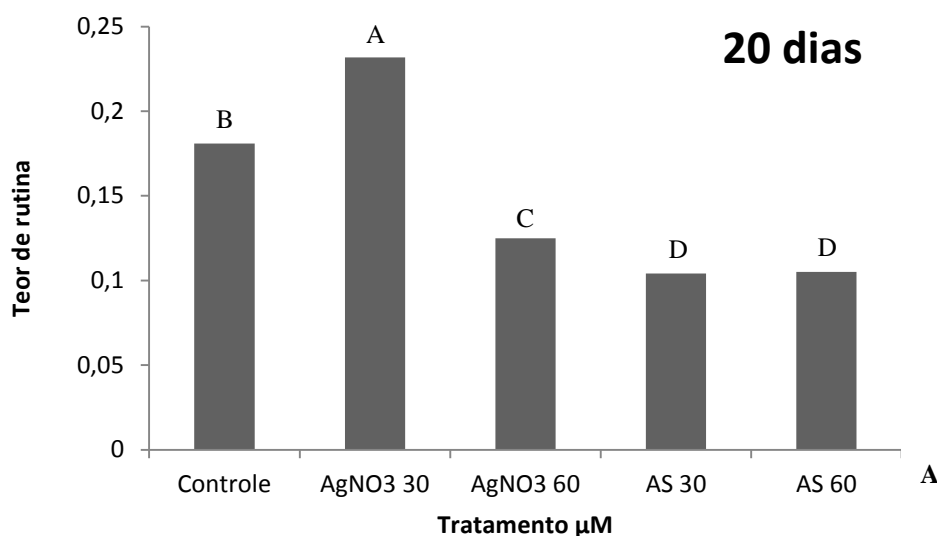


Figura 7. Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos extratos metanólicos das plântulas de *Hyptis marrubioides* elicítadas. Controle (A), AgNO₃ 30 μM (B), AgNO₃ 60 μM (C), AS 30 μM (D), AS 60 μM (E), no período de 6 dias.

Analisando o parâmetro de desenvolvimento químico, os resultados obtidos no cultivo de *H. marrubioides in vitro* com os elicitores abióticos descritos acima, descrevem dados bastante diversos. Neste trabalho foram realizadas duas metodologias de cultivo distintas. Para a 1^o metodologia o melhor resultado encontrado para o aumento de teor da rutina foi o tratamento com AgNO₃ 30 μM com 0,23 mg g⁻¹ MS

em relação ao controle com $0,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$. Os demais tratamentos foram semelhantes entre si. Para a 2ª metodologia os melhores resultados do cultivo desta planta, foram com o tratamento AS $30 \text{ }\mu\text{M}$ nos dois períodos testados 3 e 6 dias, obtendo o destaque para o período de 6 dias que apresentou o aumento discrepante em relação ao teor de rutina com 17,77 vezes a mais em relação ao teor apresentado pelo controle, AS $30 \text{ }\mu\text{M}$ com $4,80 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ enquanto o controle com $0,27 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$.

Comparando este parâmetro, o teor de rutina, nestas duas metodologias, observa-se que a 2ª metodologia obteve melhores resultados para o estabelecimento deste teor em todos os tratamentos aplicados. Conclui-se que para *H. marrubioides* tratadas com estes elicitores, apresentam diferença satisfatória para a obtenção destes teores de rutina, destacando as plantas tratadas com AS $30 \text{ }\mu\text{M}$ para a 2ª metodologia e plantas tratadas com AgNO_3 $30 \text{ }\mu\text{M}$ para a 1ª metodologia.



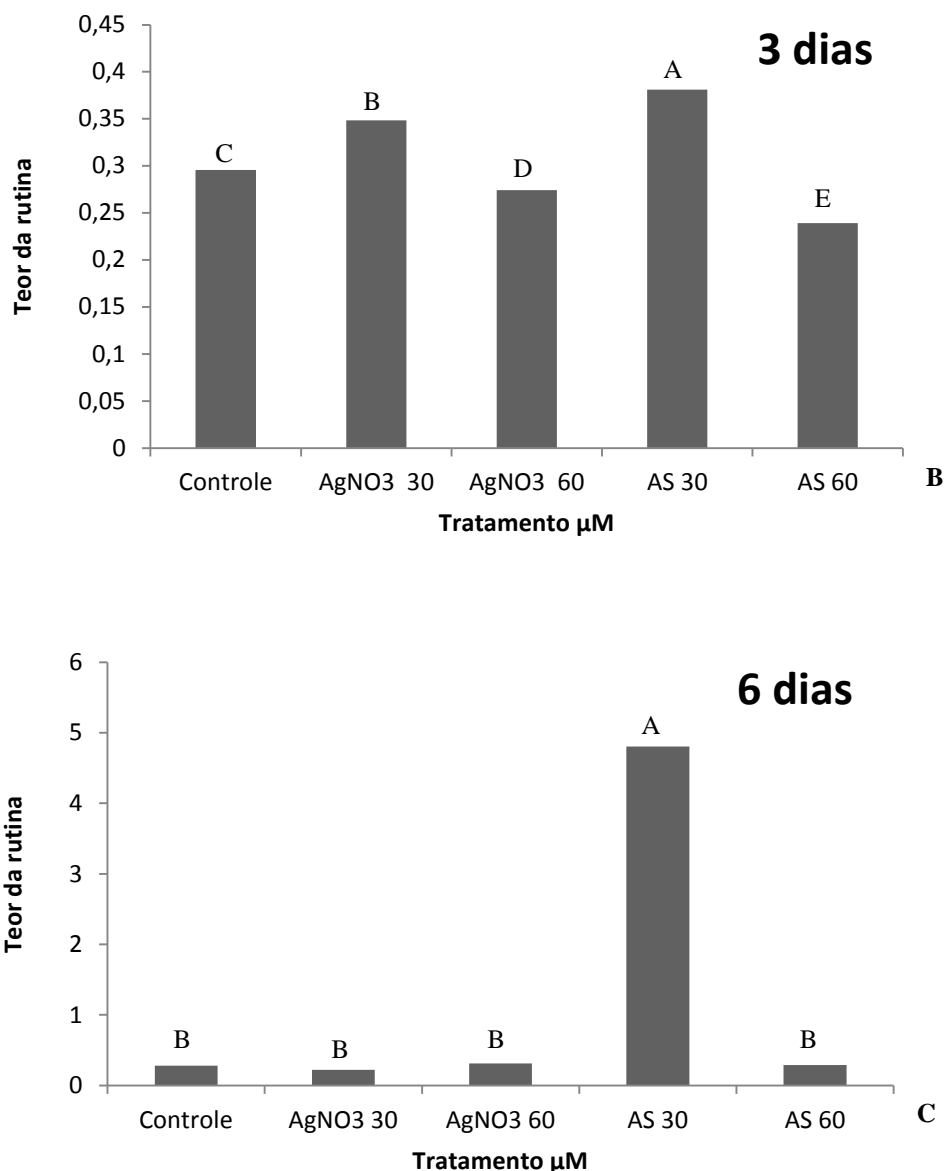


Figura 8. Teor de rutina. Tratamento 20 dias - 1º Procedimento (A). Tratamento 3 dias - 2º Procedimento (B). Tratamento 6 dias - 2º Procedimento (C) em plântulas de *H. marrubioides*, submetidas a diferentes concentrações de AgNO₃ e AS. MS = matéria seca. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 Discussão e Conclusão

A elicitação é um processo que depende de muitos fatores tais como o tipo de contato da cultura com o elicitor, além de variar de espécie para espécie, e ser de suma

importância para determinar a concentração deste elicitor para obter o metabólito de interesse (NAMEDO,2007).

Figueira et al ., 2008, constatou que o nitrato de prata (AgNO_3) e o ácido acetilsalicílico (AAS), nas concentrações utilizadas, de 5,0 mg.L-1 de nitrato de prata (AgNO_3) e ácido acetilsalicílico (AAS), nas concentrações de 0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mg.L-1 não são eficientes na regeneração dos proembriões, nas anteras das cultivares de cafeeiro em Catuaí Vermelho e Mundo Novo.

Em contraste, neste trabalho pode-se observar que os tratamentos realizados com AS e AgNO_3 nas concentrações de 30 e 60 μM , para os parâmetros de crescimento não apresentaram variedade de alteração em relação ao controle.

Para Brandão, 2012 houve decréscimo no crescimento de plantas de *Alternanthera tenella colla*, quando comparou os tratamentos com AS de 0 a 400 μM . Outro fator observado foi a maneira de inocular o explante, Brandão 2012 inoculou o explante diretamente no meio contendo o elicitor, enquanto em neste trabalho inoculou em meio fresco e depois de 10 dias se transferiu para o meio com elicitor, assim a possível toxicidade pode ter sido reduzida ou evitada, pois a plântula não estava debilitada e sim já estabelecida.

Segundo Gazolla, 2014, elicitou caju-do-cerrado *in vitro* com AgNO_3 e AS, e observou a capacidade de alterar teores de substâncias quantificados pelo autor. Sendo que para os teores de amentoflavona houve aumento considerado em relação aos outros elicitores testados, contudo com AgNO_3 obteve melhor resultado. Outro fator observado em relação ao trabalho do mesmo autor foram os resultados relatados com elicitação de AgNO_3 e AS, para teores de ácido 3,4-diidroxibenzoico, principalmente utilizando a concentração de 30 μM para ambos. Portanto em plântulas de *H. marruboides* elicitadas com AS e AgNO_3 nas mesmas concentrações de 30 e 60 μM realizadas por Gazolla 2014, observa-se aumento considerável em teor de rutina nas plantas elicitadas com AS 30 μM , mas em condições de cultivo diferente do que realizadas por Gazolla 2014.

3.5 Referências Bibliográficas

AL-KHAYRI, J.M.; AL-BAHRANY, A.M. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date. **Current Science**, v.81, p.1166-1170, 2001.

BARBOSA, P.P.P.; RAMOS, C.P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq in rats. **Phytother**, v.6, p.114-115, 1992.

BOTREL, P.P. et al. Teor E Composição Química Do Óleo Essencial De *Hyptis marrubioides* Epl. Lamiaceae em Função Da Sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 533-538, 2010 a.

BOTREL, P.P. et al. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marrubioides* Epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Quim. Nova**, v. 33, p. 33-37, 2010b.

BRANDÃO, I. R. **Ácido salicílico como elicitador abiótico no cultivo *in vitro* de plantas de *Alternanthera tenella* Colla**. Pelotas, 2012. 50F. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas.

CURTIS, H.; NOLL, U.; STORMANN, J.; SLUSARENKO, A.J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.65, p.79-89, 2004.

DJILIANOV, D. et al. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.115-118, 2005.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Rev. Bras. Farm**, v.84, p.68-74, 2003.

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

FIGUEIRA, ER, *et al* . Influência do 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico não cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Científica**, v. 36, p.27-33, 2008.

GAZOLLA, A. P. **Produção de compostos fenólicos por elicitación abiótica em plântulas de *anacardium othonianum* rizz cultivadas *in vitro***. Rio verde, 2014. Dissertação(Mestrado em ciências agrárias)- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde.

LUM, M. S. Quantification of Sakuranetin in Paddy Leaves and Stem after Elicitation with Abiotic Elicitors (UV, AgNO₃, CuSO₄). **Modern Applied Science**, p. 210-216, 2009.

MARASCHIN, M. et al. Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical approach in *Mandevilla velutina* cultured cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.633-643, 2002.

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

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

OZDEN-TOKATLI, Y. et al. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, v.106, p.415-426, 2005.

CAPÍTULO 4 – PERFIL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *HYPTIS* *MARRUBIOIDES IN VITO E EX VITRO*

RESUMO

A Família Lamiaceae que pertence à ordem Tubiflorae, abrange cerca de 200 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies distribuídas em todo mundo, destacando o gênero *Hyptis*. Uma espécie pouca estudada deste gênero denominada *Hyptis marrubioides*, oriunda do Cerrado brasileiro, apresenta grandes propriedades medicinais que são usadas como anestésicos, antiespasmódicos e anti-inflamatórios. Este trabalho enfoca o perfil fitoquímico e atividade esquistossomicida desta espécie. Os extratos etanólicos e em acetato de etila foram analisados das folhas do cultivo *in vitro* e no cultivo no campo, por Cromatografia de alta eficiência (CLAE) e CG-EM, respectivamente permitindo a identificação de dois compostos o aromadendrenepoxide e (3 beta,24S) stigmast-5-em-3ol, desta espécie em seu extrato metanólico. O potencial esquistossomicida do extrato bruto destes dois tipos de cultivo foi avaliado *in vitro* frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Os resultados indicaram que o extrato do campo (*ex vitro*), foi o mais ativo dentre os dois extratos brutos testados, promovendo a morte de 100% dos parasitas nas concentrações de 100 µg/ml e 200µg/ml a partir das 48 horas de incubação.

PALAVRAS-CHAVE: atividade esquistossomicida, estudo fitoquímico, Lamiaceae, *Hyptis marrubioides*.

ABSTRACT

The Lamiaceae family belongs to Tubiflorae order, covers about 200 genera and 3,200 species distributed worldwide, highlighting the *Hyptis* genre. A few studied species of this genus called *Hyptis marrubioides*, coming from the Brazilian Cerrado, has great medicinal properties that are used as anesthetics, antispasmodic and anti-inflammatory. This work focuses on the phytochemical profile and schistosomicidal activity of this species. The ethanol and ethyl acetate extracts were analyzed from leaves *in vitro* cultivation and in the field, by high performance liquid chromatography (HPLC) and GC-MS, respectively, allowing the identification of the two compounds aromadendrenepoxide and (3 beta, 24S) stigmast-5-in-3LO, this species in its methanol extract. The schistosomicide potential of crude extract of these two types of crop was evaluated *in vitro* against adult's worms of *Schistosoma mansoni*. The results indicated that the extract field (*ex vitro*) was the most active among the two crude extracts tested, promoting the death of 100% of the parasites in concentrations of 100 ug / ml from 48 hour of incubation .

KEY WORDS: schistosomicidal activity, Phytochemical studies, Lamiaceae, *Hyptis marrubioides*.

4.1 Introdução

Nos últimos anos têm crescido muito o interesse por substâncias extraídas de plantas para a produção de medicamentos para o homem. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais, contribuem para os estudos multidisciplinares e a investigação preliminar de constituintes químicos presentes. (GOBBO-NETO E LOPES, 2007).

A Família Lamiaceae que pertence a ordem Tubiflorae, abrange cerca de 200 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies distribuídas em todo mundo, destacando o gênero *Hyptis* que inclui cerca de 775 espécies na América Tropical. O gênero *Hyptis* possui grande diversidade morfológica, caracterizado por seus componentes aromáticos presentes nos óleos essenciais, por causa de suas propriedades medicinais que são usados como anestésicos, antiespasmódicos, anti-inflamatórios e pode induzir aborto em doses elevadas (BOTREL et al., 2010a e PORTER, 2010). Em estudos realizados no IF - Goiano anteriormente com plântulas de *Hyptis marrubioides*, estabelecidas por Vitorino, (2012), revelam a capacidade de isolados endofíticos da raiz desta espécie na solubilização com fosfato de cálcio em GELP médio e com fosfato de ferro nas modificações em meio basal. Em outro estudo complementar a comunidade endofítica radicular de *H. marrubioides* foi caracterizada, detectando-se as bactérias e fungos endofíticos presentes (VITORINO, 2012b).

O potencial antifúngico de *H. marrubioides* é pouco explorado, no entanto foram realizados estudos recentes por da Silva et al. (2012a) que teriam revelado que o óleo essencial desta espécie tem prevenido o tratamento da ferrugem da soja Asiática, assim os testes *in vivo* apresentaram 100% de inibição da germinação de *Phakopsora pachyrhizi*, principal agente etiológico desta doença.

Assim, a técnica de cultura de tecidos de planta *in vitro*, permite o aumento da produção e causa menos danos ambientais, por isso contribui para que os laboratórios e os países que adotam tenham mais vantagens competitivas. (BARRUETO, 2000; 2010).

Contudo a área endêmica no Brasil abrange 19 estados com aproximadamente 42 milhões de habitantes expostos ao risco, e cerca de 7 milhões de indivíduos infectados pelo parasita trematódeo da espécie *Shistosoma mansoni*, conhecido com o nome popular de doença do caramujo ou barriga-d'água (BRASIL,2009) provocando 505 óbitos no Brasil entre ao anos de 2000 a 2010, as pessoas acometidas com esta doença apresentam graves deficiências, provocando assim sérios problemas de saúde em um país em desenvolvimento (LAMBERTUCCI E BARRAVIEIRA, 1994; KING, 2009; MELO E COELHO, 2005; BRASIL, 2011b). A importância da busca de novos fármacos através destas plantas medicinais é uma possibilidade para o tratamento da esquistossomose no país.

Este trabalho teve o objetivo de caracterizar o perfil químico de *Hyptis marrubioides*, e investigar o potencial esquistossomicida *in vitro* para esta espécie.

4.2 Metodologia

O cultivo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, cujas coordenadas geográficas são: 17° 47'' e 53'' de latitude Norte e 51° 55'' 53'' de latitude Sul, e altitude de 743 m. E o perfil químico foi conduzido no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UNIFRAN – Universidade de Franca – SP.

4.2.1 *Hyptis in vitro*

4.2.2 Material Vegetal *in vitro*

Os materiais vegetais utilizados foram sementes das espécies *H. marrubioides* Epling, as mesmas foram imersas em solução contendo 2 fungicidas sistêmicos, 0,2% de Bendazol (Carbendazin) e 0,2% Alternó (Tebulonazole), durante 1 hora e em seguida, em hipoclorito de sódio puro por 30 minutos, lavadas em água estéril por (3x), o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar e pH 5,8. Foram utilizados tubos

de ensaio contendo 20 mL de meio (figura 1). As culturas foram incubadas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 1. Germinação de *Hyptis marrubioides* Epling.

Após trinta dias as plântulas obtidas foram levadas a estufa de ventilação forçada a 35°C até atingirem massa constante, o material seco foi armazenado em local fresco e seco para a realização das análises químicas.

4.2.3 Obtenção do extrato bruto

Após o processo de estabilização e secagem, as folhas de *H. marrubioides* cultivadas *in vitro*, foram maceradas, pesando-se 2g de pó seco, adicionado etanol (PA), levadas a ultrassom por 30 min, realizando assim três extrações *over night*, depois das extrações realizadas foi filtrado com papel de filtro e levadas ao rotavapor, obtendo o respectivo extrato bruto (1,3197g).

4.2.4 *Hyptis ex vitro*

4.2.5 Material Vegetal e obtenção do extrato bruto

Foram utilizadas as partes aéreas de plantas de *Hyptis marrubioides* Epling cultivadas *ex vitro*, estas foram secas e moídas, pesando 2g de pó seco, adicionado

etanol (PA), levadas a ultrassom por 30 min, realizando assim 3 extrações *over night*, depois das extrações realizadas foi filtrado com papel de filtro e levadas ao rotavapor, obtendo o respectivo extrato bruto (1,1434g).

4.2.6 Análise cromatográfica

Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, de sistema binário SHIMADZU Proeminence-LC-20AD, equipado com injetor automático SIL-20A HT, acoplado ao detector: UV-VIS modelo SPD-M20A com arranjo de diodo. A coluna analítica usada foi da Phenomenex Phase GEMINI, (250 x 4,6 mm, 5 μ m), C18, equipada com pré-coluna de mesmo material, e forno CTO-20A. O volume injetado foi de 20 μ L, fluxo foi de 1 mL min⁻¹ e λ 254 nm. A temperatura permaneceu constante em 40 °C. A análise foi efetuada em 60 min com eluente em gradiente linear: CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (5: 94,9: 0,1 v/v/v), CH₃OH 100% em 30 min, 10 min em MeOH 100% e 20 min para retornar a condição inicial (figura 2). O padrão externo utilizado foi a rutina. A aquisição de dados foi realizada através de um microcomputador.

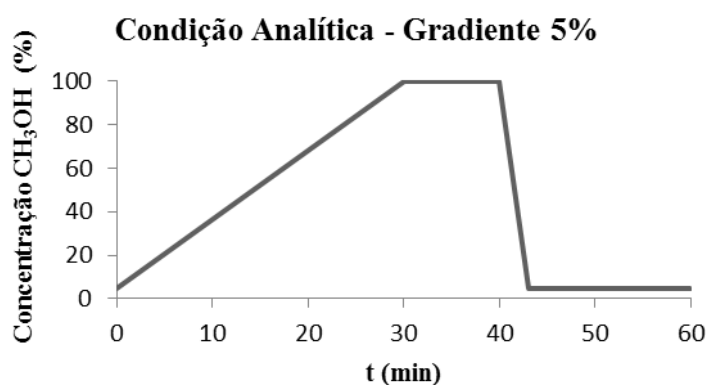


Figura 2. Condição Analítica Gradiente 5%, variação da concentração de metanol (CH₃OH) pelo tempo.

4.2.7 Análises por CG/EM

Os extratos de *Hyptis marruboides* Epling *in vitro* e *ex vitro*, foram analisadas em equipamento Shimadzu modelo QP-2010 (baixa resolução). Foi utilizada coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 μ m de filme), gás de arraste He a fluxo

1,1mL min⁻¹, Split 1:10. A temperatura do injetor foi ajustada em 250 °C e a temperatura do forno foram controladas de 100 a 290 a 3 °C min⁻¹, permanecendo em 290 °C por 30 min. Os espectros de massas, obtidos a 70ev, foram comparados com os das Bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 através do *software* GCMS Solution (Shimadzu), que forneceu o índice de similaridade (SI), expresso em porcentagem.

Preparo das amostras para a análise por CG/EM

Os extratos foram preparados empregando 50 mg do pó, obtido das partes aéreas, em 3 mL de acetato de etila P.A. (Synth). Após 20 min de banho de ultrassom, as amostras foram filtradas, obtendo os respectivos extratos brutos.

4.2.8 Atividade Biológica

Ensaio da atividade esquistossomicida

Manutenção do Ciclo de Vida de *S. mansoni*.

O ciclo biológico de *S. mansoni*, linhagem LE é rotineiramente mantido pela passagem seriada em moluscos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro invertebrado e em camundongos Balb/C como hospedeiro vertebrado (HACKETT, 1993). Os ovos de *S. mansoni* presentes nas fezes de camundongos previamente infectados com o parasita são recolhidos pelo método de Hoffmann e expostos por aproximadamente 1 hora sob luz, para a liberação dos miracídios (figura 3). Os miracídios são utilizados para infectar o hospedeiro intermediário, que após 38 a 43 dias liberam a forma infectante do parasita, as cercarias, que por sua vez infectarão o hospedeiro vertebrado. As cercarias são inoculadas nos camundongos via subcutânea e após aproximadamente 45 dias os vermes adultos são recuperados do sistema portahepático por perfusão (SMITHERS & TERRY, 1965). Após a coleta, os parasitas serão mantidos em meio RPMI 1640 (Invitrogen) até o momento do uso.

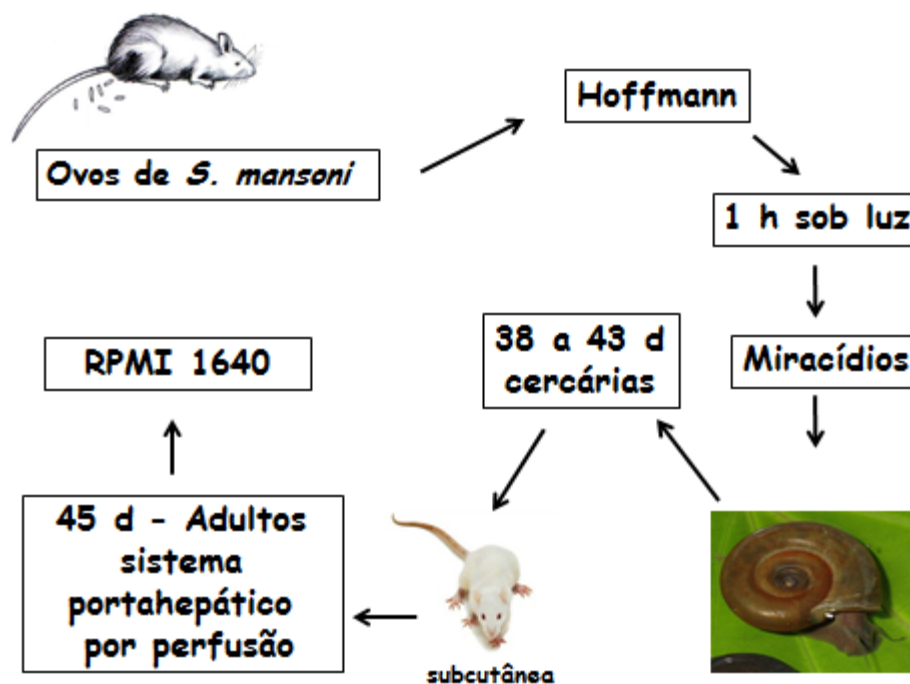


Figura 3. Inoculação das cercarias por via subcutânea em camundongos. Fonte: Google imagens.

Avaliação das amostras em Vermes Adultos Mantidos *in vitro*

Casais de vermes adultos foram recuperados de camundongos Balb/c ou Swiss, via perfusão do sistema porta-hepático em condições assépticas, como descritas anteriormente. Em seguida, os parasitas serão lavados em RPMI 1640 (Gibco) tamponado com HEPES 20 μM , PH 7,5, suplementado com penicilina (100U/mL), estreptomicina (100 μg /mL) e 10% de soro bovino fetal (Gibco). Posteriormente, um casal de verme adulto será transferido por poço em uma placa de cultura de 24 poços contendo o mesmo meio descrito anteriormente e incubados em atmosfera umidificante a 37°C na presença de 5% CO₂. Após 24 horas de incubação, os compostos previamente dissolvidos serão adicionados ao meio RPMI 1640 em diferentes concentrações (figura 4). Os parasitas foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente por 120 horas e monitorado a cada 24 horas usando um microscópio invertido (Leitz Diavert) para avaliar as condições gerais dos parasitas como: taxa de mortalidade e atividade motora.

Como controles negativo, serão utilizados vermes adultos mantidos em meio RPMI 1640 ou em meio RPMI 1640 com o solvente dos compostos e como controle positivo, será utilizado vermes adultos incubados com 1 μM de Praziquantel. Serão

realizados três independentes experimentos, sendo avaliados dez casais de parasitas por concentração (MAGALHÃES et al., 2009).

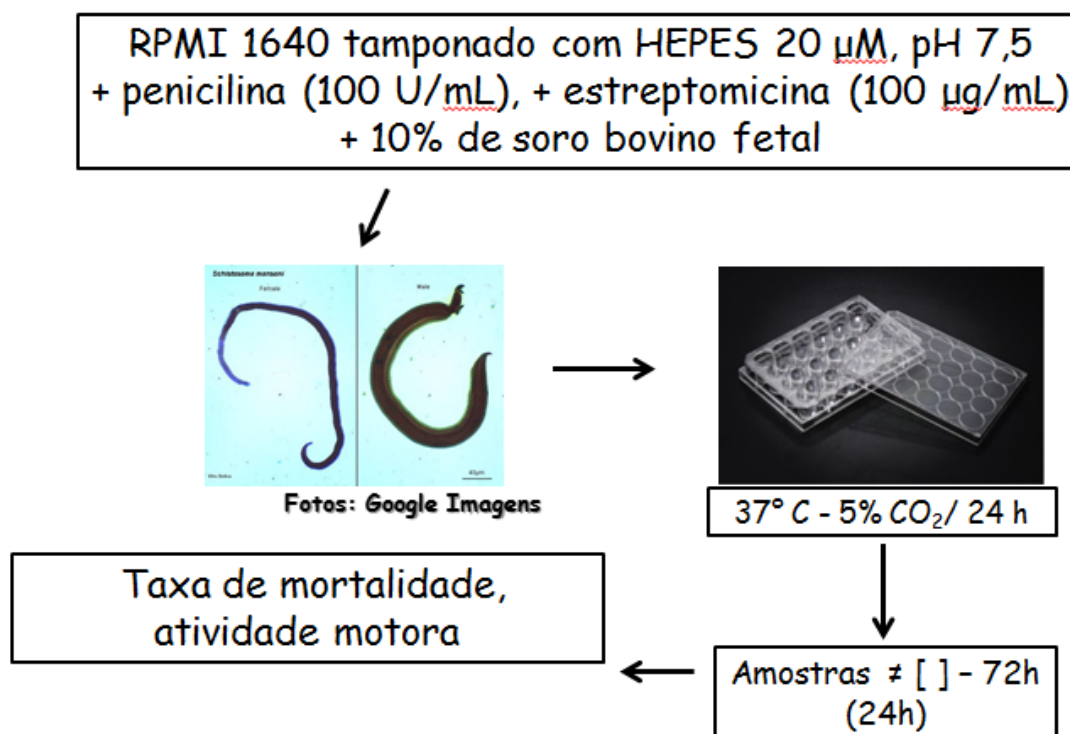


Figura 4: Avaliação da atividade esquistossomocida *in vitro*, vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Google imagens.

4.3 Resultados e Discussões

4.3.1 Estudo fitoquímico

O extrato metanólico bruto de HM *in vitro* e HM *ex vitro*, foram analisados por CLAE. Como se podem observar as substâncias presentes no extrato de HM *in vitro* se diferenciam do extrato HM *ex vitro*, pois apresentam substâncias com tempo de retenção variado. O extrato de HM *in vitro* apresenta perfil cromatográfico em 16,8, 24,4, 31,6 e 36,5 min. Enquanto no HM *ex vitro* observa se um pico majoritário em 20,48 min, no entanto suas outras substâncias se apresentam minoritárias. Os dados estão representados nas figuras 5 e 6.

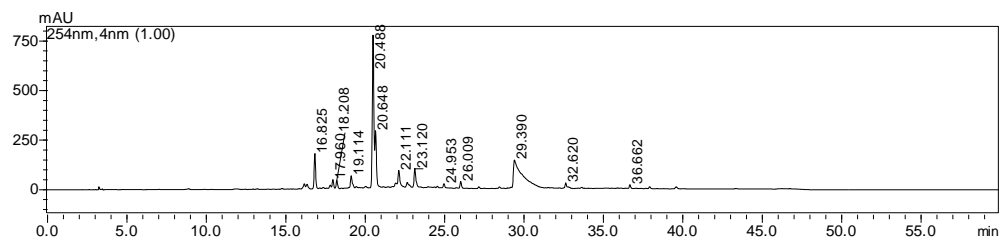


Figura 5. Cromatograma obtido por CLAE do extrato bruto da planta *ex vitro* de *Hyptis marrubioides*.

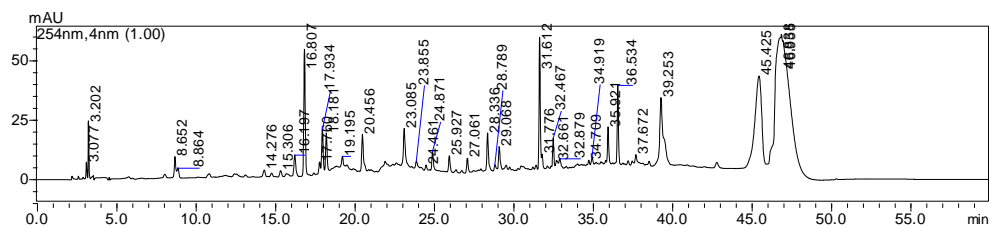


Figura 6. Cromatograma obtido por CLAE do extrato bruto da planta *in vitro* de *Hyptis marrubioides*.

4.3.2 Análise por CG-EM dos extratos

Os extratos em acetato de etila de HM *ex vitro* e HM *in vitro* foram analisados por CG-EM, com o objetivo de identificar substâncias majoritárias (com maiores áreas) apolares e observar o índice de similaridade (maior que 80%) proposto na biblioteca de padrões do aparelho utilizado. Pode-se observar os cromatogramas obtidos nas figuras 7 e 8.

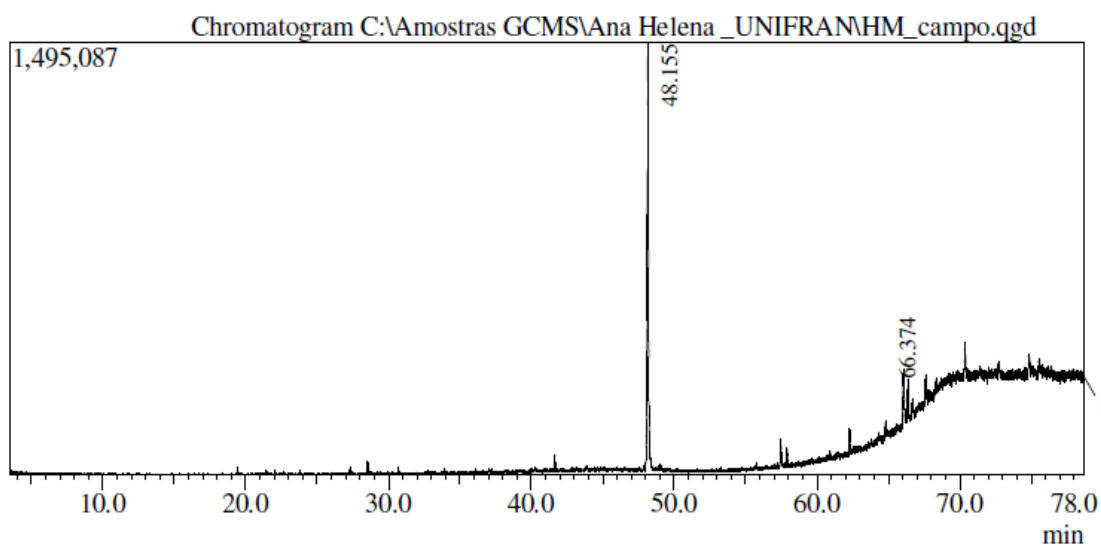
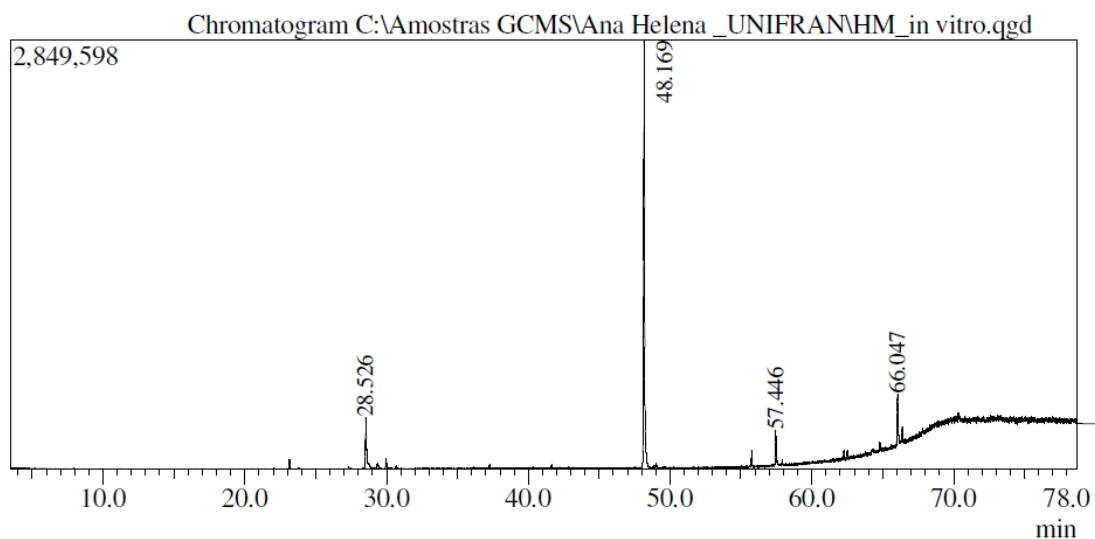


Figura 7. Cromatograma total obtido via CG-EM de HM *ex vitro*.**Figura 8.** Cromatograma total obtido via CG-EM de HM *in vitro*.

O cromatograma total obtido por CG-EM apresentou pico majoritários em t_R 48.155min, além de 1 pico de menor intensidade em 66.374min para as duas amostras de extrato bruto, tanto para HM *ex vitro* quanto para HM *in vitro*. Portanto pode-se constatar a semelhança dos extratos, identificando dois compostos, o majoritário um sesquiterpeno Aromadendrenepoxide e o fito esteroide Estigmasterol respectivamente, descritos na tabela 1. Os espectros de massa podem ser verificados nas figuras 10 e 11.

Tabela 1. Composição química dos extratos *in vitro* e *ex vitro* de *H. marrubioides*.

Composto	Formula molecular	M^+	t_R (min)	Área (%)
Aromadendrenepoxide	$C_{15}H_{24}O$	220	48,16	94,90
Estigmasterol	$C_{29}H_{50}O$	414	66,04	9,10

As estruturas químicas foram propostas com base nos espectros de massa obtidos e em comparação com os espectros de massa na biblioteca de padrões do equipamento CG-EM, representados na figura 9 abaixo.

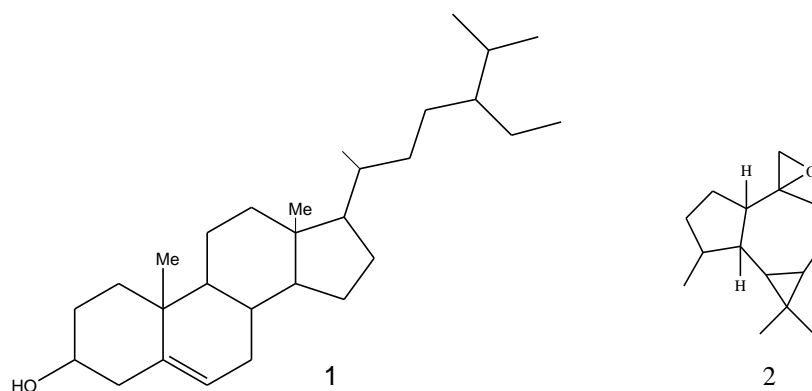


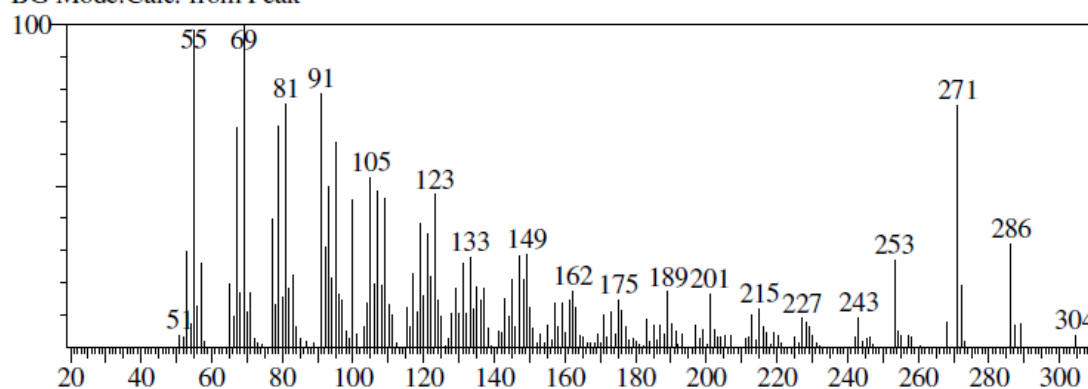
Figura 9. Estrutura química de substâncias obtidas dos extratos de *H. marrubioides*, estigmasterol (1), Aromadendreneóxido (2).

<< Target >>

Line#:1 R.Time:48.155(Scan#:8932) MassPeaks:178

RawMode:Averaged 48.150-48.160(8931-8933) BasePeak:69.05(55743)

BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:120411 Library:WILEY7.LIB

SI:81 Formula:C₁₅H₂₄O CAS:85710-39-0 MolWeight:220 RetIndex:0

CompName:AROMADENDRENEPOXIDE-(II) \$\$

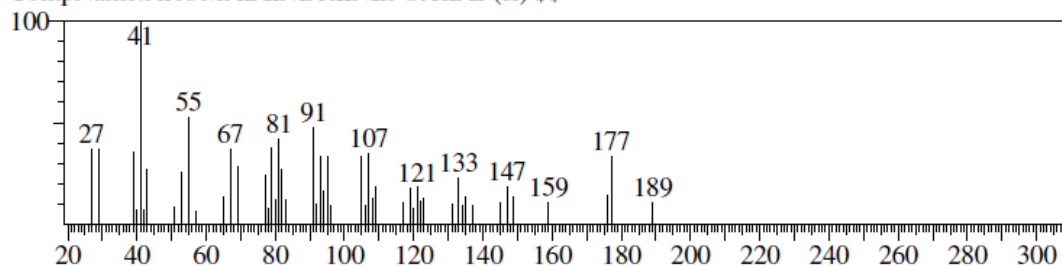


Figura 10. Espectro de massa obtido da substância com T_R 48,1 min via CG-EM.

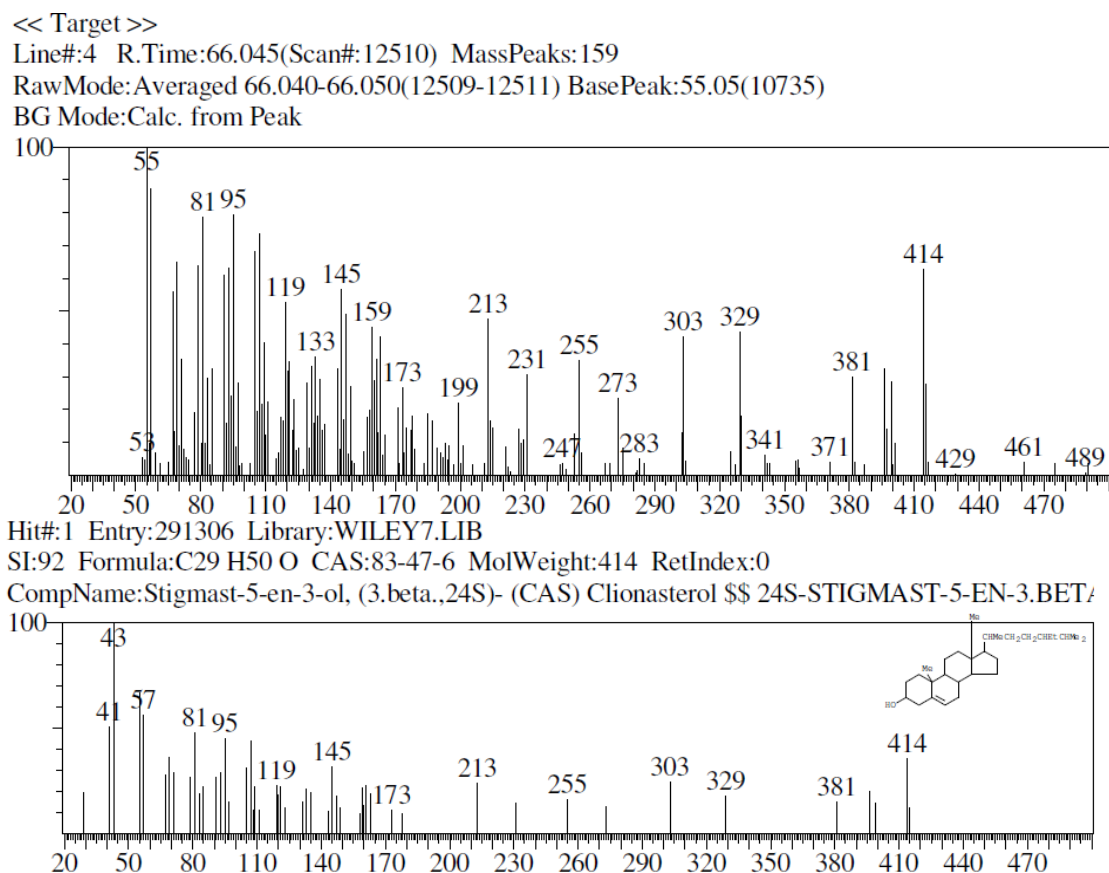


Figura 11. Espectro de massa obtido da substância com T_R 66,0 min via CG-EM.

Conclui-se que a espécie de *Hyptis marrubioides* quando cultivada *in vitro* ou no campo possui metabólitos semelhantes em sua composição química, referente ao extrato metanólico desta planta.

4.3.3 Atividade biológica

4.3.1 Atividade esquistossomicida dos extratos

O potencial esquistossomicida dos extratos brutos de HM *in vitro* e HM *ex vitro*, provenientes da extração *over night* foram avaliados *in vitro* frente aos vermes adultos de *schistosoma manssoni*. As amostras foram testadas nas concentrações de 12.5, 50, 100 e 200 μ g/ml, utilizando o praziquantel como controle positivo. Observando se a % do índice de mortalidade, nos períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas,

verificou que no extrato do campo (HM *ex vitro*) nas concentrações de 100 µg/ml e 200µg/ml houve morte significativa dos vermes de *schistosoma manssoni* a partir das 48 horas de incubação, sendo que nas concentrações de 12.5, 25 e 50 µg/ml apresentou aumento da morte destes vermes à medida que a concentração dos extratos foi aumentada. Dados representados na tabela abaixo.

Tabela 2. Potencial esquistossomicida de *Hyptis marrubioides in vitro* e *ex vitro*.

Amostra	Período de Incubação (h)	% de vermes mortos nas concentrações				
		12,5µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	100 µg/ml	200µg/ml
	24	25	75	75	50	100
HM <i>ex vitro</i>	48	50	75	75	100	100
	72	50	75	100	100	100
	24	75	75	75	75	75
HM <i>in vitro</i>	48	75	100	75	75	75
	72	75	100	75	75	75
Controle positivo	24	100	-	-	-	-
Praziquantel	48	100	-	-	-	-
	72	100	-	-	-	-
Controle negativo	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0

Observando a % da redução da atividade motora, os extratos *in vitro* apresentam resultados bastante satisfatórios, pois com a dose de 12,5 µg/ml e com tempo de incubação de 24,48 e 72 horas demonstra diminuição na atividade de 75% dos vermes de *schistosoma manssoni*. Com dose de 25 µg/ml no tempo de incubação de 48 horas obteve 100% desta atividade não significativa. Para o extrato *ex vitro* com dose de 12,5 µg/ml apresenta 50% desta atividade com período de incubação por 24 horas.

Tabela3. Potencial esquistossomicida da redução da atividade motora não significativa e significativa de *Hyptis marrubioides in vitro* e *ex vitro*.

Amostra	Período de Incubação (h)	Redução da atividade motora				
		Não Significativo				
		12,5µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	100 µg/ml	200µg/ml
	24	50	25	0	0	0
HM <i>ex vitro</i>	48	50	0	0	0	0
	72	50	0	0	0	0
	24	75	75	75	75	75
HM <i>in vitro</i>	48	75	100	75	75	75
	72	75	100	75	75	75

Amostra	Período de Incubação (h)	Reducao da atividade motora				
		Significativo				
		12,5µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	100 µg/ml	200µg/ml
	24	25	0	25	50	0
HM <i>ex vitro</i>	48	0	25	25	0	0
	72	0	25	0	0	0
	24	0	0	0	0	25
HM <i>in vitro</i>	48	12,5	0	25	25	25
	72	12,5	0	25	25	25

Redução da atividade motora: Definida como significativo- Caso houvesse a redução no movimento dos parasitas quando comparados ao controle positivo. Definida como não significativo- Caso houvesse movimento ocasionais na cabeça, corpo e espasmos esporádicos. Definida mortalidade-ausência de movimentos por mais de 2 minutos de observação (Silva, 2013).

De acordo com SOUZA 2012, o potencial esquistossomicida do extrato bruto e frações provenientes de partição líquido da espécie *Roupala montana* foram testados

quanto sua atividade, obtendo como resultados frente a este verme, a fração RP2 a mais ativa dentre as amostras testadas na dose de 50 µg/ml no quinto dia de tratamento. Para o triterpeno 3B-0 palmiato de 7,15dii droxi lep20 (29)-em (1), mostrou-se ativo frente a este verme esquistossomicida, apresentando morte de 25 a 50% dos vermes adultos nas concentrações de 200 µg/ml (SILVA, 2013).

Contudo para extrato HM *ex vitro* apresentou ótima atividade frente a este verme *schistosoma manssoni* com dose de 12.5 µg/ml já começou apresentar morte parcial destes vermes com 24 horas de incubação.

4.4 Referências Bibliográficas

BARRUETO CID, L.P. (Ed.). Embrapa Informação Tecnológica. Brasília: **Cultivo in vitro de plantas**, p.303, 2010.

BARRUETO CID, L.P. (Ed.). Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília: **Introdução aos hormônios vegetais**, p.205, 2000.

BOTREL, P.P. et al. Teor E Composição Química Do Óleo Essencial De Hyptis marrubioides Epl. Lamiaceae em Função Da Sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 533-538, 2010 a.

BRASIL (b). Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Esquistossomose mansoni no Brasil. Coordenação Geral de Doenças Negligenciadas. Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. Junho de 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresent_esquistossomose_mansoni_30_05_2011.pdf. Acessado em 22 de junho de 2011.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistencia Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM, Brasília, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v 30, p 374-381, 2007.

HACKETT, F. The cultures of Schistosoma mansoni and production of life cycle stages **Methods Mol Biol**, v.21, p.89-99, 1993.

KING, C.H. Toward the elimination of schistosomiasis. **N Engl J Med** v.360, p.106-109, 2009.

LAMBERTUCCI, J. R. & BARRAVIERA, B. Esquistossomose monsonica: estudo clínico. **Jornal Brasileiro Medicina** v.67, p.59-100, 1994.

MAGALHÃES, L.G. et al. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitol**, v.10, p.712-727, 2009.

MELO, A.L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed São Paulo: Atheneu p.193-212, 2005.

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

PORTER, R.; FACEY, P.; MCNEIL, M. Essential Oils from the Hyptis genus – A Review (1909-2009). **NPC Natural Product Communications**, v.6, p.1775-1796, 2011.

SILVA, A.C. et al. Essential oils for preventative treatment and control of Asian soybean rust. **Eur J.Pathol**, v.134, p.865-871, 2012a.

SILVA, C. A. Investigaçao química e biológica de *Struthanthus syringifolius* Mart.(Loranthaceae). Franca, 2013. Dissertação (Mestrado em CIENCIAS)-Universidade de Franca.

SOUZA, H.C. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades esquistossomicidas, antimicrobiana e acetilcolinesterásica de *Roupala Montana* Aubl.(Proteace). Franca, 2012. Dissertação (Mestrado em CIENCIAS)-Universidade de Franca.

VITORINO, L.C. et al. Solubilization of calcium and iron phosphate and in vitro production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). **International Research Journal of Biotechnolog**, v. 3, p. 47-54, 2012a.

VITORINO, L.C. et al. The isolation and characterization of endophytic microorganisms from *Hyptis marrubioides* Epling roots. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.12766-12772, 2012b.

5. CONCLUSÃO GERAL

Com este trabalho pode-se concluir a importância da investigação esquistossomicida inédita frente aos extratos de *Hyptis marrubioides* cultivadas *in vitro*, muitos relatos são de seus óleos essenciais. As atividades farmacológicas oriundas de plantas são muito importantes, pois alavancam novas descobertas. É importante ressaltar o cultivo desta planta *in vitro*, incluindo a elicitação abiótica, quanto a qualidade de luz e a adição de AS e AgNO₃ nesta espécie. Em relação aos parâmetros de crescimento, os tratamentos com luz verde e vermelha apresentaram diferença significativa em relação à luz branca (controle). Para os tratamentos com AS e AgNO₃ não apresentaram diferenças significativas. Em relação ao teor de rutina, maiores teores ocorreram em plântulas cultivadas sob luz branca para 20 e 30 dias. Já para os elicitores no 1º procedimento se observa maior teor de rutina para tratamento com AgNO₃ 30µM e para 2º procedimento se constata melhor teor com tratamento de AS 30 µM obtendo destaque para período de 6 dias. O extrato *in vitro* e *ex vitro* quando avaliados por CG-EM apresentaram mesmo perfil químico. Na avaliação da atividade esquistossomicida o extrato *in vitro*, se mostrou mais ativo frente aos fatores morte e redução da atividade motora.

Portanto *Hyptis marrubioides* cultivadas *in vitro* é uma espécie promissora na elicitação abiótica, incentivando a continuidade dos seus estudos para melhor compreensão do seu potencial farmacológico.