

Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta *in natura* de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae)

André, A.C.G.M.¹; Dias, D.A.¹; Pereira, P.S.²; Abreu, L.C.P.²; França, S.C.^{2*}

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

²Universidade de Ribeirão Preto, Unidade de Biotecnologia.

Resumo

A cultura de calos de *Gomphrena globosa* a partir de segmentos foliares foi estabelecida em meio contendo combinações dos fitoreguladores auxina/citocinina. Metabólitos secundários identificados através da fitoquímica da planta *in natura*, foram utilizados como padrões em análises por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia de gás de extratos da cultura. O estudo comparativo revelou que os calos foram capazes de produzir alguns metabólitos sintetizados pela planta *in natura*.

Abstract

The culture of calluses of *Gomphrena globosa* starting from segments foliate was established in half containing combinations of the phyto regulators auxina/citocinina. Identified secondary metabolites through the phytochemistry of the plant *in natura* were used as patterns in analyses for high performance liquid chromatography and gas chromatography of extracts of the culture. The comparative study revealed that the calluses were capable to produce some metabolite synthesized by the plant *in natura*.

Amaranthaceae pertence à classe Magnoliopsida e ordem Caryophyllales¹. É constituída de aproximadamente 1000 espécies, distribuídas em cerca de 65 gêneros, difundidos nos trópicos, subtropicos e regiões temperadas². Algumas espécies da família são utilizadas na medicina popular, onde são empregadas no tratamento de afecções bronquiais, diarreia e febre, e como analgésico, tônico, afrodisíaco, antidiabético³⁻⁶, e no tratamento de doenças virais, como hepatite, parotites, febre hemorrágica e influenza⁷. A análise

química da família revela diferentes classes de metabólitos, como betalainas, ecdisteróides, triterpenóides, esteróides, saponinas, flavonóides e alcalóides.

Extratos aquosos obtidos das raízes de *G. globosa* apresentaram atividade anti-neoplásica sobre o adenocarcinoma de mama e melanoma⁸ e esses resultados incentivaram o prosseguimento de estudos fitoquímicos e biotecnológicos envolvendo essa espécie.

A fitoquímica da planta *in natura*, foi realizada com extratos de crescente polaridade. No extrato hexânico foram identificados os esteróides estigmasterol, sitosterol e campesterol, enquanto que no diclorometânico predominaram os triterpenos taraxerol, epitaraxerol e taraxerona e o ácido 3, 4 - dimetoxibenzóico. O extrato metanólico apresentou a maior diversidade de metabólitos, onde foi possível avaliar a presença de diferentes substâncias nitrogenadas, como a alantoína e adenosina, e aromáticas como os flavonóides 4',5-diidroxi-6,7-metilenodioxiflavonol-3-O- β -D-glicose e 4',5-diidroxi-6,7-metilenodioxiflavonol. A identificação das substâncias foi realizada através de métodos espectrométricos de IV, RMN¹H, RMN¹³C e UV e por cromatografia de gás (CG). Algumas destas moléculas isoladas da planta *in natura* foram utilizadas como padrões nas análises quali-quantitativas sendo que os flavonóides, a alantoína e o derivado do ácido benzóico foram utilizados nas análises por CLAE e os esteróides e triterpenos em CG.

Explantes foliares de *G. globosa* foram utilizados no estabelecimento dos cultivos *in vitro* empregando-se duas combinações dos fitoreguladores auxinas/citocininas: ácido naftaleno acético (ANA)/6-benzilaminopurina (BAP) e 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D)/6-furfurilaminopurina (KIN).

A desdiferenciação, ou seja, formação de calo, ocorreu nos dois meios e os melhores resultados foram obtidos com 2,4-D e KIN onde os calos apresentaram-se claros e mais friáveis.

O estudo comparativo da produção de metabólitos na cultura de células e na planta *in natura*, mostrou que os calos foram capazes de produzir principalmente a alantoína e o flavonóide glicosilado, enquanto que apenas traços dos esteróides e triterpenos foram detectados. Além disso, verificamos que os perfis cromatográficos mostraram a presença de várias substâncias nos extratos de calos que não foram verificados nos extratos da planta *in natura*. O acúmulo de alantoína em cultura de células de plantas podem ser verificados em alguns trabalhos descritos na literatura⁹⁻¹¹, sendo que estes autores descrevem que alantoína é um dos produtos do catabolismo de prolinas. Já os estudos

sobre o acúmulo de flavonóides em cultura de células de plantas estão bem sedimentados, contudo poucos relatos sobre flavonóis são descritos na literatura¹²⁻¹⁴.

Sendo assim, este trabalho exploratório, realizado pela primeira vez com o cultivo *in vitro* de explantes foliares de *G. globosa*, permitiu avaliar parcialmente o metabolismo dos calos e prever que as células cultivadas nas condições experimentais definidas são competentes para produzir alguns metabólitos da planta *in natura*.

Estudos com culturas de células em suspensão de *G. globosa* estão sendo conduzidos utilizando estimuladores biológicos, químicos e físicos com o objetivo de verificar a influência destes estimuladores na produção das substâncias identificadas e outras substâncias que estão sendo estimuladas.

Material e Métodos

Coleta e identificação: O material vegetal de *G. globosa*, coletado no campus da UNAERP em julho de 1995, foi identificado pelo Prof. Josafá Carlos de Siqueira (PUC do Rio de Janeiro) e exsicata da espécie está depositada nos herbários Friburguense (SCAB 4050) e da USP de Ribeirão Preto (SPFR 05310).

Fitoquímica da planta in natura: As partes aéreas e raízes do vegetal foram estabilizadas e secas em estufa de ar circulante à 40 °C e pulverizadas em moinho de faca. O pó obtido foi extraído sucessivamente com clorofórmio e metanol. Os extratos obtidos foram reunidos e particionados em hexano, diclorometano e metanol. Os extratos hexânicos e diclorometânicos foram fracionados em colunas cromatográficas empregando como fase estacionária sílica gel, enquanto que o extrato metanólico foi purificado utilizando Sephadex LH-20.

Identificação: Para a identificação dos metabólitos, foram utilizados espectrofotômetros de IV, PERKIN-ELMER 1420 e NICOLET (modelo Protege 360), espectrofotômetros de UV BECKMAN DU-70 e NICOLET (modelo Protege 460), espectrômetros BRUCHER DPX operando em 200 e 300 MHz para obtenção de espectros de RMN¹H e em 50 e 75 MHz para espectros de RMN¹³C e Cromatógrafo à gás HEWLETT-PACKARD modelo 5890.

Cultivo in vitro

Segmentos foliares, utilizados como explantes no estabelecimento dos cultivos *in vitro* de *G. globosa*, foram submetidos a desinfestação superficial que incluiu: tratamento com fungicida sistêmico benomil (solução 1% por 60 min sob agitação) e uso de agente bactericida, solução 0,5% de hipoclorito de sódio, por 30 min sob agitação. Os explantes viáveis foram inoculados em meio

semi-sólido meio de composição salina e orgânica de Murashige & Skoog¹⁵ suplementado com 30g/L de sacarose e combinações de fitoreguladores auxinas / citocininas (2,5 mg/L de ANA / 1,0mg/L de BAP e 1,0mg/L de 2,4-D/1,0mg/L de KIN). O período de indução dos calos foi de 30 dias e o cultivo realizado a 27±2°C e fotoperíodo de 16hs dia, sob 2000±200 lux, gerados por lâmpadas do tipo luz do dia - GE 12W. A biomassa fresca de calos foi seca em estufa à 50°C e extraída segundo o mesmo protocolo utilizado para o material vegetal da planta *in natura*.

As análises em CLAE foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LC10AD-VP, equipado com detector SDP-M10A-VP e coluna SupelcoTM RP-18, (25 cm x 4,6mm, 5µm), utilizando como fase móvel: MeOH:H₂O em um gradiente linear iniciando em 0% a 65% de MeOH em 30min., à fase móvel foi adicionado ácido acético (0,1%). O volume de injeção foi de 30µl, fluxo de 1ml/min. e detecção a 280nm.

As condições de análise em CG foram: coluna capilar de sílica fundida HP-50 (50% de fenilmetilsilicone), com diâmetro interno de 30 x 0,25 µm, espessura do filme de 0,25 µm, gás de arraste H₂ (42cm/seg a 280°C), temperatura de injeção 260°C, detecção por ionização de chama à temperatura de 300°C, temperatura inicial da coleta 270°C (20min.) até 280°C (20min.) a 2°C/min.

Referências Bibliográficas

- 1 Cronquist, A. *The evolution and classification of flowering plants*. Boston: Ed. Houghton Mifflin CoP 1968; 177-180
- 2 Townsend, C.C. *Amaranthaceae*. In: Launert, E.; Lucas, G.L.I.; Gonçalves, M.L. *Flora Zambisica*. Londres, 1988; 9:1
- 3 Nishimoto, N.; Nakai, S.; Takagi, N.; Hayashi, S.; Takemoto, T.; Odashima, S.; Kizu, H.; Wado, Y. Pfaffosides and nortriterpenoids saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry*, v.23, p.139-142, 1984.
- 4 Vieira, C.C.J.; Mercier, H.; Chu, E.P.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. XVII Gomphrena Species (Globe Amaranth): In vitro culture and production of secondary metabolites. In: *Biotechnology in Agriculture and Forest*. Berlin: Springer-Verlag, 1994; 28: 257-269, Ed. BAJAJ, Y.P.S., ?
- 5 Nakai, S.; Takagi, N.; Miichi, H.; Hayashi, S.; Nishimoto, N.; Takemoto, T.; Kizu, H. Pfaffosides 2: Pfaffosides, nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry*, v.23, n.8, p.1703-1705, 1984.
- 6 Zavala, M.A.; Perez, S.; Perez, C. Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. *Journal of*

- Ethnopharmacology*, v.61, n.1, p.41-47, 1998.
- ⁷Zhou, B.N.; Blasko, G.; Cordell, G.A. Alternanthin, a C-glycosylated flavonoid from *Alternanthera philoxeroides*. *Phytochemistry*, v.27, n.11, p.3633-3636, 1988.
- ⁸Meyer, A.V. Avaliação da atividade anti-neoplásica dos extratos vegetais de *Peschiera fuchsiaeifolia*, *Gomphrena globosa* e *Alternanthera brasiliana* sobre linhagens tumorais humanas. *Monografia*. FCFRP, Ribeirão Preto, SP, p.27.
- ⁹Ito, E; Crozier, A; Ashihara, H. Theophylline metabolism in higher plants. *Biochim Biophys Acta*, v.1336, n.2, p.323-330, 1997.
- ¹⁰Yabuki N, Ashihara H. Catabolism of adenine nucleotides in suspension-cultured plant cells. *Biochim Biophys Acta*, v.1073, n.3, p.474-480, 1991.
- ¹¹Stebbins, N.E., Polacco, J.C. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiol.*, v.109, n.1, p.169-175, 1995.
- ¹²Yamamoto, H., Ieda, K., Tsuchiya, S., Yan, K., Tanaka, T., Inuma, M., Mizuno, M. Flavonol glycoside production in callus cultures of *Epimedium diphyllum*. *Phytochemistry*, v.31, n.3, p.837-840, 1992.
- ¹³Liu, J.J., Guo, Y., Zheng, S.P., Zhang, M.H. Research on the selecting suspension cell line of higher productivity of flavonol glycoside by hypoxia stress as well as the stability in subcultures. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, v.17, n.1, p.94-97, 2001.
- ¹⁴Berhow, M.A., Bennett, R.D., Poling, S.M., Vannier, S., Hidaka, T., Omura, M. Acylated flavonoids in callus cultures of *Citrus aurantifolia*. *Phytochemistry*, v.36, n.5, p.1225-1227, 1994.
- ¹⁵Murashige, T.; Skoog, F.A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

*Autora para correspondência

Profa. Dra. Suzelei C. França
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP
Centro de Ciências Exatas Naturais e Tecnológicas,
Unidade de Biotecnologia
Av. Costábile Romano, 2201 - Ribeirânia
14096-380 - Ribeirão Preto - São Paulo
Telefone: 16 6036706
E-mail: sfranca@unaerp.br

Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae)

Lopes, G.C.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Mello, J.C.P.*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Resumo

Duas flavan-3-óis e uma proantocianidina foram isoladas das cascas de caules de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., a qual é tradicionalmente utilizada no Brasil em várias patologias. As estruturas foram determinadas com base nos dados espectroscópicos incluindo 1-D (¹H, ¹³C), 2-D NMR (¹H/¹H COSY) e MS. As atividades antibacterianas dos extratos acetona:água e semipurificados das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. foram também avaliadas. Ambos os extratos bruto e semipurificado mostraram atividade sobre *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Controle de qualidade foi determinado usando-se vários ensaios farmacopêicos.

Abstract

Two flavan-3-ols and one proanthocyanidins have been isolated from the stem bark of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., which is traditionally used in Brazil against various diseases. The structure was determined on the basis of spectroscopic data including 1-D (¹H, ¹³C) and 2-D NMR (¹H/¹H COSY) and MS. The antibacterial activities of an acetone:water and semipurified extracts from the stem bark of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. were evaluated. Both the crude and semipurified extracts showed activity against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Quality control was determined using several pharmacopoeial assay.

Muitos dos trabalhos com plantas medicinais são desenvolvidos em função de informações terapêuticas obtidas à partir da medicina popular, porém estudos multidisciplinares, envolvendo o conhecimento químico,