

Análise química da cultura de tecidos do híbrido *Clusia paralicola* X *Clusia weddelliana*

Cláudio Augusto Gomes da Camara¹; Simone Liliane Kiszczarff Shepherd²; Dulce Regina Garcia Joaquim³

¹ Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970, Campinas, SP

³ Departamento de Fisiologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brasil claucamara@uol.com.br

Resumo

A cultura de calos de *C. paralicola* X *C. weddelliana* a partir de folhas jovens foi estabelecida por meio da combinação dos fitorreguladores ácido indol acético (AIA) e 6-furfurilaminopurina (KIN). Monitoramento químico por CG/EM revelou que os metabólitos biossintetizados são excretados para o meio de cultura e são constituídos principalmente de ésteres metílicos, hidrocarbonetos de cadeia longa, triterpenos e compostos fenólicos. Os ácidos olean-12-en-3-oxo-28-óico, olean-3-oxo-28-óico e cítrico, metabólicos secundários isolados a partir do látex do fruto de *C. grandiflora* e da casca do fruto de *C. nemorosa* respectivamente, também foram detectados.

O gênero neotropical *Clusia* (Guttiferae) compreende cerca de 250 espécies, distribuídas desde o sudoeste da Flórida até o sudoeste brasileiro¹. O uso de plantas deste gênero, no tratamento de hipertensão arterial é bastante comum na medicina popular da Costa Rica². Análise química das resinas tem revelado, que são basicamente constituídas de benzofenonas poliisopreniladas³ e estudo de atividades biológicas, dessa classe de compostos, indicaram atividade antimicrobiana e anti-HIV⁴. O fato de estas benzofenonas serem encontradas, quase que exclusivamente, nas resinas e nos frutos restringindo sua disponibilidade e uso na medicina popular, em qualquer época do ano, estimulou estudos da cultura de tecidos de espécies de *Clusia* visando uma fonte contínua destes metabólitos. Balansard e Pellissier constataram que os metabólitos presentes no látex de *Clusia rosea* inibiam a ação de fitorreguladores empregados no cultivo in vitro⁵. Diante destas dificuldades, bastante comum em plantas laticíferas, o nosso trabalho foi realizado com o híbrido *C. paralicola* x *C. weddelliana*, que geralmente possuem menor quantidade de látex do que os

respectivos parentais.

De todas as combinações elaboradas em delineamento em blocos aleatórios entre auxinas/citocininas, no cultivo in vitro de explantes foliares de *C. paralicola* x *C. weddelliana*, a única que resultou em desdiferenciação, ou seja, formação de calo foi entre AIA e KIN e que os melhores resultados foram obtidos com 5,0 mg/l de AIA e 0,1 mg/l de KIN e 5,0 mg/l de AIA e 1,0 mg/l de KIN. Em geral, para este protocolo, o maior percentual de explantes oxidados foi encontrado naqueles cultivados em presença de luz e que a melhor interação entre os fitorreguladores, que parece minimizar a oxidação dos explantes, é aquela em que os intervalos das concentrações entre AIA/KIN são respectivamente, 5,0 - 10,0 mg/l e 0,1 - 1,0 mg/l.

A análise por CG/EM dos calos e meio de cultura revelou que nestas condições de cultivo, foram produzidos principalmente ácidos graxos saturados e insaturados normais e ramificados, álcoois de cadeia longa, hidrocarbonetos de cadeia longa, compostos fenólicos como catequina e derivados do ácido benzóico e triterpenos (Tabela 1). Os ácidos palmítico e esteárico, caracterizados no meio de cultura, são os mais abundantes e estão presentes em ambos os calos com diferentes idades. Já os ramificados (metil-tetra, penta e hexadecanóico) foram produzidos apenas no calo cultivado por mais tempo (8 meses). A produção de ácido cítrico, detectado em calos com 28 dias e com 8 meses, pode estar relacionado às condições de estresse (anaeróbica e na ausência de luz) em que os explantes foram cultivados. Há relatos na literatura^{6,7} de acúmulo de ácido cítrico, em resposta ao estresse, em plantas pertencentes ao Metabolismo Ácido de Crassuláceas (CAM), que estão adaptadas à ambientes com escassez de água, sendo observado para algumas espécies de *Clusia*. Outros metabólitos caracterizados em ambos os calos de diferentes idades, foram os ácidos olean-12-en-3-oxo-28-óico e olean-3-oxo-28-óico. Neste caso, os maiores percentuais relativos destes ácidos foram obtidos na análise do calo 1 e no respectivo meio de cultura. Já que os metabólitos produzidos no calo são eliminados para o meio de cultura, é possível que o menor percentual relativo dos triterpenos observado no calo com 8 meses de idade esteja relacionado à realização das subculturas, cujo meio de cultura foi desprezado.

O cultivo de explantes na ausência de luz foi imprescindível para formação de calo. O protocolo ora estabelecido para cultura de células do híbrido *Clusia paralicola* X *Clusia weddelliana* promoveu a produção dos ácidos olean-12-en-3-oxo-28-óico e olean-3-oxo-28-óico os quais estão presentes principalmente no látex dos frutos de *Clusia grandiflora* (Tabela 1).

TABELA 1. Composição percentual relativa dos constituintes químicos caracterizados por CG/EM nos calos e meios de cultura

Nº	SUBSTÂNCIA	IRt Exp	IRt Lit	CALO 1				CALO 2				
				MIH	M1A	C1H	C1M	M2H	M2A	C2H	C2M	
1	Acetil-Timol	1354	1355		3,09							
2	cis-Carvilacetato	1363	1362		4,65						7,96	
3	Citrato de metila	1461	-		5,05		4,96				1,44	
4	4-Hidroxibenzoato de metila	1475	-					4,16				
5	Dodecanoato de metila	1533	1525				3,53				1,55	
6	3,4-Dimetoxibenzoato de metila	1592	-				1,54					
7	Tetradecanoato de metila	1724	-				1,94	6,46	5,75	5,69	12,74	
8	Metil-tetradecanoato de metila	1794	-						1,87	1,54		
9	Pentadecanoato de metila	1823	-		1,82	2,10	2,39	4,50	5,54	2,21		
-	Ftalato	1858	-						15,38		4,36	
-	C ₁₃ H ₁₆ O ₃	1861	-		5,59			6,12		3,69		
10	Metil-pentadecanoato de metila	1890	-							0,86		
11	Hexadecenoato de metila	1897	-		9,97		3,16	9,01	12,57	5,34	3,10	
12	Nonadecano	1900	-				1,71					
13	Hexadecanoato de metila	1924	1927	45,56		17,36	9,43	36,99	18,33	20,78	25,42	
-	Ftalato	1957	-				3,20		7,24			
14	Metil-hexadecanoato de metila	1996	-						3,55			
15	Heptadecanoato de metila	2022	-				1,49			4,71		
-	Ftalato	2061	-				26,15	3,44				
16	Octadecanol	2080	2082							1,52		
17	Octadecadienoato de metila	2090	2092				3,99		5,11	7,96		
18	Octadecenoato de metila	2096	-		4,01	5,13	3,39	11,22			3,86	
19	Octadecanoato de metila	2126	2128	9,72	2,17	7,08	1,72	6,12	4,21	14,39	3,98	
20	Tetracosano	2396	2400							0,57		
-	Ftalato	2432	-		11,69							
21	2,4-bis(dimetilbenzil)fenol	2488	-							2,18		
-	Ftalato	2528	-	18,58		10,43	5,84	9,94	3,61	4,56	3,70	
22	Hexacosano	2596	2600			2,14				1,06		
23	Heptacosano	2696	2700							1,75		
24	Tetracosanoato de metila	2725	-				2,47		1,83	1,12	2,18	
25	Esqualeno	2808	-				5,09	5,44				
26	Tetrametil de catequina	2959	-					30,38	6,22	2,17		
27	Hexacosanoato de metila	3027	-							0,44		
28	Olean-12-en-3-oxo-28-ato de metila	3512	-	t	33,92			t	8,71	2,02	4,86	
29	Olean-3-oxo-28-ato de metila	3560	-	26,10	t	t	t		t	0,97		
	Não identificados			-	17,97	4,72	23,08	-	-	14,28	21,85	
	TOTAL				99,97	99,93	99,92	99,98	99,96	99,92	99,81	99,92

MIH e M1A = ext. hexânico e ext. acetato de etila do meio de cultura do calo 1, C1H, C2H e C1M, C2M = ext. hexânico e metanólico do calo 1 e 2. IRt Exp. = índice de retenção obtido aplicando a equação de van den Dool e Kratz⁹. IRt Lit. = índice de retenção da literatura¹⁰

Um fato observado, altamente relevante do ponto de vista biotecnológico, é que as substâncias produzidas pela cultura de tecidos de *C. parvicola* x *C. weddelliana* são excretadas para o meio de cultura, o que além de minimizar os custos, permite um processo contínuo de extração destes metabólitos.

Finalmente este trabalho exploratório, único deste

gênero desde a tentativa de cultivo *in vitro*, com folhas de *C. rosea*, por Balansard e col.⁵ permitiu estabelecer um protocolo para obtenção de calos a partir de explantes foliares de *C. parvicola* x *C. weddelliana*, cuja composição química se apresentou distinta das plantas de origem, porém com alguns triterpenos em comum.

Material e Métodos

O híbrido foi obtido através da polinização artificial (M.C.E. Amaral e V. Bittrich) a partir de clúsias cultivadas no Instituto Agrônomo de Campinas e mantidas em casa de vegetação do Departamento de Botânica da UNICAMP. Os explantes foram preparados a partir de folhas jovens de *C. paralicola* x *C. weddelliana*. As folhas foram coletadas em julho de 1998. Os extratos hexânico, metanólico do calo e acetato de etila dos respectivos meios de cultura foram obtidos a partir de diferentes idades, com 28 dias e com 8 meses de cultivo, denominados respectivamente de calo 1 e calo 2.

O cultivo *in vitro* do híbrido *C. paralicola* x *C. eddelliana* utilizou folhas apicais, em fase final de expansão a partir de pré-tratamento com fungicida benomil (solução 10% por 40 min) e esterilização superficial com hipoclorito de sódio (solução 1,5% acrescida de uma gota de tween 20 por 20 min). Os explantes não oxidados e viáveis foram colocados no meio de composição salina e orgânica de Murashige & Skoog⁸ com as seguintes combinações de fitoreguladores: AIA (0; 2,5; 5; 10; 25), 2,4-D (0; 0.1; 1; 1.5), BA (0; 0.1; 1; 5) e KIN (0; 0.1; 1). Foram feitas várias combinações de auxina/citocinina com delineamento de blocos ao acaso. O cultivo foi realizado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ na presença e ausência de luz. Os calos obtidos com idades diferentes foram macerados a temperatura ambiente inicialmente com hexano seguido por metanol. O meio de cultura foi partionado com hexano seguido por acetato de etila. Cada extrato foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida. O extrato metanólico e o acetato de etila foram previamente derivatizados com uma solução etérea saturada de diazometano. Os extratos foram analisados por um cromatógrafo Hewlett Packard 5890B SERIES II, acoplado a um espectrômetro de massas HP 5970, equipado com coluna capilar de sílica fundida J e W Scientific DB-5 ou HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm). As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente de 290°C e 285°C . O gás de arraste foi Hélio e o programa de temperatura do forno foi de 40°C até 290°C à $4^\circ\text{C}/\text{min}$. Os espectros de massas foram obtidos à 70eV, 0,84 scan/sec de m/z 40 a 550 e os compostos foram identificados baseados nos índices de retenção⁹ e comparação dos espectros de massas do banco de dados (270.000 espectros) Wiley/NBS e com os da literatura¹⁰.

Referências

- ¹ Bittrich, V, Amaral MCE. Floral biology of some *Clusia* species from Central Amazonia. Kew Bulletin 1997; 53: 617-35
- ² Gonzáles, MG. & Matamoros, OM. Efectos cardiovasculares del extrato acuoso de las hojas de *Clusia conclensis* (Guttiferae). Revista de Biología Tropical 1996; 44: (1), 87-91
- ³ Oliveira, CMA, Porto, AM, Bittrich, V, Vencato, I, Marsaioli, AJ. Floral resins of *Clusia* spp: chemical composition and biological function., Tetrahedron Letters 1996; 37: (36), 6427-30
- ⁴ Gustafson, KR, Blunt, JW, Munro, MHG, Fuller, RW, Mckee, TC, Cardellina, JH, MacMhon, JB, Cragg, GM, Boyd, MR. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifloria* and *Clusia rosea*. Tetrahedron 1992; 48: (46), 10093-10102
- ⁵ Balansard, J, Pellissier, F. Le bouturage foliare et l'action inhibitrice des produits de secretion naturelle des plantes. Compt. Rend. Soc. Biol 1942; 136: 307-8
- ⁶ Franco AC, Olivares E, Ball E, Luttge U, Haagkerwer A. *In-situ* studies of cassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of the genus *Clusia*. New Phytologist 1994; 126: (2) 203-11
- ⁷ Franco, AC, Ball, E, Luttge, U. Differential-effects of drought and light levels on accumulation of citric and malic acids dring CAM in *Clusia*. . Plant Cell and Environment 1992; 15: (7), 821-29
- ⁸ Murashige, T, Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 1962; 15: (3) 473-97
- ⁹ Van den Dool, H, Kratz, PD. A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal of Chromatography 1963; 11: (4) 463-72
- ¹⁰ Adams, R.P. Identification of essential oil by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co, Illinois. 1995