



ISABELLA MARQUES DE CARVALHO

**TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DE EXSUDATOS PRESENTES NO
MEIO LÍQUIDO DE CULTURA DE RAÍZES DE *Hyptis*
suaveolens CULTIVADAS COM AIB E ANA**

LAVRAS – MG

2019

ISABELLA MARQUES DE CARVALHO

**TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
EXSUDATOS PRESENTES NO MEIO LÍQUIDO DE CULTURA DE RAÍZES
DE *Hyptis suaveolens* CULTIVADAS COM AIB E ANA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Química, para a obtenção do título de Licenciado.

Professora Dra Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Professor Dr José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Coorientador

LAVRAS – MG

2019

ISABELLA MARQUES DE CARVALHO

**TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
EXSUDATOS PRESENTES NO MEIO LÍQUIDO DE CULTURA DE RAÍZES
DE *Hyptis suaveolens* CULTIVADAS COM AIB E ANA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Química, para a obtenção do título de Licenciado.

APROVADA em 04/07/2019

Dr. Alexandre Alves de Carvalho, UFLA
Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, UFLA
Ms Sâmia Torres Silva, UFLA
Dra Suzan Kelly Vilela Bertolucci, UFLA

Professor Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Professor Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Coorientador

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser minha fortaleza e por preparar cada detalhe da minha vida com tamanha perfeição.

Aos meus pais pelo amor incondicional, apoio, incentivo, paciência e firmeza em minha educação.

À minha irmã Juliana, por ser meu exemplo e por me ajudar em diversas situações da vida. Ao meu irmão Gabriel, por sempre me aconselhar e acreditar no meu potencial para realizar meus sonhos. Ao meu cunhado Endrigo, pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos amigos que fiz na UFLA, em especial minha amiga Camila por ter sido minha companheira de estudos nas disciplinas difíceis e por sempre ter estado presente em todos os momentos da graduação.

À professora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci pela confiança, carinho, paciência e pelos ensinamentos não só acadêmicos, mas também ensinamentos de vida.

À Doutoranda Sâmia Torres por todos os ensinamentos durante os últimos meses, pela sua disponibilidade, amizade e por se fazer presente durante o experimento mesmo estando em um momento especial em sua vida.

Aos amigos do Laboratório de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares que alegraram meus dias e sempre estiveram dispostos a me ensinar e ajudar durante todo o experimento.

À Universidade Federal de Lavras, por proporcionar esta estrutura magnífica e por contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

À CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica que tanto acrescentou em minha vida profissional.

E a todos aqueles que se fizeram presentes e sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Hyptis suaveolens (L.) Poit (Lamiaceae) conhecida no Brasil como alfavaca-brava, bamburral ou alfavaca-brava é uma planta medicinal nativa das Américas, sendo amplamente utilizada no nordeste brasileiro. Pesquisas identificaram compostos com aplicações medicinais na raiz desta espécie. A cultura de raízes *in vitro* pode proporcionar a obtenção de metabólitos secundários com menor custo que os processos de extração usuais. As raízes exsudam substâncias que formam uma mistura mais simples que as obtidas por extração, reduzindo as etapas para o isolamento de compostos. Assim, o presente estudo tem como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides e avaliar o potencial antioxidante dos exsudatos de cultura de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* com diferentes doses de AIB e ANA, combinadas ou isoladas. Raízes frescas de plântulas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* foram inoculadas em erlenmeyers contendo meio de cultura líquido MS e mantidas sob agitação constante, por 45 dias, nos seguintes tratamentos: 1) Controle: meio líquido sem regulador, 2) 0,5 mg/L de AIB+ 0,5 mg/L de ANA; 3) 0,5 mg/L de AIB+ 1 mg/L de ANA; 4) 1 mg/L de AIB + 0,5 mg/L ANA; 5) 0,5 mg/L de AIB; 6) 1 mg/L de AIB; 7) 0,5 mg/L ANA; 8) 1 mg/L de ANA. Os resultados obtidos indicaram que o tratamento que empregou 0,5 mg/L de AIB exsudou maior conteúdo de compostos fenólicos para o meio de cultura. Já o tratamento que combinou os reguladores AIB e ANA, cujas concentrações eram respectivamente 1 mg/L e 0,5 mg/L, exsudou maior quantidade de flavonoides totais. A CAT foi consideravelmente maior nos exsudatos dos tratamentos com combinação de reguladores, em que AIB estava com concentração 0,5 mg/L, e os exsudatos que continham em sua composição o regulador AIB isolado, apresentaram maior capacidade de reduzir os íons de Fe⁺³. Nenhuma amostra apresentou atividade de captura de radicais livres, pois mesmo sem qualquer diluição, a porcentagem de inibição foi inferior a 50%. Dessa forma, pode-se concluir que as concentrações de AIB e ANA analisadas influenciam o teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e conferem respostas antioxidantes diferenciadas conforme a dose e combinação ou não de reguladores.

Palavras chave: Bamburral. Auxinas. Atividades antioxidantes.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	7
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1.	A espécie <i>Hyptis suaveolens</i>	7
2.2.	Características Agronômicas de <i>Hyptis suaveolens</i>	9
2.3.	Usos medicinais de <i>H.suaveolens</i>	9
2.4.	Composição química de <i>Hyptis suaveolens</i>	10
2.5.	A produção de metabólitos secundários no cultivo <i>in vitro</i> de plantas	11
2.6.	Fenóis Totais: Mecanismo de Reação	11
2.7.	Flavonoides: Mecanismos de reação	12
2.8.	Testes de atividade antioxidante: mecanismos e aplicações	13
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1.	Estabelecimento <i>in vitro</i> da espécie.....	14
3.2.	Cultura de raízes de <i>H. suaveolens</i> em meio líquido com AIB e ANA.....	15
3.3.	Preparo das amostras	16
3.4.	Análise estatística	17
3.5.	Composição fenólica, teor de flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos	17
3.5.1.	Teor de fenóis.....	17
3.5.2.	Teor de flavonoides	17
3.5.3.	Teste de capacidade antioxidante total	18
3.5.4.	Atividade de captura de radicais livres (DPPH).....	18
3.5.5.	Poder Redutor.....	19
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, pertence à família Lamiaceae. É conhecida popularmente no Brasil como alfazema-brava, bamburral ou alfacava, podendo ser encontrada em todo território brasileiro, pois se reproduz espontaneamente em solos agrícolas, beira de estradas e terrenos baldios. Possui diversas propriedades medicinais, podendo ser citadas o alívio de cólicas menstruais, febre e problemas respiratórios em geral. Destacam-se a atividade gastroprotetora e efeitos neutroprotetores. Em sua composição, são encontrados diversos metabólitos secundários como compostos fenólicos, flavonoides, lignanas e glicídeos.

Das partes aéreas de *Hyptis suaveolens* foram isolados os flavonoides quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo, apigenina, quercetina, canferol, genkwanina, ácido rosmarínico e metilmarmarinato. Já das raízes foi possível isolar lignanas como a podofilotoxina e picropodofilotoxina (TANG et al, 2018). No processo de extração vegetal usual, as células devem ser rompidas para extrair e purificar o produto desejado, aumentando a complexidade do processo e o custo. Exsudatos obtidos de cultura de raízes *in vitro* são misturas simples em comparação aos tecidos vegetais, permitindo a redução do custo de produção de metabólitos secundários. Além disso, uma vantagem da exsudação é a continuidade.

O presente estudo objetivou determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e avaliar o potencial antioxidante dos exsudatos de cultura de raízes em meio líquido de *Hyptis suaveolens* com diferentes doses de AIB e ANA, combinadas ou isoladas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A espécie *Hyptis suaveolens*.

A família Lamiaceae pertencente a ordem Tubiflorae Lamiales, que apresenta aproximadamente 250 gêneros e 6970 espécies. Suas plantas têm origem em regiões que possuem clima tropical e subtropical ocorrendo principalmente em savanas abertas e regiões montanhosas (BASÍLIO et al, 2006). As Lamiaceae são plantas que variam entre ervas, arbustos ou árvores, possuem caules geralmente encontrados na forma tetragonal, as folhas, na maioria das vezes, são opostas espiraladas, simples e não possuem estípulas.

As flores são bissexuais, com cinco sépalas e cinco pétalas ambas em formato de cone e o endosperma é escasso ou ausente (JUDD et al., 1999).

Lamiaceae apresenta um número elevado de gêneros e espécies, assim, contém uma enorme variedade de moléculas em sua composição, possuindo representantes da via do ácido acético, ácido chiquímico e biossíntese mista. Por este motivo também apresenta elevada importância econômica, pois muitas de suas espécies são utilizadas como condimentares (FALCÃO; MENEZES, 2003).

O gênero *Hyptis* é composto por cerca de 280 espécies, podendo ser de ervas anuais ou perenes até pequenas árvores. São comumente usadas para fins alimentícios e para a obtenção de óleos. Apresenta espécies como *H. fasciculata bentham ssp. fasciculata*, *H. tetracephala bordignon nov.sp.*, *H. heterodon epling*, *H. elegans briquete ex micheli*, *H. mutabilis*, *H. atrorubens*, *H. suaveolens*, *H. capitata*, *H. verticillata*, *H. spicigera*, *H. pectinata*, *H. mutabilis*, *H. albida*. Sendo *H. suaveolens* a espécie mais estudada (LIMA, 2013; FALCÃO; MENEZES, 2003.).

Hyptis suaveolens é um subarbusto anual, ereto, ramificado, podendo chegar até 1,50 m de altura, com caules e ramos quadrangulares. Suas folhas são características de sua família e gênero, ou seja, são opostas, glandular-pubescentes, de 4 a 8 cm. Suas flores são sub-sésseis, protegidas por brácteas foliáceas, de cor azul-rosada reunidas em pequenos grupos nas axilas foliares (Figura 1).

Figura 1: *Hyptis suaveolens* cultivada na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA.



Fonte: Da autora

2.2. Características Agronômicas de *Hyptis suaveolens*

Hyptis suaveolens é uma planta que pode ser encontrada em todo território brasileiro e ocorre de modo espontâneo em solos agrícolas, beira de estradas e terrenos baldios (LORENZI; MATOS, 2008). A propagação natural dessa espécie se dá por sementes, limitando a produção comercial de mudas por via sexual devido à dormência das sementes (MAIA et al, 2008).

O método de propagação vegetativa mais utilizado para plantas da espécie *Hyptis suaveolens* é a estaquia (PEREIRA et al, 2012). Consiste na retirada de segmentos caulinares da planta-mãe que em condições adequadas de luz e temperatura, emitem raízes, formando uma planta idêntica àquela de origem. A auxina mais utilizada nesse tipo de metodologia é o ácido indolbutírico (AIB), este auxilia no estímulo à emissão de raízes e influencia na qualidade da planta formada. Outro fator importante que influencia na taxa de enraizamento e na sobrevivência da planta é o tipo de estaca que será utilizado. Para a propagação de *H. suaveolens* podem ser utilizadas estacas do tipo apical, mediana ou basal com tamanho entre 10-20 cm e três gemas (PEREIRA et al, 2017).

No cultivo de plantas medicinais é de suma importância dar preferência à utilização de adubos orgânicos ao invés de fertilizantes químicos, visando preservar os princípios ativos da planta. Estudos apontam que plantas da espécie *Hyptis suaveolens* apresentaram maior diâmetro de caules, ramos, biomassa de folhas e raízes secas com a incorporação de esterco de aves ao solo, devido à maior disponibilidade e teor de nutrientes à cultura, visto que é rico em nitrogênio, fósforo e outros nutrientes (MAIA,2008).

2.3. Usos medicinais de *Hyptis suaveolens*

O uso da espécie *Hyptis suaveolens* para fins medicinais não ocorre somente no Brasil, mas também em países como México, Índia, China, Equador, Panamá entre outros. Pesquisas apontam que o extrato hexânico dessa espécie apresenta atividade gastropotetora devido a presença do composto suaveolol, que pôde ser considerado um agente gastropotetor ativo após obter sucesso em estudos com roedores em diferentes níveis de úlcera gástrica (JESUS et al, 2013; ARZAVE, 2012).

Estudos também apontam que a alta atividade antioxidante do extrato metanólico de *Hyptis suaveolens* tem efeitos neuroprotetores (GHAFARI, 2014). Além de sanar problemas digestivos, a infusão das flores é indicada para o alívio de cólicas menstruais, gripes, febres e problemas respiratórios em geral (BASÍLIO, 2006).

A atividade antioxidante do extrato metanólico além de contribuir para efeitos neuroprotetores, estimulou a proteção hepática apresentando potencial para proteger o fígado contra danos oxidativos provocados pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) e pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (GHAFARI et al., 2012).

A espécie apresenta também outras atividades como: anti-hiperglicêmica, antitumorais, antibacteriana, anti-fúngica e anti-HIV (FALCÃO; MENEZES, 2003). Recentemente, foi descoberto que *Hyptis suaveolens* apresenta podofilotoxina em suas raízes, uma substância com uso terapêutico limitado devido a sua alta toxicidade, mas cujos derivados semi-sintéticos são aplicados contra o câncer e outras doenças (SCHMITT et al, 2002; LAUTIÉ et al., 2008).

2.4. Composição química de *Hyptis suaveolens*

A espécie *Hyptis suaveolens* é uma das mais estudadas dentre as demais espécies que este gênero apresenta, em sua estrutura são encontrados diversos compostos que conferem a planta propriedades medicinais. Estudos comprovam que em sua mucilagem são encontrados glicídeos como D-fucose, D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose e ácido 4 -O-metil-D-glicurônico.

Em suas folhas, caules, frutos e sementes há presença de aminoácidos como a treonina, valina, arginina, serina, metionina, alanina, glutamina, leucina, isoleucina, glicina, triptofano, lisina e prolina, garantindo assim uma atividade proteica e podendo ser utilizada na alimentação a fim de obter a quantidade necessária de aminoácidos essenciais (AGUIRRE et al., 2012).

Plantas que pertencem à família Lamiaceae apresentam em sua composição triterpenos responsáveis pelas atividades citotóxicas e anti-HIV. Na espécie *Hyptis suaveolens* são encontrados os seguintes triterpenos: ácido urs-12-en-3β-ol-29-óico; ácido ursólico; ácido betulínico; ácido 3β-hidroxilup-12-en-27-óico; ácido 3β-hidroxilup-12-en-28-óico; ácido hyptadiênico; ácido suaveólico; ácido suaveolol; ácido oleanólico; friedelina; lupeol; acetato de lupeol; α-amirina e β-amirina (FALCÃO; MENEZES, 2003).

Das partes aéreas de *Hyptis suaveolens* foram isolados compostos classificados como flavonoides, entre eles estão a quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo, apigenina, quercetina, canferol, genkwanina, ácido rosmarínico e metilmarmarinato. Já das raízes foi possível isolar lignanas como a podofilotoxina e picropodofilotoxina (TANG et al, 2018).

2.5. A produção de metabólitos secundários no cultivo *in vitro* de plantas

Os metabólitos secundários são responsáveis por melhorar a sobrevivência da espécie e apresentam papéis importantes na adaptação das plantas aos seus ambientes. Eles conferem às plantas propriedades medicinais e atividades biológicas como antibióticas, antifúngicas e antivirais (FUMAGALI, 2008). Podem ser classificados em três classes principais: compostos fenólicos, terpênicos e alcalóides. Essas classes são responsáveis por características visuais como a coloração, características sensoriais, como o sabor e o aroma e proteção contra predadores e raios ultravioleta (CROTEAU et al, 2000).

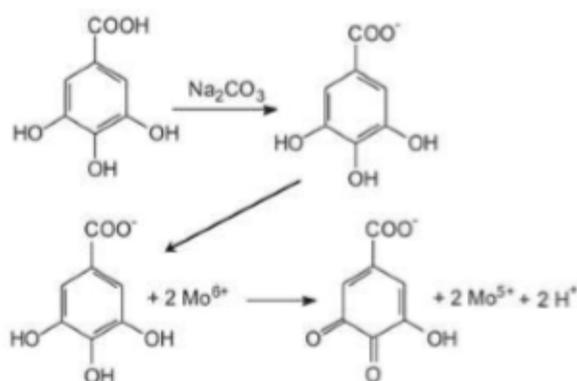
A produção de metabólitos secundários vem sendo realizada por cultivo de plantas medicinais, contudo algumas espécies apresentam dificuldades para se desenvolverem em ecossistemas diferentes dos habituais. Uma solução para este problema é a cultura de células, tecidos e órgãos *in vitro*. É importante ressaltar que as plantas com essas características são coletadas de forma predatória e indiscriminada, assim a cultura desses metabólitos *in vitro* possui vantagens econômicas e ecológicas (FUMAGLI,2008).

Na cultura de células *in vitro*, as plantas são expostas a condições adequadas para seu desenvolvimento e não há interferências de microorganismos. Desta forma, podem ser produzidas plantas com o ciclo vegetativo reduzido e grandes quantidades de metabólitos secundários em um curto período de tempo. Essa alteração no ciclo vegetativo é de extrema importância, pois existem plantas que acumulam metabólitos somente em determinadas estações do ano (SANTOS et al., 2007).

2.6. Fenóis Totais: Mecanismo de Reação

A quantificação de fenóis totais é realizada por um ensaio colorimétrico que faz o uso do reagente Folin-Ciocalteu que apresenta uma coloração amarelada, em sua composição estão presentes o ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e o ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Ao reagir com substâncias redutoras em pH alcalino são formados óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}), fazendo com que a coloração mude de amarela para azul. A mudança de coloração acontece pelo fato de compostos fenólicos dissociarem um próton e formarem o ânion fenolato, responsável pela redução do Folin-Ciocalteu (PIRES et al, 2017). A Figura 2 está ilustrando o modo como acontecem as interações reacionais entre o Ácido Gálico e o complexo de molibdênio, na presença de carbonato de sódio (Na_2CO_3).

Figura 2: Reação entre Ácido Gálico e o complexo fosfomolibdico



Fonte: Pires et al, 2017

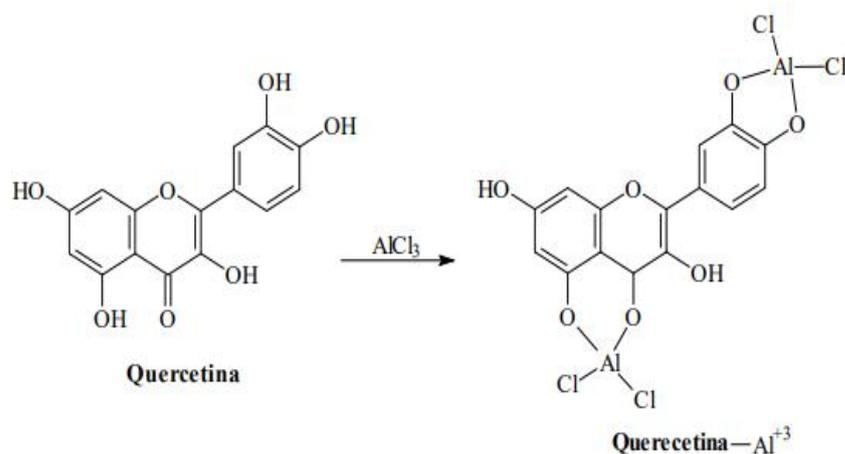
A Figura 2 mostra que ao ser adicionado o carbonato de sódio no meio reacional, o ácido gálico dissocia um próton possibilitando a formação do ânion fenolato. Este ânion ao reagir com o complexo fosfomolibdico provoca a redução do mesmo, mudando a cor da solução para azul.

2.7. Flavonoides: Mecanismos de reação

Assim como no ensaio de fenóis totais, a técnica utilizada para quantificar o teor de flavonoides consiste em uma técnica colorimétrica. Ao reagir com os flavonoides presentes nas amostras, o cátion alumínio que compõe o cloreto de alumínio é complexado, formando um complexo estável (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2010). A formação deste complexo atribui a solução uma coloração amarelada, em que a intensidade é proporcional à concentração de flavonoide na amostra.

Na Figura 3, está exemplificado o mecanismo da reação que acontece quando a quercetina (flavonoide) entra em contato com o cloreto de alumínio.

Figura 3: Formação do complexo Flavonoide – Al³⁺



Fonte: Peixoto Sobrinho et al (2010)

2.8. Testes de atividade antioxidante: mecanismos e aplicações

A determinação da capacidade antioxidante total está baseada na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V). A solução de molibdato de amônio em contato com substâncias que apresentam capacidade antioxidante forma um complexo de coloração azul entre fosfato/molibdênio (V). Este método apresenta a vantagem de identificar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto hidrofílicos (PRIETO et al,1999).

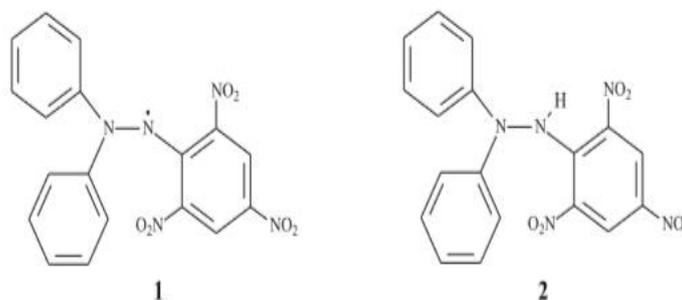
O ensaio para determinar o poder redutor nas amostras, fundamenta-se no princípio de redução dos íons férricos (Fe⁺³) em um pH ácido para sua forma ferrosa (Fe⁺²) (LOIZZO et al, 2012). A solução de ferrocianeto preparada juntamente com o ácido tricloroacético e o cloreto férrico é reduzida, ocasionando a mudança de coloração para azul. A mudança de cor indica que nas amostras estão presentes compostos antioxidantes que são capazes de provocar a redução do ferro e formar um complexo ferroso estável em solução (RUFINO et al, 2006).

Já a atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) baseia-se na deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula de DPPH (ALVES et al, 2010). Este ensaio foi descoberto em 1922 por Goldschmidt e Renn, tendo muitas aplicações em pesquisas envolvendo radicais livres, contudo é aplicado principalmente como reagente colorimétrico para verificar a ação antioxidante de diversos tipos de amostras.

O mecanismo de reação pode ser explicado pela capacidade que a amostra em estudo tem de sequestrar o radical DPPH reduzindo-o a hidrazina, ou seja, ao ser adicionada uma solução metanólica de DPPH em uma substância capaz de doar átomos de hidrogênio é produzida a hidrazina que provoca a mudança na coloração de roxo para amarelo pálido.

Na Figura 4, podem ser observadas as moléculas de DPPH antes e após sofrerem a redução.

Figura 4: Molécula de DPPH em sua forma radicalar e não radicalar



Legenda: 1: Molécula de DPPH na sua forma radicalar; 2: Molécula de DPPH na forma não radicalar.

Fonte: (ALVES et al, 2010)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estabelecimento *in vitro* da espécie

Para o estabelecimento *in vitro* da espécie, utilizou-se sementes como explantes. Estas foram coletadas de plantas de *Hyptis suaveolens* cultivadas em canteiros no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Exsiccatas foram depositadas no Herbário ESAL (Herbário do departamento de biologia da UFLA, Lavras-MG, Brasil) sob o registro 20475, e também no Herbário SPF (Herbário da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil), sob o nome de coleta H.B. Andrade 1 (SPF). Após a coleta, retirou-se com o uso de água e cal, a sua mucilagem. Posteriormente, as sementes foram envolvidas em tecido, devido ao seu tamanho reduzido, e mantidas em solução de hipoclorito de sódio a 50% (água destilada/hipoclorito), sob agitação constante, durante 20 minutos. Por fim, em câmara de fluxo laminar, foram lavadas cinco vezes com água destilada e autoclavada. O meio de cultura utilizado para inoculação foi o MS (MURASHING; SKOOG, 1962), preparado com metade da concentração original de sais, 30g/L de sacarose, 5,5 g/L de ágar e pH 5,7±0,1.

3.2. Cultura de raízes de *Hyptis suaveolens* em meio líquido com AIB e ANA

Plântulas cultivadas *in vitro* com 45 dias (dias após a emergência) foram as doadoras de raízes para a realização do experimento. Raízes frescas de *Hyptis suaveolens* foram pesadas (0,4 g) e, posteriormente, inoculadas em erlenmeyers (125 mL) que continham 40 mL de meio líquido MS (MURASHIG; SKOOG, 1962). Adicionou-se ao meio 30 g/L de sacarose e seu pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Foram preparados oito tratamentos e cada tratamento continha cinco repetições.

Na Tabela 1, estão descritos os tratamentos que foram realizados:

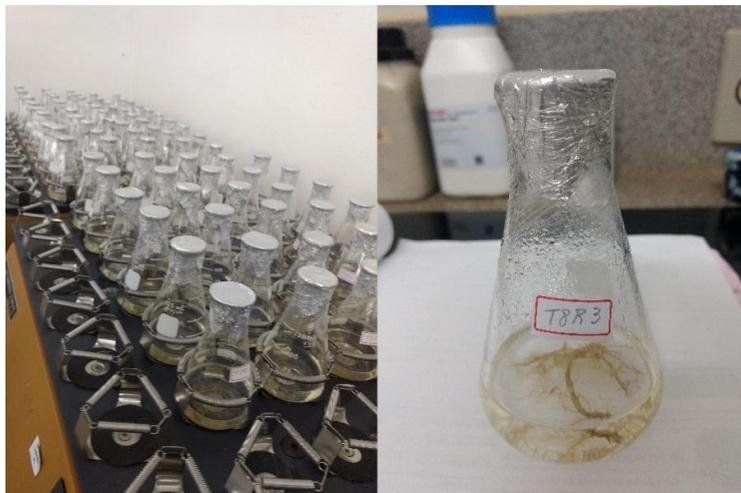
Tabela 1: Tratamentos empregados no cultivo *in vitro* de raízes de *Hyptis suaveolens*

Tratamentos	Composição
1	Controle: meio MS líquido sem regulador
2	0,5 mg/L de AIB + 0,5 mg/L de ANA
3	0,5 mg/L de AIB + 1 mg/L ANA
4	1 mg/L de AIB + 0,5 mg/L ANA
5	0,5 mg/L de AIB
6	1 mg/L de AIB
7	0,5 mg/L de ANA
8	1 mg/L de ANA

Fonte: Da autora

Os erlenmeyers contendo as raízes foram mantidos em *shaker* a 80 rpm, no escuro. O experimento foi avaliado aos 45 dias, em relação à composição fenólica, teor de flavonoides e atividade antioxidante. Na Figura 5, estão representados os frascos em *shaker*, contendo as raízes, e a aparência da raiz no dia da inoculação.

Figuras 5 :Frascos em *shaker* contendo as raízes e a aparência da raiz no dia da inoculação.

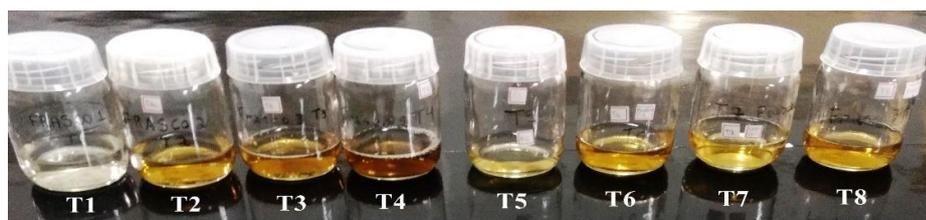


Fonte: Da autora

3.3. Preparo das amostras

Para a análise de teor de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante, o meio líquido obtido foi filtrado para que não houvesse resíduos de raízes que influenciassem nos resultados dos testes. Na Figura 6, estão apresentados os meios obtidos após a retirada das raízes que foram cultivadas.

Figura 6 – Meio de cultura após a filtração (Extratos obtidos de cada tratamento)



Legenda: T1: 0 AIB + 0 ANA; T2 = 0,5 AIB + 0,5 ANA; T3: 0,5 AIB+1 ANA; T4: 1 AIB 0,5 ANA; T5: 0,5 AIB + 0 ANA; T6: 1 AIB + 0 ANA; T7: 0 AIB + 0,5 ANA; T8: 0 AIB + 1 ANA. (mg/L)

Fonte: Da autora

De acordo com a Figura 6, os tratamentos se diferenciaram em suas colorações e pôde ser observado também que algumas repetições dentro de um mesmo tratamento apresentaram tonalidades diferentes do meio de cultura. Com a finalidade de tornar as amostras mais homogêneas, foi retirado um volume de 2 mL de cada repetição para

obtenção de uma amostra composta. Todas as análises foram realizadas a partir da amostra composta.

3.4. Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram feitos com os seguintes programas: ANOVA para obter as médias, Scott Knott a 5% para verificar se os resultados obtidos são estatisticamente iguais e PCA.

3.5. Composição fenólica, teor de flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos

3.5.1. Teor de fenóis

Para a análise de fenóis, a metodologia foi realizada de acordo com Kim et al (2003). Os reagentes necessários foram: Folin-Ciocalteu 10% e Carbonato de sódio 7%. Em uma microplaca foi adicionado 50 µL de amostra (meio líquido), 100 µL de Folin 10% e 125 µL Na₂CO₃. Após esta etapa foi preciso esperar 2 horas no escuro para que a reação acontecesse e realizou-se a leitura no comprimento de onda 760 nm. Um branco amostra foi preparado, no qual colocou-se 50 µL da amostra e 225 µL de água. Além do branco amostra, uma curva padrão de ácido gálico diluído em água foi construída em concentrações entre 0,125 mg/mL e 0,0020 mg/mL. A equação da reta utilizada para a quantificação de fenóis totais nas amostras foi $y = 13,10 x + 0.07962$, com o valor de $R^2=0,9994$, em que y corresponde a absorbância e x é a concentração. O teor de fenóis totais foi expresso em equivalente de ácido gálico (EAG)mg/ mL.

3.5.2. Teor de flavonoides

Este teste foi realizado de acordo com a metodologia de Ahn et al (2007) com modificação, ou seja, foi adicionado etanol 50% nas amostras. Essa mudança foi necessária, pois a quercetina não solubiliza completamente em água e como ela foi utilizada para construir a curva padrão, é fundamental que as amostras apresentem o mesmo tipo de solvente que a curva nas análises. Os reagentes necessários para este procedimento foram: Etanol 50% e Cloreto de alumínio (AlCl₃) 10% preparado com uma solução etanólica 70%. Em uma microplaca foi adicionado 50 µL de amostra, 50 µL de etanol 50% e 100 µL de AlCl₃ 10%. A microplaca foi mantida no escuro durante 1 hora para que a reação acontecesse por completo. A leitura foi realizada no comprimento de

onda 420 nm. Para este teste, a curva padrão foi construída com quercetina diluída em etanol 50% em concentrações entre 0,0625 mg/mL e 0,0010 mg/mL. Também foi preparado um branco, que consiste em 100 µL do solvente que se encontra a amostra e 100 µL de etanol 50%. A quantificação de flavonoides foi feita por meio da seguinte equação da reta: $y = 16,82 x + 0,03484$, com $R^2 = 0,9996$. O teor de flavonoides foi expresso em equivalente de quercetina (EQ) mg/mL de meio de cultura.

3.5.3. Teste de capacidade antioxidante total

O teste de capacidade antioxidante foi realizado de acordo com a metodologia de Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Os reagentes utilizados foram: Solução de ácido sulfúrico 0,6 M, Fosfato de sódio 28 mM e Molibdato de amônio 4 mM. Em um tubo de Falcon foi adicionado 200 µL da amostra, 500 µL da solução de ácido sulfúrico, 500 µL de fosfato de sódio e 500 µL de molibdato de amônio. Os tubos de falcon foram aquecidos por 90 minutos em uma temperatura de aproximadamente 90 °C. O mesmo procedimento foi realizado com o ácido ascórbico diluído em água em concentrações entre 1,156 mg/mL e 0,018 mg/mL. Foi aplicado na microplaca um volume correspondente a 100 µL e realizada a leitura com o comprimento de onda a 695 nm.

Com a finalidade de analisar os resultados obtidos, o teste também foi realizado com ácido gálico diluído em água e quercetina diluída com etanol 50 %, ambos iniciando na concentração 0,5 mg/mL até atingir a concentração 0,0002 mg/mL, seguindo o mesmo procedimento que foi feito com as amostras e com o ácido ascórbico. A equação da reta utilizada para determinar a capacidade antioxidante total foi: $y = 2,284 x + 0,07185$, com valor de $R^2 = 0,9997$. A capacidade antioxidante foi expressa em equivalente de ácido ascórbico (EAA)mg/mL de meio de cultura.

3.5.4. Atividade de captura de radicais livres (DPPH)

A atividade de captura de radicais livres DPPH (1,1-diphenil-1,2-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia de Scherer e Godoy (2009). As amostras foram diluídas até atingirem a proporção de 1/128. Após terem sido realizadas as diluições, foram adicionados 20 µL das amostras em microplacas juntamente com 280 µL da solução 0,2 mM de DPPH. As microplacas foram abrigadas no escuro durante 90 minutos. Após esse período foram realizadas leituras no espectrofotômetro com o comprimento de onda correspondente a 517 nm. O mesmo procedimento foi feito com o ácido gálico com

concentrações entre 1,0 mg/mL e 0,0005 mg/mL e com o BHT com concentrações entre 10 mg/mL e 0,005 mg/mL. Também foi realizado o controle negativo, que consiste na aplicação em microplaca de 20 µL do solvente utilizado (metanol) e 280 µL de solução 0,2 mM de DPPH.

A atividade da captura de radicais livres por DPPH foi expressa pela porcentagem de inibição, calculada pela fórmula:

$(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 * 100$, em que A_0 é a absorbância do controle negativo e A_1 a absorbância das amostras.

3.5.5. Poder Redutor

O grau de redução dos íons Ferro⁺² foi analisado segundo a metodologia de Loizzo et al. (2012). Os reagentes necessários para esse método são: ácido tricloroacético 10%, cloreto férrico 0,1%, ferrocianeto 1% e tampão fosfato pH 6,6. Em microtubos foram adicionados 25 µL de amostra, 100 µL do tampão fosfato e 100 µL de ferrocianeto. Essa solução foi levada ao vortex por alguns segundos e posteriormente aquecida a 50 °C por aproximadamente 20 minutos. Após o aquecimento foram adicionados aos microtubos 100 µL de ácido tricloroacético, 300 µL de água e 60 µL de cloreto férrico, essa solução foi agitada no vortex novamente e foram transferidos para uma microplaca um volume de 200 µL. O mesmo procedimento foi realizado com o ácido ascórbico nas concentrações entre 0,625 mg/mL e 0,010 mg/mL. A leitura foi realizada no espectrofotômetro em um comprimento de onda correspondente a 700 nm. A equação da reta utilizada para mensurar o poder redutor das amostras corresponde a: $y = 0,8192 x + 0,03554$ e tem R^2 equivalente a 0,9924. O poder redutor foi expresso em equivalente de ácido ascórbico (EAA)/mL de meio de cultura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, estão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de quantificação de fenóis totais, flavonoides (flavonas/flanóis) totais, capacidade antioxidante total (CAT) e poder redutor.

Tabela 2 – Médias referentes a quantificação de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante do meio líquido contendo raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas com diferentes doses de AIB e ANA, combinados ou isolados.

Tratamentos (mg/L)	Fenóis (mg EAG/mL)	Flavonoides (mg EQ/mL)	CAT (mg EAA/mL)	Poder redutor (mg EAG/mL)
Controle (sem regulador)	0,340 e	0,063 g	1,907 b	0,105 e
0,5 AIB + 0,5 ANA	1,140 c	0,127 c	2,038 a	0,248 b
0,5 AIB + 1,0 ANA	1,309 b	0,154 b	2,053 a	0,199 d
1,0 AIB + 0,5 ANA	1,100 c	0,187 a	1,876 b	0,237 c
0,5 AIB	1,438 a	0,114 d	1,409 c	0,283 a
1,0 AIB	1,236 b	0,129 c	1,918 b	0,271 a
0,5 ANA	1,092 c	0,093 e	1,945 b	0,237 c
1,0 ANA	1,002 d	0,084 f	1,879 b	0,211 d

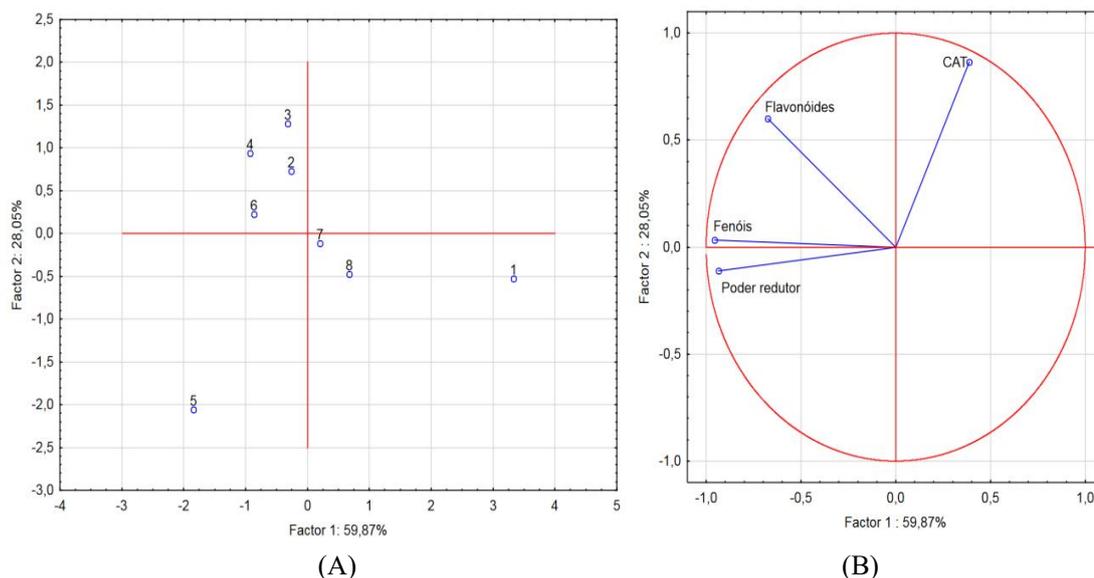
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente em cada ensaio realizado segundo o teste 5% Scott-Knott. Fenóis: Fenóis totais em mg equivalentes de ácido gálico/mL de meio líquido (mg EAG/mL); Flavonoides: Flavonoides totais em mg equivalentes de quercetina/mL de meio líquido (mg EQ/mL); CAT: Capacidade Antioxidante Total em mg equivalentes de ácido ascórbico/mL de meio líquido (mg EAA/mL); Poder Redutor: Redução dos íons ferro III em mg equivalentes de ácido ascórbico/mL de meio líquido (mg EAA/mL).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, os valores de fenóis e flavonoides totais, capacidade antioxidante e poder redutor se diferiram significativamente conforme o tratamento. Os tratamentos que apresentaram maiores teores de fenóis totais no meio líquido foram àqueles suplementados apenas com AIB, sendo a menor dose avaliada (0,5 mg/L) a que apresentou o teor máximo.

O teor de flavonoides totais foi maior no tratamento em que os reguladores de crescimento foram combinados na seguinte proporção: 1,0 mg/L AIB + 0,5 mg/L ANA. Os tratamentos que apresentaram maior capacidade antioxidante total foram àqueles que combinaram 0,5 mg/mL de AIB com 0,5 mg/mL ou 1,0 mg/mL de ANA.

O poder redutor foi mais efetivo nos tratamentos em que somente o regulador AIB estava presente no meio líquido, independente da concentração de 0,5 mg/L ou 1,0 mg/L.

Figura 7: Análise de componentes principais dos resultados de quantificação de fenóis e flavonoides totais e atividades antioxidantes (poder redutor e CAT) do meio líquido contendo raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas com diferentes doses de AIB e ANA, combinados ou isolados.



Legenda: (A) Gráfico de *scores*; (B) Gráfico de *loadings*.
Fonte: Da autora

A fim de avaliar a variabilidade entre as amostras foi feita uma análise de componentes principais. Nesse modelo as componentes principais explicaram cerca de 88% da variância dos dados originais. A Figura 7 mostra os gráficos das duas componentes principais, em que a Figura 7A é o gráfico de scores e permite a caracterização da tendência entre os tratamentos. A primeira componente (57,87%) é responsável pela variação entre os tratamentos, enquanto a segunda componente (28,05%) separa os tratamentos de acordo com os testes realizados.

Na Figura 7A de acordo com o Factor 1, o tratamento utilizado como controle (1), e os tratamentos que continham o regulador ANA isolado (8 e 7) apresentaram valores positivos, enquanto que os tratamentos em que os reguladores estavam combinados (2 ao 4) e os que continham o regulador AIB isolado (5 e 6) apresentam valores negativos. Pode-se destacar o tratamento controle com um comportamento diferenciado dos demais tratamentos, o que indica que a utilização de reguladores é um fato que exerce grande influência na exsudação de compostos fenólicos e flavonoides totais. O tratamento que empregou 0,5 mg/L de AIB também se mostrou bem distinto dos demais com presença

de reguladores de crescimento combinados ou isolados. Comparando com os resultados apresentados na Tabela 2, neste tratamento (0,5 mg/L de AIB) foi quantificado o maiores teores de composto fenólicos totais, o que explica a grande variabilidade frente os demais.

O gráfico de *loadings* (Figura 7 B) permite a caracterização de tendências entre as variáveis. Observando-se ao longo do eixo do Factor 1, as variáveis que mais influenciaram diretamente os tratamentos são poder redutor, fenóis e flavonoides totais, localizados na parte negativa, enquanto que a CAT se encontra na parte positiva do gráfico, afetando menos os resultados obtidos.

Deste modo, os resultados apresentados no presente trabalho, mostraram que a presença de AIB no meio de cultivo provocou um aumento significativo no conteúdo fenólico e aumento no poder de redução dos íons Fe^{+3} . Já a combinação destes reguladores (AIB + ANA), nas concentrações utilizadas favoreceram o acúmulo de flavonóides totais e o mecanismo antioxidante de redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V).

Estudos realizados por TAVARES (2009) indicaram que a presença de reguladores no meio de cultivo de plantas medicinais, tem influência significativa na produção de compostos fenólicos de acordo com a concentração que é adotada, o que corrobora com o presente estudo .

No ensaio de captura de radicais livres DPPH, as amostras, mesmo sem qualquer diluição, apresentaram porcentagem de inibição abaixo de 50%, (Tabela 3).

Tabela 3: Porcentagem de inibição de radicais livres DPPH das amostras do meio líquido contendo raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas com diferentes doses de AIB e ANA, combinados ou isolados.

Tratamentos (mg/L)	Porcentagem de Inibição de radicais livres DPPH (%)
Controle (sem regulador)	19,436
0,5 AIB + 0,5 ANA	38,482
0,5 AIB + 1,0 ANA	20,622
1,0 AIB + 0,5 ANA	31,277
0,5 AIB	38,767
1,0 AIB	30,776
0,5 ANA	21,513
1,0 ANA	15,734

Fonte: Da autora

Conforme Oliveira (2015), a composição química do DPPH possui um grupamento amino que confere a solução um caráter alcalino. O meio líquido preparado para o cultivo *in vitro* de raízes, possui características ácidas, desse modo a diferença de pH pode ter interferido nos resultados do ensaio.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o regulador AIB na dose de 0,5 mg/L promove a maior exsudação de compostos fenólicos totais para o meio de cultura, estando correlacionado com o maior poder de redução dos íons Fe^{+3} das amostras.

A combinação de reguladores (AIB + ANA) beneficia a liberação de flavonoides e aumenta a atividade antioxidante pelo método CAT.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, C.; TORRES, I.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; GARCIA-GASCA, T.; BIANCO-LABRA, A. Analysis of Protein Fractions and Some Minerals Present in Chan (*Hyptis suaveolens*) Seeds. *Journal of Food Science*, 77, 1, 2012.

AHN, M.R. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, 2007, p. 1383-1392.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, n. 10, 2010, p. 2202-2210.

ARZAVE, C. V. et al. Gastroprotection of Suaveolol, Isolated from *Hyptis suaveolens*, against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Wistar Rats: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryls: subtítulo do artigo. *Molecules*: 2012, n. 17, p. 8917-8927, 2012.

BASÍLIO, I. J. L. D. et al. Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata*(L.) Poit. e *Hyptis suaveolens*(L.) Poit. (Lamiaceae). *Acta farmacéutica bonaerense*: subtítulo da revista, Local, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.

CROTEAU, R. et al. Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Rockville: American Society of Plant Physiologists*, 2000, p.1250-1318.

FALCÃO, D. Q. Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul. *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio de Janeiro*. 2003, 175f.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F.S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. The *Hyptis* genus: Na ethnopharmacological and chemical review. *Rev.Bras.Farm.*, 84: 69-74, 2003.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n.4, 2008, p. 627-641.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B.J.; PRAKASHI, H.S. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl_4 and H_2O_2 . *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 868-874, 2012.

GHAFFARI, H. et al. Antioxidant and Neuroprotective Activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Against Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity: subtítulo do artigo. *Cell Mol Neurobiol* : 2014, 34, p. 323-331.

- JAMWAL, K. et al. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v.9, 2018, p.26-28.
- JESUS, N.Z.T.; FALCÃO, H.S.; LIMA, G.R.M.; FILHO, M.R.D; SALES,I.R.P.; GOMES, I.F.; SANTOS, S.G.; TAVARES, J.F.; FILHO, J.M.B.; BATISTA, L.M. *Hyptis suaveolens* L.Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology* ,150: 982- 988, 2013.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant Systematics. A phylogenetic approach. Inglaterra, Sinauer Associates Inc., 1999. p. 383-5.
- KIM, D.O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food chemistry*, v. 81, n. 3, 2003 , p. 321-326.
- LAUTIÉ, E.; QUINTERO, R.; FLINIAUX, M.A.; VILLARREAL, M.L. Selection methodology with scoring system: Application to Mexican plants producing podophyllotoxin related lignans. *J Ethnopharm.* ,120,402:12, 2008.
- LIMA, R. K; CARDOSO G, M. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante: subtítulo do artigo. *Revista Fitos: subtítulo da revista, Local*, v. 3, n. 3, 2007 p. 14-24.
- LOIZZO, M. R.; PUGLIESE, A.; MENICHINI, F. Radical scavenging, antioxidant and ferric reducing activities of commercial mineral water enriched with fruit and ready to drink flavoured teas. *Open Nutraceuticals J*, v. 5, 2012, p. 160-8.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008, 544p.
- MAIA, S.S.S.et al. Germinação de sementes de *Hyptis suaveolens* (L)Poit (Lamiaceae) em função da luz e da temperatura. *Caatinga*, 21:212-218, 2008.
- MAIA, S. S. et al. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo de bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Ciência Agrárias*, v.3, n.4, 2008, p.327-331.
- PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; GOMES, T.L.B.; CARDOSO, K.C.M.; AMORIM, E.L.C. Otimização de Metodologia Analítica para o Doseamento de Flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Química Nova*, v.33, n.2, 2010, p.288-291.
- PEREIRA, D. M. S. et al Indução e caracterização morfológica e bioquímica de calos de *Hyptis leucocephala* (Lamiaceae). *Sitientibus série Ciências Biológicas*, v.12, n.1, 2012, p-151-156.

PEREIRA, L. C. O. Caracterização química de óleos essenciais de quatro espécies da família Lamiaceae: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, *Hyptis pectinata* (L.) Poit, *Hyptis martiusii* Benth. e *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. **Monografia (B.ela Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal da Paraíba.** 2014.

PEREIRA, R. C. A. et al. Cultivo de plantas aromáticas. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1071931&biblioteca=vazio&busca=1071931&qFacets=1071931&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Disponível em <http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=73&Itemid=98> Acesso em: 10 jun. 2019.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, 1999, p. 337-341.

RUFINO, M. et al. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução de ferro (FRAP): metodologia científica. **EMBRAPA.** Fortaleza. 2006

SANTOS A. S. et al. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, 2007, p-538-541.

SCHERER, R., GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI), by the 2,2-dphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, 2009, p-654-658.

SCHMITT, J.; PETERSEN, M. Pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia* × *intermedia* cell suspension culture. **PCTOC**, 68:91–98, 2002.

TANG, G. et al. Studies on the chemical compositions of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Journal of Serbian Chemical Society**, v. 83, 2018, p.1-15.

TAVARES, V. L. Cultura de Tecidos e Atividade Antioxidante de *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. **Dissertação (MSc. Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul,** 2009.