

Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo *in vitro*

Mariella Araújo Luna VELLOSO¹, Ilka Nacif ABREU¹, Paulo MAZZAFERA¹

RESUMO

A produção de rutina, quercetina, 1,5-diidroxixantona e ácido betulínico foi investigada em plântulas de *H. brasiliense* crescendo *in vitro*, sob a influência de ácido salicílico, polietilenoglicol, NaCl, 24-epibrassinolídeo, benzotiadiazole (BION), metiljasmonato e concentrações aumentadas de boro e nitrogênio no meio líquido de cultura. As avaliações foram feitas após 5 e 10 dias do início dos tratamentos. Os maiores aumentos de conteúdo foram observados com quercetina para boro e ácido salicílico aos 5 dias, e 24-epibrassinolídeo e BION aos 10 dias.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido betulínico, Quercetina, Rutina, Xantona.

Induction of secondary metabolites in plantlets of *Hypericum brasiliense* Choisy *in vitro*

ABSTRACT

The production of rutin, quercetin, 1,5-dihydroxyxanthone and betulinic acid was investigated in plantlets of *H. brasiliense in vitro*, and exposed to salicylic acid, polyethylene glycol, NaCl, 24-epibrassinolide, benzothiadiazole (BION), methyljasmonate and increased concentrations of boron and nitrogen in the liquid culture medium. Evaluations of the contents were carried out after 5 and 10 days of treatments. The highest increase was observed in quercetin in the salicylic acid and B treatments after 5 days of exposure, and in 24-epibrassinolide and BION after 10 days.

KEY WORDS: Betulinic acid, Quercetin, Rutin, Xanthone.

¹ Depto Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Unicamp, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. e-mail: pmazza@unicamp.br

INTRODUÇÃO

Em extratos de *Hypericum brasiliense* Choisy foram identificadas xantonas, acilfloroglucínóis, flavonóides e ácido betulínico, que possuem importante potencial farmacológico (Rocha *et al.*, 1994, 1995, 1996; Abreu *et al.*, 2004). Tais compostos são sintetizados a partir de diferentes rotas metabólicas (via do ácido chiquímico e via dos terpenos) e a sua concentração em plantas é influenciada por fatores bióticos e abióticos, tais como hormônios, luz, nutrientes, água, etc. (Dixon & Paiva, 1995; Croteau *et al.*, 2000).

O interesse pela fisiologia do estresse e seus efeitos no conteúdo de metabólitos secundários em plantas em parte é explicado por querer se conhecer as possíveis adaptações que poderiam ocorrer no metabolismo desses compostos, maximizando a produção de constituintes ativos de plantas medicinais e condimentares (Dixon & Paiva, 1995; Verpoorte *et al.*, 1999).

O estresse hídrico (excesso e falta de água) e variações de temperatura causaram alterações na produção de metabólitos secundários em *H. brasiliense* (Abreu & Mazzafera, 2005). De modo geral o estresse hídrico aumentou os níveis de todos os metabólitos em questão, especialmente dos flavonóides, enquanto a variação da temperatura influenciou de forma diferenciada os grupos de metabólitos estudados.

Uma das estratégias para estudos sobre o controle metabólico de compostos secundários é o uso da regeneração de plântulas *in vitro*, através de cultura de brotos. Essa capacidade

de regeneração tem sido muito valiosa para a biotecnologia vegetal, sendo possível o cultivo de exemplares mais produtivos em meios otimizados para o crescimento e acúmulo de metabólitos secundários, incluindo o desenvolvimento de culturas de células (Zenk *et al.*, 1977).

Diferentemente dos trabalhos já conduzidos com *H. perforatum*, nos quais foram investigados metabólitos secundários produzidos por órgãos da planta regenerada, como por exemplo folhas em diferentes estádios e raízes (Pasqua *et al.*, 2003; Zobayed *et al.*, 2004), o objetivo do presente estudo foi analisar a variação de metabólitos secundários em plântulas de *H. brasiliense in vitro* na presença de indutores de expressão gênica, como metiljasmonato, brassinoesteróides, ácido salicílico e seu análogo BION (benzothiadiazole), assim como na presença de agentes estressantes (polietilenoglicol e NaCl). Tal estratégia elimina a influência da regeneração, que pode ser mais um fator afetando a produção de compostos do metabolismo secundário. Foram acompanhadas as alterações nos conteúdos de 1,5-diidroxixantona, quercetina, rutina e ácido betulínico (Figura 1), substâncias que tem reconhecida aplicação farmacológica (Abreu *et al.*, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a implantação dos experimentos, como explantes foram utilizadas plantas adultas de *H. brasiliense*, mantidas em boas condições fisiológicas e fitossanitárias em casa de vegetação. Gemas nodais foram deixadas em água corrente

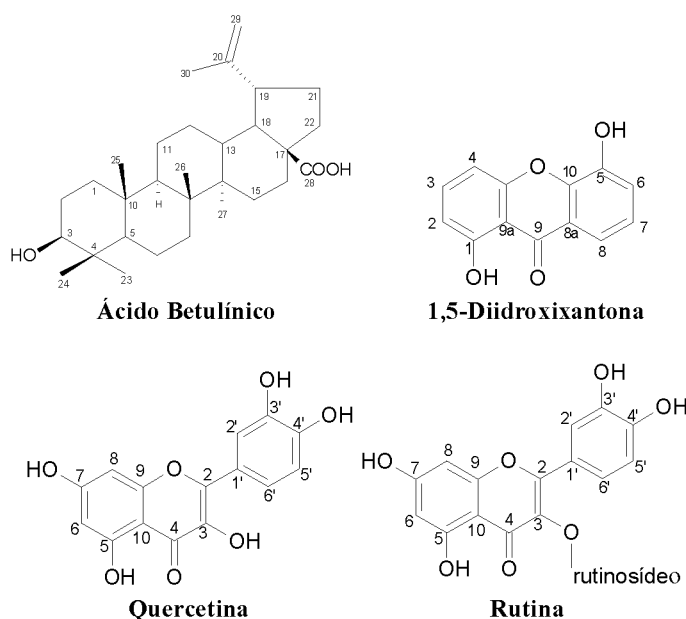


Figura 1 - Estruturas químicas do ácido betulínico, rutina, quercetina e 1,5-diidroxixantona.

por 10 min, depois imersas em etanol 70% por 30 seg e, em seguida, por 30 min em 20% de hipoclorito de sódio comercial (0,4% cloro ativo). Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados por cinco vezes em H₂O destilada e autoclavada, excisados e inoculados em meio de cultura. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) líquido, contendo 3% de sacarose, pH ajustado para 5,8, sem a adição de reguladores. Utilizou-se tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura e pontes de papel de filtro como suporte. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 h, com luz branca fria (25 μmol.m⁻².s⁻¹). A frequência das repicagens foi mensal de forma à obter material vegetal suficiente para a instalação dos experimentos. Foram selecionadas plântulas com tamanho médio ao redor de 12 cm de altura.

Para o estabelecimento dos tratamentos, o meio de cultura líquido do tubo de ensaio de onde estavam sendo mantidas as plantas foi drenado por inversão cuidadosa do tubo e substituído por meio de cultura contendo os tratamentos: Ácido metiljasmonico (50 μM), NaCl (30 mM), polietilenoglicol (PEG - 10%), BION (Benzothiadiazole - 0,1 μg/10mL), nitrogênio (o triplo da concentração de N da formulação do meio MS), boro (o triplo da concentração de B da formulação do meio MS), ácido salicílico (10 mM), 24-epibrassinolídeo (0,1 mM). As plântulas foram mantidas nas condições acima descritas por 5 e 10 dias. Cada tratamento foi composto por 3 repetições, utilizando um delineamento inteiramente casualizado.

Após 5 e 10 dias do estabelecimento dos experimentos, em algumas plântulas a parte aérea e a raiz foram separadas e

pesadas, e determinou-se o conteúdo (mg/g de massa fresca) de ácido betulínico na parte aérea. Para a determinação do conteúdo de quercetina, rutina e 1,5-diidroxixantona foram usadas outras plântulas, que foram coletadas inteiras, sem separação de parte aérea e raiz. A extração dos metabólitos secundários e sua quantificação foram feitas de acordo com Abreu *et al.* (2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 10 dias de exposição aos diferentes tratamentos, todas as plântulas, com exceção do controle, apresentaram alguma alteração nas folhas: NaCl - necrose das folhas da base; PEG - murcha do ápice e amarelecimento das folhas da base; 3xN - ápice necrosado em uma das repetições; 3xB - amarelecimento das folhas da base e presença de antocianina na ponta das folhas; BION- amarelecimento das folhas da base e na base das folhas mais apicais; EBL - aparecimento de novas brotações partindo das gemas nodais; Ácido metiljasmonico - necrose da plântula a partir do ápice; Ácido salicílico - amarelecimento das folhas basais e senescência.

A análise de ácido betulínico foi feita na fração de diclorometano das amostras (Figura 2). De maneira geral, as plântulas controle apresentaram maiores teores de ácido betulínico que as plântulas que receberam algum tipo de suplementação no meio MS. Exceto o tratamento com ácido salicílico e NaCl, todos os outros tratamentos, incluindo o controle, mostraram maior produção de ácido betulínico aos 10 dias quando comparado aos 5 dias. Também com a exceção do tratamento com ácido salicílico e PEG, todos os tratamentos mostraram redução de ácido betulínico aos 5 dias, com o nível aumentando aos 10 dias, mas ainda em níveis

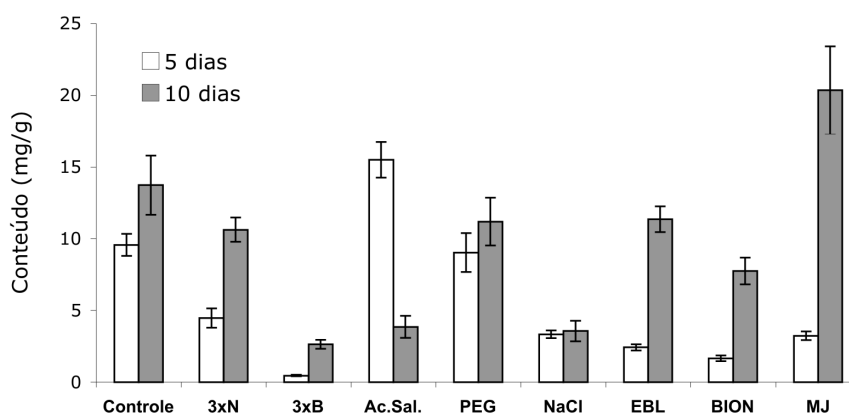


Figura 2 – Variação no conteúdo de ácido betulínico em plântulas de *H. brasiliense* crescendo *in vitro*, após 5 e 10 dias de exposição ao ácido salicílico, polietilenoglicol, 24-epibrassinolídeo, BION, metiljasmonato, NaCl, PEG e aumentadas concentrações de B e N (3 vezes a concentração do meio MS). Médias de três repetições. Barras indicam os desvios padrão.

inferiores ao controle (3xB, BION, NaCl) ou no mesmo nível (3xN, PEG, EBL). No entanto, valores maiores que o controle nos dois dias avaliados foram apenas ácido salicílico aos 5 dias e metiljasmonato aos 10 dias.

A análise dos compostos fenólicos presentes no extrato metanólico de *H. brasiliense* mostraram que para rotina, apenas o tratamento com PEG causou aumento no 5º dia (Figura 3). Aos 10 dias, o tratamento de ácido salicílico também induziu maior produção desse fenol.

Quanto à quercetina, os tratamentos 3xN, 3xB, ácido salicílico e PEG causaram o aumento de concentração aos 5 dias. No entanto, nenhum desses tratamentos persistiu com níveis altos aos 10 dias, sendo que nesta segunda avaliação, EBL e BION apresentaram os valores mais altos.

Os níveis de 1,5-diidroxixantona nos vários tratamentos ou permaneceram semelhantes aos do controle (3xN, 3xB, PEG), ou reduziram aos 5 dias. Porém, exceto metiljasmonato, todos apresentaram maiores concentrações do terpeno na avaliação de 10 dias.

Metiljasmonato é conhecido por ser um indutor da cascata do ácido octadecanóide com conseqüente expressão de genes relacionados à resistência a pragas e doenças (McConn *et al.*, 1997; Thomma *et al.*, 2000), como também induz a produção de compostos secundários (Walker *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). Ácido salicílico e seu análogo BION tem

sido amplamente estudados em relação aos mecanismos de sinalização em plantas e as respostas ao ataque de pragas e doenças (Hammerschmidt, 1999; Pozo *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2006) o que provavelmente está relacionado à capacidade de afetarem o metabolismo secundário de plantas (Nugroho *et al.*, 2002; Avancini *et al.*, 2003).

Brassinosteróides também são conhecidos por proteger plantas contra estresses hídrico e salino, alterando a expressão de vários genes (Zullo & Adam, 2002; Nuñez *et al.*, 2003/2004; Choe, 2006).

A literatura também tem mostrado que plantas acumulam compostos secundários em resposta a estresse salino (Brachet & Cosson, 1983; Tramontano & Jouve, 1997) e a estresse hídrico (Saenz *et al.*, 1993). Também, variações acima ou abaixo do ótimo em relação a elementos essenciais tem mostrado influenciar fortemente o metabolismo de compostos secundários (Mazzafera, 1999).

H. perforatum possui hipericina e pseudohipericina, substâncias que reconhecidamente estão envolvidas no efeito anti-depressivo dessa espécie (Suzuki *et al.*, 1984). Por esta característica, *H. perforatum* é a espécie mais estudada do gênero e alguns trabalhos mostraram que metiljasmonato, em diferentes concentrações, estimulou o acúmulo de xantonas, flavonóides, hipericina e hiperforina (Kirakosyan *et al.*, 2000; Sirvent & Gibson, 2002; Walker *et al.*, 2002; Conceição *et al.*, 2006), indicando que esta substância tem um importante papel na regulação do metabolismo secundário.

Apenas um trabalho estudou o controle da biossíntese de alguns compostos secundários em *H. brasiliense*. A imposição de estresses hídricos (falta e excesso) e de temperatura (baixa, e baixa alternada com alta) induziram significantes alterações nos níveis de ácido betulínico, rutina, quercetina e diidroxixantona (Abreu e Mazzafera, 2005).

No presente trabalho se observou que as respostas diferem não só em relação aos tratamentos, mas também em função do tempo de tratamento. O melhor exemplo disso foi a variação no teor de quercetina nos tratamentos 3xB e ácido salicílico aos 5 dias, e EBL e BION aos 10 dias.

Rutina é formada a partir de quercetina pela ligação de um resíduo rutinosídeo (glicose-ramnose) à posição 3 da molécula (Barber & Behrman, 1991). Desta forma, um aumento em quercetina poderia refletir interrupção da conversão a rutina. No entanto, a queda no conteúdo de quercetina em alguns tratamentos não se refletiu no aumento de rutina, sugerindo que a via é modulada diferentemente.

Xantonas, tal como 1,5-diidroxixantona, são formadas no metabolismo do ácido chiquímico, assim como rutina e quercetina (Beerhues & Berger, 1995; Vermerris & Nicholson, 2006). No entanto, aqui não se observou variação no sentido de que o aumento de uma substância deve ser acompanhado do

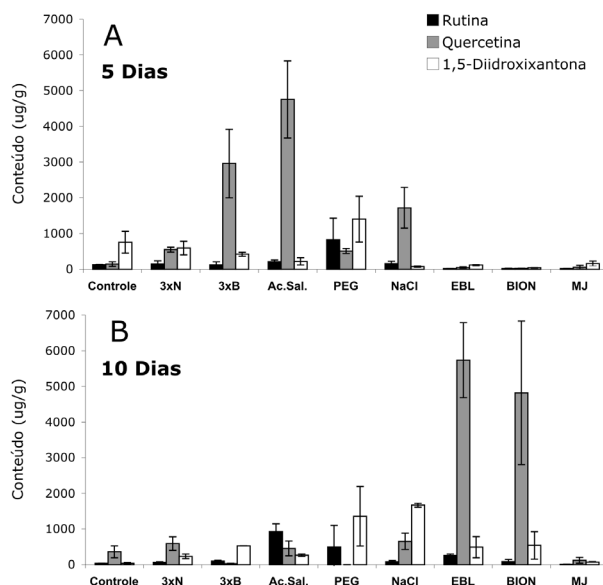


Figura 3 – Variação no conteúdo de rutina, quercetina e 1,5-diidroxixantona em plântulas de *H. brasiliense* crescendo *in vitro*, após 5 (A) e 10 (B) dias de exposição ao ácido salicílico, polietilenoglicol, 24-epibrassinolídeo, BION, metiljasmonato, NaCl, PEG e aumentadas concentrações de B e N (3 vezes a concentração do meio MS). Médias de três repetições. Barras indicam os desvios padrão.

aumento de outras substâncias da mesma rota, mostrando que o controle do nível dessas substâncias são independentes.

Ácido salicílico, ácido metiljasmônico e BION são conhecidos indutores do metabolismo secundário e têm sido reportados como indutores na produção de substâncias de resposta de defesa das plantas, sendo isto muitas vezes relacionado ao aumento de substâncias do metabolismo secundário. Porém, o estresse causado pelo tratamento com ácido metiljasmônico não levou a aumentos relevantes nos níveis dos compostos fenólicos aqui estudados, mesmo para a xantona 1,5-dihidroxixantona, como já havia sido observado em *Hypericum androsaemum* (Beerhues & Berger, 1995). Resultados com ácido metiljasmônico também já foram obtidos com suspensões celulares e calos de *H. perforatum* cultivados no escuro, induzindo a produção de hipericina (Walker *et al.*, 2002).

No presente estudo PEG foi usado para induzir estresse osmótico em plântulas, sendo observada redução do conteúdo apenas de quercetina entre os compostos estudados. O mesmo foi observado por Abreu & Mazzafera (2005), que impuseram déficit hídrico em plantas adultas de *H. brasiliense*. Desta forma, plântulas crescendo *in vitro* poderiam ser usadas como modelos de estudo no controle da biossíntese dessas substâncias.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento de bolsas de estudo (MALV, INA) e de pesquisador (PM) aos autores.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Abreu, I.N.; Porto, A.L.M., Marsaioli, A.J.; Mazzafera, P. 2004. Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science*, 167: 949-954.
- Abreu, I.N.; Mazzafera, P. 2005. Effects of water and temperature stress of activity constituent *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:241-248.
- Abreu, I.N. 2002. *Isolamento e produção de substâncias de interesse farmacológico de Hypericum brasiliense Choisy*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Avancini, G.; Abreu, I.N.; Saldaña, M.D.A.; Mohamed, R.S.; Mazzafera P. 2003. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry*, 63: 171-175.
- Barber, G.A.; Behrman, E.J. 1991. The synthesis and characterization of uridine 5'-(beta-L-rhamnopyranosyl diphosphate) and its role in the enzymatic-synthesis of rutin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288: 239-242.
- Beerhues, L.; Berger, U. 1995. Differential accumulation of xanthone in methyl jasmonate and yeast extract treated cell cultures of *C. erythraea* and *C. littorale*. *Planta*, 197:608-612.
- Brachet, J.; Cosson, L. 1983. Changes in the total alkaloid content of *Datura innoxia* Mill. subjected to salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 37: 650-656.
- Cardoso, M.A.; Oliveira, D.E. 1996. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44:91-94.
- Choe, S. 2006. Brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Physiologia Plantarum*, 126: 539-548
- Conceição, L.R.F.; Ferreres, F.; Tavares, R.M. 2006. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67:149-155.
- Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville. p. 1250-1318.
- Dixon, R.A.; Paiva, N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*; 7:1085-1097.
- Fujita, M.; Fujita, Y.; Noutoshi, Y.; Takahashi, F.; Narusaka, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 436-442.
- Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 77-84.
- Kirakosyan, A.; Hayashi, H.; Inoue, K.; Charchoglyan, A. ; Vardapetyan, H. 2000. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry*, 53: 345-348.
- Mazzafera, P. 1999. Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves. *Bragantia*, 58: 387-391.
- McConn, M., Creelman, R.A.; Bell, E.; Mullet, J.E.; Browse, J. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94: 5473-5477.
- Núñez, M.; Mazzafera, P.; Mazorra, L.M.; Siqueira, W.J.; Zullo, M.A.T. 2003/2004. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice growing in culture medium with NaCl. *Biologia Plantarum*, 47: 67-70.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15: 473-497.
- Nugroho, L.H.; Verberne, M.C.; Verpoorte, R. 2002. Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 40: 755-760
- Oliveira, B.H.; Santos, Cid. A.M.; Espíndola, A.P.D.M. 2002. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 13:95-98.

- Pasqua, G.; Avato, P.; Monacelli, B.; Santamaría, AR.; Argentieri, M.P. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science*, 165: 977-982.
- Pozo, M.J.; Loon, L.C.V.; Pieterse, C.M.J. 2004. Signals in plant-microbe interactions *Journal of Plant Growth Regulation*, 23: 211-222;
- Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M.; Stoecklievans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hostettmann, K. 1994. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, 36: 1381-1385.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Evans, H.; Hostettmann, K. 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoid from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, 40: 1447-1452.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Hostettmann, K. 1996. More phoroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, 42: 185-188.
- Saenz, L.; Santamaría, J.M.; Villanueva, M.A.; Loyola-Vargas, V.M.; Oropeza, C. 1993. Changes in the alkaloid content of plants of *Catharanthus roseus* L. (Don). as a result of water stress and treatment with abscisic acid. *Journal of Plant Physiology*, 142: 244-247.
- Sirvent, T.; Gibson, D. 2002. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60: 311-320.
- Suzuki, O.; Katsumata, Y.; Oya, M. 1984. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Medica*, 50: 272-274.
- Thomma, B.P.H.J.; Eggermont, K.; Broekaert, W.F.; Cammue, B.P.A. 2000. Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology Biochemistry*, 38: 421-427.
- Tramontano, W.A.; Jouve, D. 1997. Trigonelline accumulation in salt-stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents. *Phytochemistry*, 44: 1037-1040.
- Vermerris, W.; Nicholson, R. 2006. Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht. 276 pp.
- Verpoorte, R.; van der Heijden, R.; ten Hoopen, H.J.G.; Memelink, J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21: 467-479.
- Walker, T.S.; Bais, H.P.; Vivanco, J.M. 2002. . *Phytochemistry*, 60(3):289-293.
- Yu, K.W.; Gao, W.Y.; Hahn, E.J.; Paek, K.Y. 2002. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* CA Meyer. *Biochemical Engineering Journal*, 11: 211-215
- Zenk, M.H.; El Shagi, H.; Arens, H.; Stockigt, J.; Weiler, E.W.; Deus, B. 1977. In: Bars, W.; Reinhard, E.; Zenk, M.H. (Eds). *Plant Tissue culture and its bio-technological application*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, p.27-47.
- Zobayed, S.M.A.; Murch, S.J.; Rupasinghe, H.P.V.; Saxena, P.K. 2004. *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). *Plant Science*, 166: 333-340
- Zullo, M.A.T.; Adam, G. 2002. Brassinosteroid phytohormones - structure, bioactivity and applications. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 143-181.

Recebido em 10/03/2008

Aceito em 20/01/2009