

Eclética Química

Print version ISSN 0100-4670 On-line version ISSN 1678-4618

Eclet. Quím. vol.27 no.special São Paulo 2002

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702002000200033>

Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus Illicifolia*

Induction of bioactive metabolites in plant cell tissue culture of *Maytenus ilicifolia*

Waldemar Buffa Filho^I; Ana Maria Soares Pereira^{II}; Suzelei de Castro França^{II}; Maysa Furlan^I

^INuBBE - Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - UNESP - 14801-970 - Araraquara - SP - Brasil

^{II}Departamento de Biotecnologia Vegetal - Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP - 14096-380 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

RESUMO

Visando a obtenção de triterpenos quinonametídeos em concentração apreciável protocolo para o desenvolvimento de culturas de células de *M. ilicifolia* foi estabelecido. Estudos visando observar a influência da luminosidade sobre o crescimento das culturas mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade, além da avaliação da influência de diferentes tipos de frascos, que variavam em altura, sobre o crescimento e acúmulo desses metabólitos, foram realizados. O acúmulo desses metabólitos com comprovada atividade biológica se mostrou 100 e 3 vezes maior para a 22b-hidroximaitenina e maitenina, respectivamente, no sistema *in vitro* quando comparada à planta *in natura*. Isto demonstra que o sistema *in vitro* pode se constituir em uma excelente ferramenta para a produção, em maior escala, destes metabólitos bioativos.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*, Celastraceae, cultura de células, triterpenos quinonametídeos

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia (Celastraceae) showed the accumulation of quinonamethide triterpenes, which

constitute a class of secondary metabolites with comproved biological activity. Dealing on the obtention of these metabolites in a large concentration, protocol to establish cell tissue culture of *Maytenus ilicifolia* was developed. In order to evaluate the lightly influence under cell tissue cultures growing in the same conditions of temperature and humidity, besides the influence of different types of flasks over the accumulation of these metabolites were done. The accumulation of these metabolites with comproved biological activity showed 100 and 3 times higher to 20a-hidroxiymaytenin and maytenin, respectively, and showed that the *in vitro* system should be an excellent tool to the production, in large scale, of these bioactive metabolites.

Key-words: *Maytenus ilicifolia*, Celastraceae, cell tissue culture, quinonamethide triterpenes.

INTRODUÇÃO

As plantas têm sido tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas (Tyler, 1994) ⁹. Embora muitos compostos derivados de plantas medicinais possam ser sintetizados em laboratório, tal síntese é freqüentemente complexa, com rendimentos abaixo do esperado, corroborando assim uma produção economicamente inviável destes metabólitos de interesse (Holton, 1994; Nicolau, 1994) ³⁻⁶. A reprodução de espécies herbáceas medicinais com ciclo de vida curto, via de regra não oferece maiores dificuldades. No entanto, a propagação de espécies arbóreas cujas cascas ou raízes contém substâncias bioativas, freqüentemente se constitui um desafio devido às limitações de germinação, desenvolvimento lento de propágulos e difícil enraizamento. Usualmente, essas substâncias mostram acúmulo em células fisiologicamente maduras ou tecidos especializados, quando atingem a fase estacionária de crescimento.

Quando o cultivo convencional é inviável, o uso de técnicas biotecnológicas se constitui uma ferramenta bastante útil para a obtenção de culturas de células *in vitro* e reprodução de explantes com características desejáveis, tais como: resistência a pragas e outras condições de estresse, alta produtividade e elevado rendimento de substâncias ativas de interesse (Zenk, 1998; Zenk, 1996) ¹⁰⁻¹¹.

A capacidade de regeneração total de plantas a partir de suas células ou tecidos tem sido extremamente valiosa para a biotecnologia vegetal. Cada célula contém a informação genética para todas as funções, incluindo a biossíntese de metabólitos secundários.

A regeneração de plântulas *in vitro* através de cultura de brotos, conhecida como micropropagação, freqüentemente utilizada para a obtenção de clones que mantém todas as características da planta-mãe, constitui-se em uma técnica especialmente vantajosa para a preservação de genótipos produtores de moléculas bioativas.

As culturas de células vegetais apresentam uma variedade de características de crescimento e de produção de metabólitos secundários. Portanto, um fator muito importante a ser considerado na

definição de uma estratégia eficiente para produção de substâncias bioativas é, sem dúvida alguma, a relação entre proliferação celular e formação de produto(s). Em suma, a escolha de uma estratégia adequada à produção de um dado metabólito secundário dependerá da cinética de formação do produto vs a cinética de crescimento da cultura (Sahai e Knuth, 1985) ⁷. Convém ressaltar que não há estratégia alguma definida como aplicável a todas as culturas de células e produtos-alvo. Na maioria dos casos a proliferação de células e a biossíntese de metabólitos são fenômenos separados, tendo cada qual suas condições favoráveis.

O microambiente dentro dos frascos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, mas na verdade é o responsável pela variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são o tipo de frasco, tipo de tampa e quantidade de meio presente. A influência do tipo de tampa está relacionada com o nível de trocas gasosas adequadas, pois tampas com vedação hermética podem ocasionar aumento de CO₂ e etileno. O tipo de frasco e a quantidade de meio afetam a área superficial da interface meio-atmosfera, o volume de ar sobre o meio e a profundidade do meio. Esses fatores também afetam a composição gasosa do frasco. Além de etileno e CO₂, outros gases metabolicamente ativos são liberados pelas culturas. Cultura de calos produzem etileno, acetaldéido e etanol, dependendo do tamanho do frasco. Estes gases metabolicamente ativos interferem nas culturas, inclusive, na quantidade de O₂ presente nos frascos.

Sendo assim, o crescente desenvolvimento de pesquisas que abordam biotecnologia vegetal permitem entender os mecanismos e processos de regulação de vias metabólicas visando a produção de compostos de interesse (Torres, 1998) ⁸.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais. Foi utilizada uma coluna Supelco INC (Supelco Park, Bellefonte, PA, USA) C18 com 5mm (150 x 4,6 mm d.i.) e pré-coluna (20 x 4,6 mm d.i.). Metanol grau HPLC foi adquirido da Mallinckrodt; água a >18 Mohm foi obtida usando um purificador Millipore. Todos os solventes e amostras foram filtrados em um filtro de 0,2 mm de membrana de nylon.

Indução de calos. Explantes de folhas de plântulas micropropagadas de *Maytenus ilicifolia* foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962)⁴⁻⁵ suplementado com 0,4 mg/L de BAP (6-benzilamino purina) e 0,2 mg/L de ANA (ácido naftaleno acético). Após 3 meses explantes de folhas (1 cm²) foram inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de (K) cinetina e 1,0 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético). Os calos foram mantidos no mesmo meio por um ano e subculturados a cada 30 dias. A cultura de célula foi mantida no mesmo meio por 45 dias e a subcultura, para o meio fresco, foi feita após esse período.

Experimento de luminosidade. Os calos foram posicionados em sala de crescimento com condições de temperatura e umidade controladas, variando apenas as condições de luminosidade. Foram inoculadas as mesmas quantidades de massa celular (1,0 ± 0,1g), em meio semi-sólido. O experimento foi repetido três vezes com total de 20 replicatas. Os tratamentos se consistiram em exposição à luminosidade durante 24 horas, fotoperíodo 16 h claro/ 8 h escuro e 24 h escuro durante

45 dias. Após este período os calos foram removidos da condição *in vitro*, liofilizados e analisados utilizando tratamento estatístico e programa gráfico Jandel Scientific / Sigma Plot.

Experimento variando os tipos de frascos. Foram selecionados três tipos de frascos para manutenção das culturas de células de *M. ilicifolia*. Nos tratamentos utilizou-se tratamento (A) vidro grande (5 cm de diâmetro x 12 cm de altura), tratamento (B) médio (5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) e tratamento (C) pequeno (5 cm de diâmetro x 6 cm de altura). Inicialmente dois gramas ($2g \pm 0,1$) de calos foram espalhados em 30 mL de meio semi-sólido (MS + 1 mL de cinetina + 1 mL de 2,4-D) e colocados em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 ° C, 60% de umidade relativa e fotoperíodo de 16 horas de luz ($40 \text{ mmol}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Cada tratamento foi estabelecido com três repetições (Lotes 1,2 e 3) e dez replicatas, para fins de análise dos resultados.

Padrões cromatográficos utilizados. As substâncias utilizadas como padrão cromatográfico foram isoladas das cascas das raízes de *M. aquifolium* (Celastraceae) e *Salacia campestris* (Hippocrataceae) (Corsino *et al.*, 1998)².

Preparo das amostras para análises em CLAE. Os calos de *M. ilicifolia* liofilizados foram extraídos com clorofórmio (100 mL) com auxílio de ultrassom, por 20 minutos. Os extratos obtidos foram evaporados até *secura* e os resíduos dissolvidos em metanol obtendo-se soluções com concentração de 1 mg/mL, dos quais alíquotas de 20 mL foram analisadas em CLAE.

Equipamento de CLAE. VARIAN ProStar modelo 240 com detector UV - PDA modelo 330, Auto injetor modelo 410 com sistema de aquisição de dados pelo Software Star Chromatography Workstation.

Condições de CLAE. Utilizou-se modo isocrático com sistema de eluição metanol : água (80:20, v/v) contendo 1% de ácido fosfórico e fluxo de 1 mL/min.. A coluna foi condicionada com a fase móvel por três minutos, seguida de um tempo de 10 minutos de calibração. O tempo total de análise para cada amostra foi de 20 minutos. Dados espectrais do detector UV foram coletados por 20 minutos dentro da faixa de 253 - 420 nm, sendo os cromatogramas analisados e plotados a 420 nm. As curvas de calibração assim como a resposta de linearidade do detector foram estabelecidas para as substâncias 1 e 2 por uma série de injeções de soluções padrões com faixa de concentração de 2,5 - 50,0 mg/ml (1) e 1,0 - 50,0 mg/ml (2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise dos resultados obtidos a partir do tratamento estatístico dos diferentes tipos de frascos.

A análise dos resultados obtidos a partir do tratamento estatístico permitiu inferir que, o maior rendimento em massa dos calos foi obtido quando o frasco médio (B) foi utilizado. No entanto, não foi observada uma diferença significativa quanto ao teor dos metabólitos de interesse entre os três frascos utilizados, [Tabela 1](#).

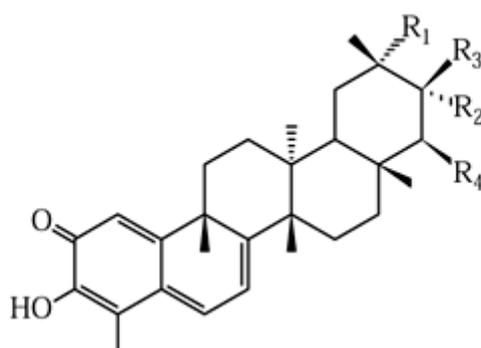
Tabela 1 – Resultados da análise estatística e teor dos triterpenos quinonametídeos nos diferentes tipos de frascos.

Tipo de frasco	Índice de crescimento	Teor dos triterpenos quinonametídeos (%)		
		22 β -hidroximaitenina (1)	maitenina (2)	
Grande A	32,30 B	0,0043 A	0,0006 A	
Médio B	102,30 A	0,0051 A	0,0007 A	
Pequeno C	29,09 B	0,0029 A	0,0004 A	

As médias dos tratamentos seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$)

Análise dos cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos dos diferentes tipos de frascos.

Os cromatogramas obtidos a partir da análise qualitativa via CLAE (Figuras 5, 6 e 7), mostram a presença ou ausência dos triterpenos quinonametídeos 22 β -hidroximaitenina (1) e maitenina (2). A identidade das substâncias foi feita pela comparação dos tempos de retenção destas com os picos referentes aos padrões autênticos utilizados (Figura 4).



1. R₁ = H; R₂ = R₃ = O; R₄ = OH

2. R₁ = H; R₂ = R₃ = O; R₄ = H

Figura 1 – Estrutura molecular dos triterpenos quinonametídeos presentes em *Maytenus ilicifolia*.

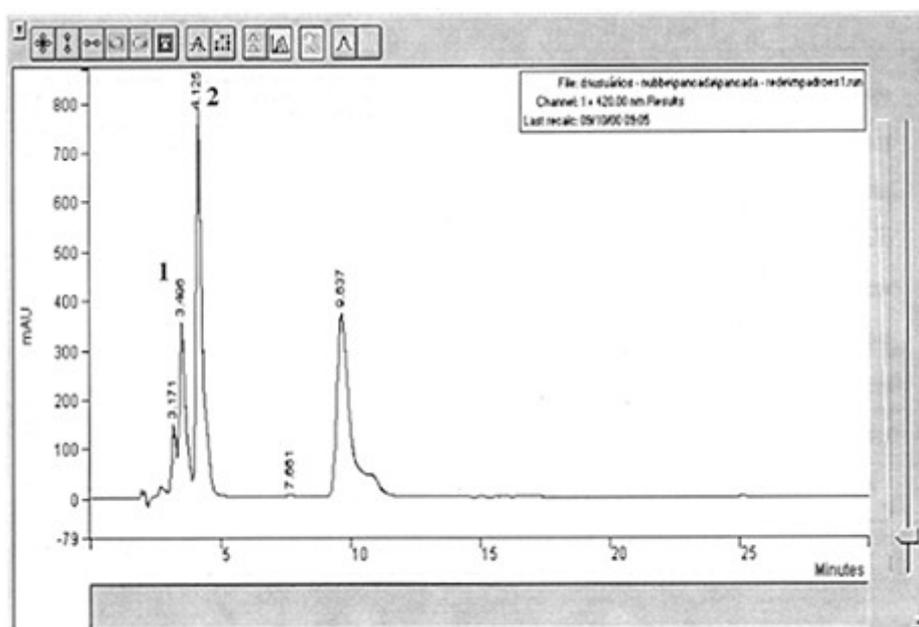


Figura 2 – Cromatograma em CLAE dos padrões utilizados.

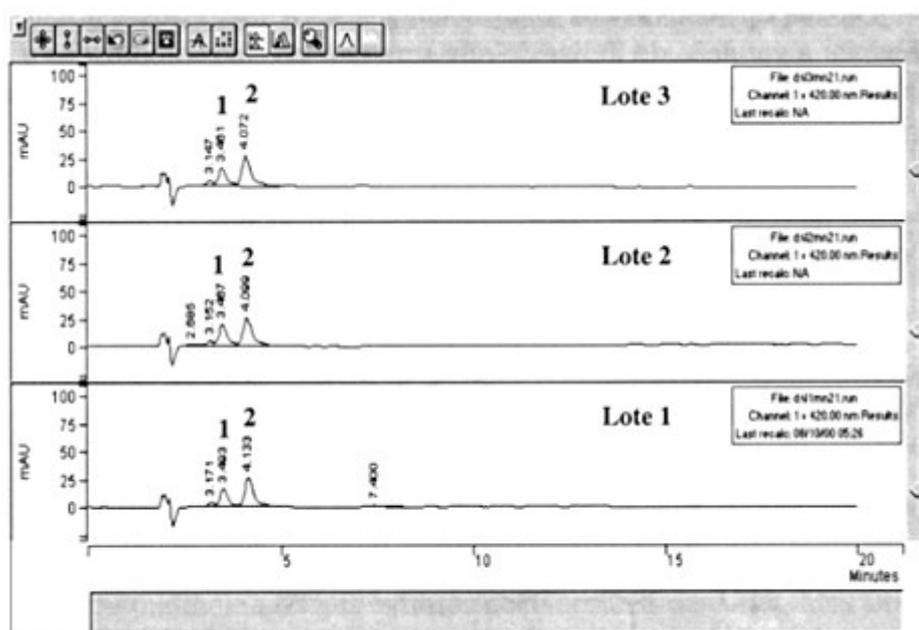


Figura 3 – Cromatograma em CLAE dos extratos clorofórmicos do tratamento A lotes 1, 2 e 3

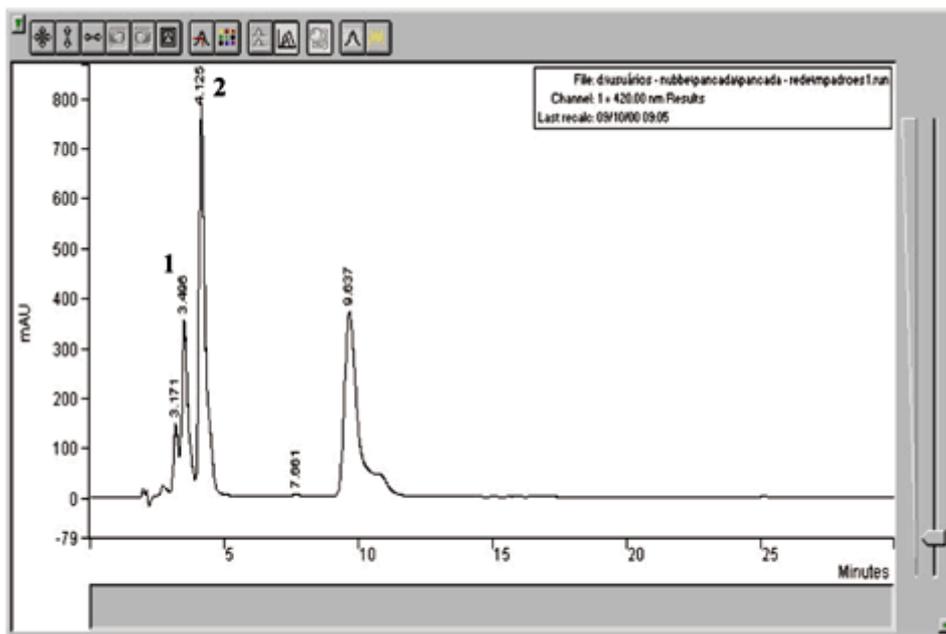


Figura 4-Cromatograma em CLAE dos padrões utilizados.

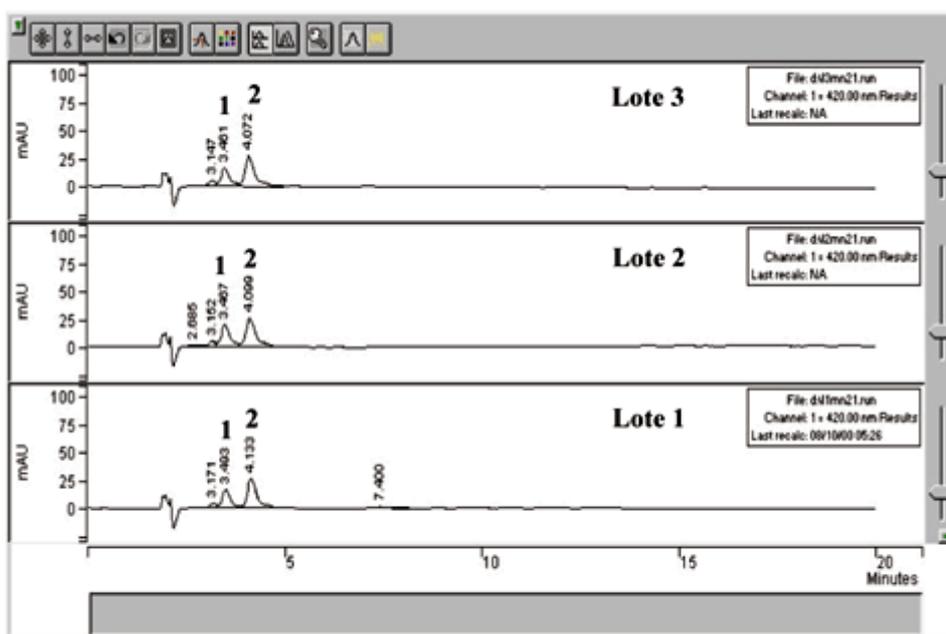


Figura 5-Cromatograma em CLAE dos extratos clorofórmicos do tratamento A lotes 1, 2 e 3..

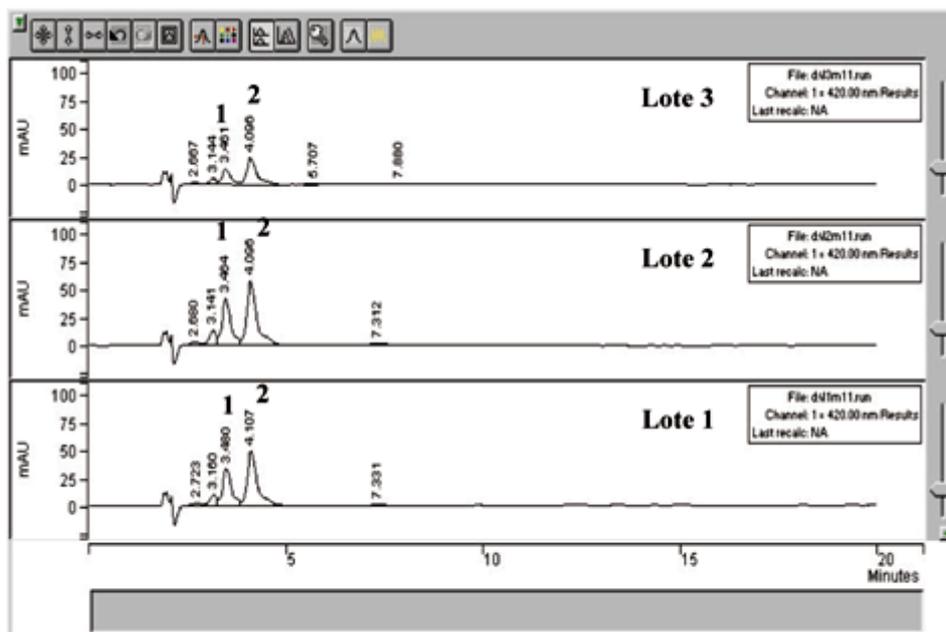


Figura 6–Cromatograma em CLAE dos extratos clorofórmicos do tratamento B lotes 1, 2 e 3..

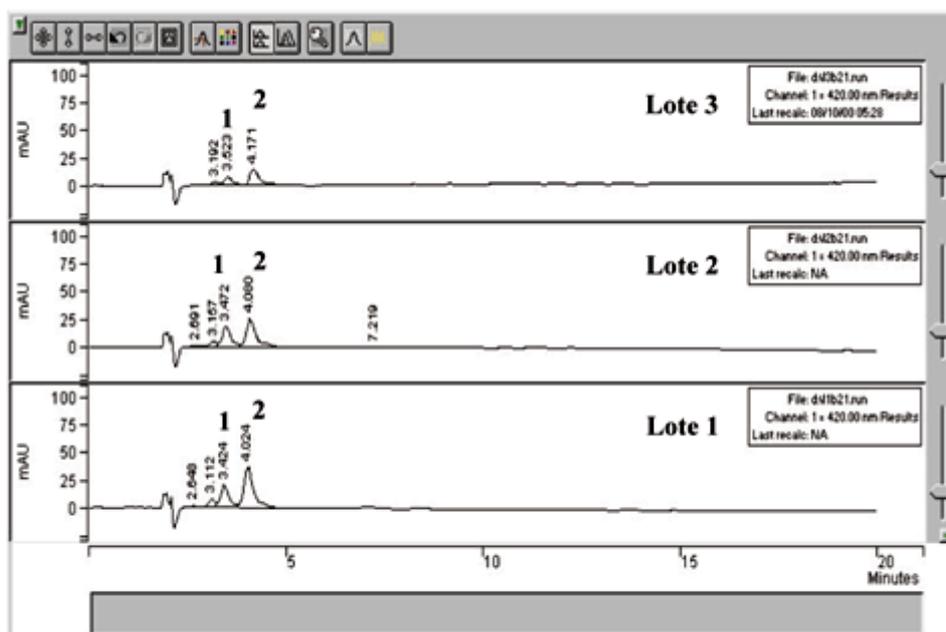


Figura 7–Cromatograma em CLAE dos extratos clorofórmicos do tratamento C lotes 1, 2 e 3..

Os três tipos de frascos foram selecionados para que fosse possível observar, a variação do índice de crescimento dos calos produzidos e o acúmulo dos triterpenos quinonametídeos em relação à mudança do ambiente interno.

Quantificação dos triterpenos quinonametídeos nos calos de *M. ilicifolia* para cada frascos utilizado.

O trabalho de quantificação desses metabólitos secundários foi realizado para que fosse possível fazer uma comparação entre o nível de acúmulo desses metabólitos nos diferentes frascos utilizados.

Para o trabalho de quantificação a resposta de linearidade do detector e as curvas de calibração foram estabelecidas para a 22 β -hidroximaitenina (1) e para a maitenina (2), ([Figura 1](#)). Para cada substância foi injetada soluções padrões com faixa de concentração de 3,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 50,0 mg/ml (1) e 0,4; 1,5; 5,0; 25,0 e 50,0 mg/ml (2).

Os coeficientes de correlação de resposta do detector, para 1 e 2 foram 0,9997 e 0,9998, respectivamente, indicando uma boa linearidade e sensibilidade do detector na faixa de medida. Os limites de detecção para 1 e 2 foram 0,0005 ng e 0,0003 ng, respectivamente.

O teor de cada triterpeno quinonametídeo é apresentado na [Tabela 2](#).

Tabela 2–Porcentagem das substâncias 22 β -hidroximaitenina (1) e maitenina (2) nos extratos clorofórmicos dos diferentes tipos de frascos grande (A), médio (B) e pequeno (C).

Compartimento	Lote	Porcentagens dos padrões	
		22 β -hidroximaitenina (1) (%)	Maitenina (2) (%)
Grande (A)	1	0,002493	0,0004282
	2	0,003812	0,0004215
	3	0,002479	0,0004311
Médio (B)	1	0,007077	0,0010035
	2	0,005995	0,0008046
	3	0,002326	0,0004379
Pequeno (C)	1	0,004874	0,0008536
	2	0,006034	0,0008678
	3	0,001850	0,0004115

Análise dos resultados do experimento de variação das condições de luminosidade sobre o crescimento celular de Maytenus ilicifolia.

A análise dos resultados obtidos pelo teste Tuckey ([Tabela 3](#)) demonstrou que não houve uma diferença significativa entre os três tratamentos utilizados, luz 24 horas, fotoperíodo 16 horas claro / 8 horas escuro e 24 horas escuro.

Tabela 3–Resultado da análise estatística da influência da luminosidade sob o crescimento do calos de *Maytenus ilicifolia*.

Tipo de tratamento	Índice de Crescimento
Luz	4,0716 A
Fotoperíodo	3,4420 AB
Escuro	2,4880 B

As médias dos tratamentos seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$)

Tabela 4–Análise estatística da influência da luminosidade sob o crescimento do calos de *Maytenus ilicifolia*.

Metabólitos	Teor dos triterpenos quinonametideos na planta in natura e no sistema in vitro	
	in natura	in vitro
22b-hidroximaitenina (1)	0,00030	0,04097
maitenina (2)	0,00029	0,00438

e

Baseado nesses resultados foi possível concluir que a presença de luz é condição sinequanom para a manutenção das culturas, uma vez que a quantidade, em massa, de células foi maior nesta condição quando comparada às culturas mantidas no escuro.

As condições ideais de produção de metabólitos secundários *in vitro* só são obtidas depois de extensivos procedimentos de otimização do meio de cultura e que estudos aprofundados das condições atmosféricas no ambiente *in vitro* são fundamentais para aumentar a produtividade de células e dos metabólitos de interesse.

CONCLUSÕES

Os experimentos realizados com os calos de *M. ilicifolia* mostraram que o frasco médio (**B**) apresentou o maior índice de crescimento. No entanto, o teor dos triterpenos quinonametideos, não variou como mostrado através da análise estatística.

Os frascos continham o mesmo volume de meio de cultura, o mesmo diâmetro mas variavam em altura. O fato do frasco médio ter promovido maior índice de crescimento revela que deve haver uma relação importante entre o índice de crescimento e o volume de gases contido no frasco. Este dado é importante porque mostra que experimentos específicos de oxigenação e níveis de CO₂ devem ser realizados para otimizar ainda mais a produção de células *in vitro* de *M. ilicifolia*.

Através dos resultados do experimento de variação de luminosidade foi possível concluir que a presença de luz é condição necessária para a manutenção das culturas, uma vez que a quantidade, em massa, de células foi maior nessa condição, quando comparada com as culturas mantidas no escuro.

Ao compararmos os dados obtidos da análise quantitativa de quinonametídeos de 5 genótipos de *M. ilicifolia* e os resultados dos experimento em culturas de células de *M. ilicifolia*, concluímos que as células cultivadas *in vitro* produziram 3 vezes mais maitenina (**2**) e 100 vezes mais 22b-hidroxi-maitenina (**1**), do que as raízes de plantas cultivadas *ex vitro* ([Tabela 3](#)) (Buffa Filho, 2001) ¹.

Os resultados obtidos com o cultivo de células em meio semi-sólido mostram a necessidade do estabelecimento de suspensões celulares visando cada vez mais a otimização da cultura e a produção desses quinonametídeos para a investigação das rotas biossintéticas destes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP e ao programa BIOTA - FAPESP (processo número 98/05074-0) pelo suporte financeiro e pela bolsa de Mestrado concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 BUFFA FILHO, W.; CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, F.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C. Quantitative determination of cytotoxic *friedo*-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, v.12, p.1-4, 2001. [[Links](#)]

2 CORSINO, J.; ALÉCIO, A. C.; RIBEIRO, M. L.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B.; FRANÇA, S. C. Quantitative determination of maytenin and 22b -hydroxymaytenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, v.9, p.245-247, 1998. [[Links](#)]

3 HOLTON, R.; SOMOZA, C.; KIM, H. B.; LIANG, F.; BIEDIGER, R. J.; BOATMAN, P. D.; SHINDO, M.; SMITH, C. C.; KIM, S. C.; NADIZADEH, H.; SUZUKI, Y.; TAO, C. L.; VU, P.; TANG, S. H.; ZHANG, P. S.; MURTHI, K. K.; GENTILE, L. N.; LIU, J. N. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B Ring. *J. Am. Chem. Soc.*, v.116, p.1597-1598, 1994. [[Links](#)]

4 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phytochem.*, v.31, p.805, 1962. [[Links](#)]

5 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, v.15, p.473, 1962. [[Links](#)]

6 NICOLAU, K. C.; YANG, Z.; LIU, J. J.; UENO, H.; NANTERMET, P. G.; GUY, R. K.; CLAIBORNE, C. F.; RENAUD, J.; COULADOUROS, E. A.; PAULVANNAN, K.; SORENSEN, E. J. Total synthesis of taxol. *Nature*, v.367, p.630-634, 1994. [[Links](#)]

- 7 SAHAI, O. P.; KNUTH, M. The technology of phytoproduction in plant tissue culture and process economics. *Biotechnol. Prog.*, v.1, p.1-9, 1985. [[Links](#)]
- 8 TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 3. ed. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa-CNPq. 1998, 216 p. [[Links](#)]
- 9 TYLER, V. E. *Herbs of choice*. New York: Haworth. 1994. [[Links](#)]
- 10 ZENK, M. H.; MENHARD, B.; EISENREICH, W.; HYLANDS, P. J.; BACHER, A. Taxoids from cell cultures of *Taxus Chinensis*. *Phytochem.*, v.49, p.113-125, 1998. [[Links](#)]
- 11 ZENK, M. H.; MENHARD, B.; EISENREICH, W.; HYLANDS, P. J.; BACHER, A. Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.93, p.6431-6436, 1996. [[Links](#)]

Recebido em 05.03.2002

Aceito em 01.04.2002