



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas - MG CEP 37130-001
Fone: (35) 3299-1419 (Coordenação) / (35) 3701-9262 (Secretaria)
www.unifal-mg.edu.br/ppgca/



Gabriel Chiari

**Obtenção de naftoquinonas no cultivo *in vitro* de *Handroanthus*
impetiginosus (Mart, ex DC.) Mattos.**

Alfenas/MG

2019

Gabriel Chiari

**Obtenção de naftoquinonas no cultivo *in vitro* de *Handroanthus
impetiginosus* (Mart, ex DC.) Mattos.**

Dissertação apresentada para exame de defesa pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais. Área de concentração: Tecnologias ambientais aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva

Colaboradores: Giovana Esteves

Alfenas/MG

2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37120-000
Fone: (35) 3791-9600 (Coordenação) / (35) 3791-9262 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



GABRIEL CHIARI

"Obtenção de naftoquinonas no cultivo *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* (Mart, ex DC.) Mattos"

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 22 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Breno Régis Santos

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ronaldo Luiz Mincato

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: _____

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Instituição: FCF - UNIFAL-MG

Assinatura: _____

*Dedico este estudo aos meus pais Angela e Marcio
que sempre me deram todo o apoio e estrutura emocional.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, em primeiro lugar, que com total incentivo deram forças para que tudo isso acontecesse.

Ao professor Breno, pela orientação, conhecimentos laboratoriais passados e confiança. Aos professores que com toda paciência e dedicação passaram de forma simples e direta todo conhecimento teórico e prático para que essa pesquisa acontecesse.

A todos os amigos que fiz em Alfenas, que de forma direta ou indireta contribuíram e contribuem em minha jornada, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço aos amigos que fiz no laboratório, que sempre me deram apoio não só nas pesquisas, mas também em momentos pessoais difíceis, sem eles ficaria quase impossível de terminar esta pesquisa. E, para finalizar, agradeço a CAPES por me financiar em todo projeto, sendo a responsável pelo bom andamento da pesquisa.

“Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança para ela”.

Albert Einstein

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias dos tratamentos e p-valor referentes ao controle, elicitor 1 e elicitor 2..... 20

Tabela 2: Substâncias sugeridas pela análise de MALDI-TOF. 23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do lapachol e da β -lapachona.....	16
Figura 2: BoxPlot referentes ao elicitor1 e elicitor2 com seu outlier.	21
Figura 3: Diferença observada com relação à coloração dos meios de cultura, onde os dois primeiros potes estão com meio e sem explante, os dois seguintes estão com meio e explante, mas sem o elicitor1 e os três últimos contendo meio, explante e elicitor1.	21
Figura 4: Gráficos obtidos no espectrofotometro de massas (MALDI-TOF) onde o eixo Y é a absorbância e o eixo X é a massa m/z. O primeiro gráfico representa a matriz (a-CHCA) e o segundo gráfico representa o extrato tratado com a matriz.	23
Figura 5: Gráfico utilizado para obtenção da IC ₅₀	24

LISTA DE ABREVIACOES

g – Grama

mg – Miligrama

L – Litro

mL – Mililitro

atm – Pressão atmosférica

° C – Temperatura

MS – Meio de cultura Murashige e Skoog

W – Watts

V – Volt

µL – Microlitro

µm – Micrometro

β – Beta

α – Alfa

CC₅₀/IC₅₀ – Concentrao necessária para matar 50% das células

MALDI-TOF – Ionizao e dessoro a laser assistida por matriz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. IPÊ ROXO	2
2.2. NAFTOQUINONAS	3
2.3. LAPACHOL E DERIVADOS	5
2.4. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	6
2.5. ELICIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	7
2.6. BIORRETORES	8
3. JUSTIFICATIVA	9
4. OBJETIVOS	10
4.1. OBJETIVOS GERAIS	10
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1	14
Resumo	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES	17
2.2. ELICIAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	17
2.3. BIORREATOR	18
2.4. OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS	18
2.5. ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSAS	18
2.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	19
2.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira é considerada como uma das maiores do mundo e por conta disso, o estudo de plantas com potencial biotecnológico tem se intensificado nos últimos anos, visando encontrar a cura de doenças de alta importância. Os metabólitos secundários possuem ações importantes no interior do vegetal que possibilitam a sobrevivência em diversos ambientes. Estas substâncias bioativas são utilizadas pela medicina popular há séculos e podem contribuir com o meio científico na busca por novos medicamentos.

A espécie *Handroanthus impetiginosus*, popularmente conhecida como ipê-roxo, é muito estudada devido às suas naftoquinonas encontradas no lenho. Diversas substâncias já foram isoladas deste gênero e entre elas estão listadas seis naftoquinonas e nove antraquinonas. Do primeiro grupo podemos citar as mais famosas como o lapachol, a alfa-lapachona e a beta-lapachona, tidos há pouco tempo atrás como promissores para a cura para o câncer (DA CRUZ FONSECA; BRAGA; DE SANTANA, 2003).

O lenho é muito utilizado na medicina popular devido aos efeitos terapêuticos das quinonas, especialmente as mencionadas anteriormente. Os indígenas e populações tradicionais utilizam para fins antimicrobianos, antitumorais, anti-inflamatórios e cicatrizantes, atividades estas que já foram comprovadas cientificamente e atribuídas ao lapachol e a β -lapachona (DE MORAIS *et al.*, 2005).

A extração de tais compostos gera é um processo extrativista extremo, uma vez que o vegetal morre ao retirar as cascas. O ipê é uma das espécies que podem sofrer com a extinção e a biotecnologia surge como alternativa para sanar este problema, devido às novas técnicas de biologia molecular e genética. Dentre as técnicas biotecnológicas mais utilizadas, a cultura de plantas *in vitro* tem se destacado. Uma das grandes vantagens de se utilizar técnicas de cultura de tecidos é o grande potencial na obtenção de metabólitos secundários (KARUPPUSAMY, 2009).

A eliciação de compostos bioativos representa atualmente uma das técnicas de maior sucesso, consistindo em adicionar no meio de cultura um precursor ou ativador de metabolismo vegetal. Logo, o trabalho teve como principal objetivo o estudo de um método eficiente de obtenção de naftoquinonas utilizando elicitores *in vitro* e o estudo das aplicações farmacológicas de um metabólito secundário de ipê-roxo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IPÊ ROXO

A família Bignoniaceae é representada por cerca de 100 gêneros e 860 espécies (FISCHERFISCHER; THEISEN; LOHMANN, 2004), que estão distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, e principalmente na América do Sul (ZAPATER *et al.*, 2009). A distribuição do gênero *Handroanthus* é muito ampla, ocorre desde o México e Antilhas até o Norte da Argentina. Pertencem ao grupo ecológico das secundárias tardias e seu cultivo tem aumentado nos últimos anos, sendo empregado na arborização de ruas e parques. As suas espécies podem ser agrupadas, de acordo com a cor da flor que produzem, em: roxa, amarela, branca, rosa e verde (LORENZI, 2008).

Handroanthus impetiginosus é uma espécie pertencente a esta família conhecido como pau-d'arco ou ipê-roxo, chegando de 8 a 30m de altura e podendo alcançar de 60 a 100 cm de diâmetro à altura do peito (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Possui enorme interesse econômico nos setores madeireiros, ornamentais e medicinais. Sua madeira possui elevada resistência e com isso é empregada em marcenaria, construções pesadas e estruturas externas, tanto civis quanto navais. Além disso, dessa planta também são obtidos corantes para tingir a seda e o algodão (OLIVEIRA; SCHELEDER; FAVERO, 2008).

O ipê-roxo tem sido muito utilizado para a reconstituição de Reserva Legal e em programas de recuperação de áreas degradadas. Além disso, a espécie possui metabólitos secundários, principalmente o lapachol, uma naftoquinona de grande importância para a medicina no tratamento contra alguns tipos de câncer, lúpus, doença de Parkinson, psoríase e alergia, além de apresentar as atividades hipoglicemiante, depurativo, bactericida, antifúngico, diurético e adstringente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Estas naftoquinonas são extraídas do lenho, o que levou a um processo agressivo e danoso para a espécie (PIRES, 2014).

A árvore possui as folhas compostas folioladas; os folíolos coriáceos, pubescentes em ambas as faces, de 9,0 a 18,0 cm de comprimento por 4 a 10 cm de largura. As flores são infundibuliformes e numerosas, de coloração rósea ou arroxeadas e despontam em volumosas inflorescências em panícula sub-corimbiforme, com eixos ramificando dicotomicamente, grossos e cobertos por um indumento fulvo-claro. Flor

com pedicelo e cálice revestidos por indumento fulvo-claro; brácteas largas e fulvo-pilosas, geralmente pilosas; cálice campanulado de 5 a 8mm de comprimento; corola róseo-violácea a fauce-amarelada, de 6mm de comprimento (LORENZI, 2002). Seu tronco é reto, cilíndrico e raramente tortuoso, apresentando de 30 a 40 cm de diâmetro. Sua casca externa é grisácea, levemente áspera, com sulcos longitudinais pouco profundos e fissuras horizontais curtas e irregulares, desprendendo-se em escamas retangulares e grossas. A casca interna apresenta característica fibrosa, com tonalidade marrom-clara e levemente rosada, seu lenho tem porosidade difusa sem anéis de crescimento distintos (SCHNEIDER; SCHNEIDER; FINGER, 2000).

O ipê-roxo floresce entre maio e setembro e sua frutificação entre julho e novembro. Ocorre a queda das folhas, seguida da queda das pétalas ficando completamente nua. Após cerca de 10 dias ocorre à frutificação, mas não ocorre todos os anos; existem variações na floração e na frutificação e, às vezes, a árvore deixa de florescer por 1 ou 2 anos seguidos (LORENZI, 2002). As sementes são recalcitrantes ocorrendo perda de viabilidade em um período de tempo muito curto, dificultando o armazenamento destas e sua propagação natural.

2.2. NAFTOQUINONAS

O cenário mundial de doenças que se tornaram resistentes aos métodos convencionais é alarmante, fazendo-se necessário o estudo e a investigação de novos compostos capazes de combater os micro-organismos de forma eficiente. A busca por substâncias químicas naturais e derivadas surgem como uma alternativa viável para o lançamento de novos fármacos no mercado, com menos reações adversas quando comparado com os sintéticos (GONZÁLEZ et al., 2013).

O estudo de plantas com potencial biotecnológico tem se intensificado nos últimos anos devido à alta biodiversidade existente no território brasileiro. Os metabólitos secundários possuem ações importantes no interior do vegetal que possibilitam a sobrevivência em diversos ambientes. Estas substâncias bioativas são utilizadas pela medicina popular há séculos e podem contribuir com o meio científico na busca por novos medicamentos. (DE OLIVEIRA, 2015)

Uma das classes de metabólitos secundários mais estudados, atualmente, para fins farmacêuticos são as naftoquinonas. Caracterizam-se como pigmentos naturais que possuem em sua estrutura dois grupos carbonila nas posições 1,4 e menos

frequentemente nas posições 1,2 e 1,3 no anel naftaleno (LÓPEZ *et al.*, 2011). São comumente encontrados na natureza em plantas, fungos, bactérias e animais com grupos hidroxila e metila como substituintes, algumas famílias são referências na obtenção de naftoquinonas como: *Ebenaceae*, *Droseraceae*, *Bignoniaceae*, *Verbenaceae*, *Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Boraginaceae* (BRUNETON, 2001).

Estas espécies são amplamente utilizadas pela medicina popular de diversas localidades em chás para o tratamento de inúmeras enfermidades, podendo ser destaque para doenças parasitárias, vários tipos de câncer, atividades antibacteriana e antifúngica (DA SILVA *et al.*, 2013). Diversas naftoquinonas já foram elucidadas na ciência perante suas atividades como a lawsona, a juglona, a plumbagina, a lapacho, a alkalina e a shikona, sendo todas de origem vegetal.

As atividades biológicas das naftoquinonas são atribuídas à elevada capacidade de capturar um ou dois elétrons para formar seus derivados. Sua toxicidade é em geral atribuída pela geração de espécies reativas de oxigênio e a reação com macromoléculas, como DNA e proteína (BERGERON *et al.*, 2007). A atividade antiparasitária das naftoquinonas naturais e sintéticas é atribuída à formação de espécies reativas de oxigênio induzindo assim a peroxidação lipídica e alteração no transporte de elétrons comprometendo a respiração celular (FERREIRA *et al.*, 2006).

Trabalhos reportam que vias metabólicas importantes para a funcionalidade celular são afetadas pela interação destas moléculas com enzimas e proteínas estruturais. Alguns derivados de vitamina K (uma naftoquinona comercial) inibem as isoformas α e β da fosfatase CDC25 tornando comprometida a regulação do ciclo celular de células eucariontes cancerígenas (BRUN *et al.*, 2005).

As naftoquinonas interagem com ácidos nucleicos devido à parte 1,4-naftoquinona e acabam inibindo funções importantes como a replicação e a transcrição tornando a célula incapaz de realizar funções chave para sua sobrevivência, como a divisão celular e a expressão de genes. A identificação, caracterização e métodos alternativos de obtenção destas substâncias surgem como uma alternativa de grande potencial para novos tratamentos médicos e farmacêuticos. Atrelado a isso, o estudo dos mecanismos de ação destas moléculas podem gerar fármacos com elevado poder ação e seletividade para tratamentos de doenças de alta letalidade (LÓPEZ *et al.*, 2011).

2.3. LAPACHOL E DERIVADOS

A espécie do ipê-roxo é muito estudada pelas suas naftoquinonas encontradas no lenho. Diversas substâncias já foram isoladas deste gênero e entre elas estão listadas seis naftoquinonas e nove antraquinonas. Do primeiro grupo podemos citar as mais famosas como o lapachol, alfa-lapachona e beta-lapachona. O lapachol é caracterizado como uma hidroxinaftoquinona cuja nomenclatura oficial é 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenodiona. Foi descoberto e estudado por E. Paterno o qual fez sua extração da árvore argentina 'Lapacho' *Tabebuia avellanedae* Lor. (Bignoniaceae) Os estudos químicos também foram desenvolvidos por S.C. Hooker em 1892 e 1896 (DA CRUZ FONSECA; BRAGA; DE SANTANA, 2003).

Esta naftoquinona é obtida por extração ácido-base devido ao seu pKa utilizando uma solução altamente alcalina. O lapachol em sua forma ácida apresenta uma coloração amarelada e insolúvel em água, porém quando em meio alcalino forma cristais de cor avermelhada altamente solúvel em água facilitando sua extração. Já para a obtenção da β -lapachona utiliza-se ácido sulfúrico concentrado, gerando exclusivamente a substância (BARBOSA; NETO, 2013).

O ipê-roxo é muito utilizado na medicina popular devido aos efeitos terapêuticos de suas quinonas, especialmente as mencionadas anteriormente. Os indígenas e as populações locais utilizam o chá da casca como antimicrobiano, antitumoral, anti-inflamatório, cicatrizante e antitumoral, atividades estas que já foram comprovadas cientificamente e atribuídas ao lapachol e a β -lapachona (DE MORAIS *et al.*, 2005).

Os pontos de fusão são de 154 a 156 ° C e de 139 a 140 ° C para o lapachol e a β -lapachona, respectivamente, e são caracterizados como produtos naturais (ALVES *et al.*, 2008). O lapachol foi comercializado como medicamento pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco em comprimidos de 250 mg (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002), porém foram retirados do mercado recentemente devido aos poucos estudos sobre sua ação e toxicidade.

2.4. ATIVIDADES FARMACOLOGICAS

Diversas atividades do lapachol são descritas na literatura devido ao uso na medicina popular. Porém alguns autores atribuem as propriedades medicinais do ipê-roxo a um conjunto de substâncias encontradas na casca e entrecasca, naftoquinonas e antraquinonas, que trabalham em conjunto e não somente ao lapachol e a β -lapachona como é corriqueiramente proposto (DA CRUZ FONSECA; BRAGA; DE SANTANA, 2003).

Os primeiros estudos no Brasil realizados com estas moléculas bioativas foram testes anti-inflamatórios e analgésicos. Em pacientes que sofriam de cervites e cervicovaginites quando utilizado o lapachol foi significativamente igual ao grupo controle, porém não apresentou efeitos colaterais sendo mais vantajoso. Atrelado a isso, teve um índice de cura de 90% em casos de sinusite, otite, bursite e tendinite (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002).

Oswaldo Gonçalves de Lima foi um dos pioneiros no estudo do lapachol como antibiótico, observando uma maior atividade contra bactérias Gram-positivas e ácido-resistentes. Porém, obtiveram resultados peculiares quando a substância era purificada, a qual tinha sua atividade diminuída, demonstrando que o extrato do ipê-roxo era constituído de diversas naftoquinonas com atividade antimicrobiana (DA CRUZ FONSECA; BRAGA; DE SANTANA, 2003).

Segundo Moraes *et al.*, (2015), o extrato aquoso de ipê-roxo nas concentrações de 10 mg mL⁻¹ promoveu uma maior atividade angiogênica, vascularização, quando comparada com o controle neutro e negativo. Uma vez que o processo de cicatrização é relacionado com a vascularização local, estudos indicam que o extrato da espécie apresenta uma importante contribuição para a reparação de tecidos. Em camundongos foi possível a completa restauração do epitélio em feridas cutâneas em 14 dias (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; COELHO *et al.*, 2010).

A principal atividade atribuída ao lapachol e seus derivados é a antineoplásica. Em 1967 foram realizados os primeiros estudos contra o câncer utilizando o lapachol, demonstrando uma alta atividade sobre o Sarcoma de Yoshida, com uma porcentagem de inibição de 86% (SANTANA; SILVA, 1980). Apresenta ainda, algumas atividades antivirais contra vírus RNA, atuando principalmente sobre vírus envelopados e não envelopados nas concentrações de 5 a 10 μ g mL⁻¹. Estudos recentes feito com as

naftoquinonas do gênero *Handroanthus* demonstraram que elas não possuem atividades contra o vírus da dengue, apesar de terem diminuído o número viral em até uma unidade logarítmica (SILVEIRA, 2016).

O estudo de derivados de lapachol é de grande importância para a produção de novos medicamentos contra câncer e como cicatrizantes principalmente. Atrelado às técnicas de cultura de tecidos é possível obter estes compostos bioativos de forma sustentável e sem danos à espécie inserida no ambiente natural.

2.5. ELICIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A biotecnologia teve avanços significativos devido às novas técnicas de biologia molecular e genética. Dentre as técnicas biotecnológicas mais utilizadas, a cultura de plantas *in vitro* tem se destacado nas pesquisas. O princípio da cultura de tecidos vegetais é o conjunto de técnicas onde um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em meio nutritivo e asséptico (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

A totipotencialidade das células vegetais é uma característica que permite que qualquer célula possa sofrer desdiferenciação gerando um novo vegetal, aspecto utilizado na cultura *in vitro*, sendo que o meristema possivelmente apresenta os melhores resultados (VERDEIL et al., 2007).

Uma das grandes vantagens das técnicas de cultura de tecidos é o alto potencial na obtenção de metabólitos secundários, evitando a prática extrativista de plantas medicinais (KARUPPUSAMY, 2009). A obtenção de metabólitos secundários *in vitro* vem sendo estudados em diferentes sistemas biológicos com o intuito de tomar conhecimento sobre sua atividade e potencial de aplicação (SOKMEN et al., 2004).

Muitas estratégias podem ser utilizadas para induzir ou aumentar a produção de metabólitos secundários. Uma das maneiras mais efetivas, em muitos casos, é a adição de compostos precursores ou intermediários ao meio de cultivo celular (SILVESTRINI et al., 2002). Outra estratégia é a eliciação de células, uma das técnicas de maior sucesso. A eliciação é importante para a cultura de tecidos vegetais, sendo essa técnica essencial para muitas espécies comerciais. Estes compostos desempenham funções importantes na adaptação das plantas ao ambiente e também de interesse biotecnológico, como o uso em antibióticos, antifúngicos e antivirais (FUMAGALI et al., 2008).

O uso da eliciação de células para induzir e aumentar a produção de metabólitos secundários de interesse comercial tem sido descrito em diversos trabalhos e pode gerar produtos biotecnológicos de alto interesse comercial (WANG; ZHONG, 2002; DONG; ZHONG, 2001; LEE; SHULER, 2000).

2.6. BIORREATORES

Os biorreatores são utilizados basicamente para que a produção atinja o nível de “commodities”. Este processo é baseado no aumento de escala, saindo de volumes extremamente pequenos (laboratorial) para industriais. Estes equipamentos facilitam a produção de proteínas, compostos bioativos, hormônios, medicamentos, entre outros, de forma mais rentável e em um curto espaço.

O aumento de escala é tido como fase final do processo de obtenção dos metabólitos secundários, porém quando colocamos estas células em grandes tanques sob forte agitação é que surgem os problemas. A transferência de massa do oxigênio e dos nutrientes é a principal causa de modificação no crescimento celular quando utilizadas em biorreatores de alto volume, cujo aumento de biomassa se mantém como ponto crítico para a produtividade (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Segundo Preil e Beck (1991), foi a partir de fermentadores utilizados para cultivo de microrganismo em escala industrial que surgiram os primeiros biorreatores para células vegetais. Os tanques para produção de embriões e brotos sofreram melhorias consideráveis como a presença de sensores para monitoramento da temperatura, da velocidade de agitação do meio líquido, do pH, do oxigênio dissolvido, do potencial de oxirredução e do dióxido de carbono.

Os biorreatores para produção de células vegetais podem ser divididos em dois, segundo o tipo de imersão. Os de imersão permanente, onde o material líquido cobre o explante durante todo o processo, é o método é mais utilizado para o cultivo de células e não para plantas propriamente ditas. O de imersão temporária, ou seja, o líquido fica em contato com o explante por tempo determinado pelo experimentador, bastante utilizado para a produção de plantas e micropropagação. Arelado a isso, o modo de agitação pode ser por fluxo de ar ou agitação mecânica, este último com um cuidado especial para não danificar as células (RIBEIRO; BASTOS, 2008).

Uma das principais vantagens da utilização dos biorreatores é a possibilidade de renovação do ar e dos nutrientes durante todo o processo de cultivo, resultando no

crescimento acelerado de células na manutenção do metabolismo. Os tanques monitorados por computação também facilitam a produção em larga escala, reduzindo a mão de obra especializada e conseguindo mínimas variações de pH, de temperatura e de aeração no processo, com aumento do rendimento (RIBEIRO; BASTOS, 2008).

Os biorreatores surgem então como uma ferramenta para a produção em larga escala de compostos de interesse humano e não só para a multiplicação vegetal. A obtenção de metabólitos secundários em altos volumes ainda é pouco estudada, porém os avanços nessa área são de extrema importância para evitar os processos extrativistas danosos ao ambiente e diminuir o espaço de produção demandado para o plantio desses vegetais.

3. JUSTIFICATIVA

A procura por produtos biotecnológicos voltados para área da saúde tem crescido muito nas últimas décadas. Consequentemente ocorre um aumento nas pesquisas sobre espécies vegetais com o intuito de descobrir ou aumentar a produção de substâncias para usos farmacológicos.

O ipê-roxo é uma espécie nativa do cerrado muito utilizada como planta ornamental e medicinal, possuindo metabólitos secundário como lapachol, muito empregado como analgésico e para auxiliar no tratamento de câncer. No entanto, essa substância é extraída do lenho do vegetal em questão, ocorrendo um processo extrativista severo, contribuindo para o desmatamento e extinção da espécie.

Portanto, para que esta molécula biotiva possa ser mais bem estudada e possivelmente utilizada como medicamento, a eliciação de metabólitos secundários em material vegetal proveniente de *Handroanthus impetiginosus* demonstra potencial para a produção biotecnológica deste composto, bem como seus derivados.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Obtenção de um protocolo de indução de naftoquinonas *in vitro* em explantes de *Handroanthus impetiginosus*

REFERÊNCIAS

ALVES, Geisiane Maria Cavalcante et al. Purificação e caracterização da β -Lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 413-416, 2008.

ARAÚJO, Evani L.; ALENCAR, João Rui B.; ROLIM NETO, Pedro J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57-59, 2002.

BALBINO, Carlos Aberto; PEREIRA, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BARBOSA, Ticiano Pereira; NETO, Hermes Diniz. Preparação de derivados do Lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de Química Orgânica Experimental. **Quim. Nova**, v. 36, n. 2, p. S1, 2013.

BERGERON, François et al. Near-UV photolysis of 2-methyl-1, 4-naphthoquinone–DNA duplexes: Characterization of reversible and stable interstrand cross-links between quinone and adenine moieties. **Chemical research in toxicology**, v. 20, n. 5, p. 745-756, 2007.

BRUN, Marie-Priscille et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives with CDC25 phosphatase inhibitory activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 16, p. 4871-4879, 2005.

BRUNETON, Jean. **Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales**. 2001.

COELHO, Julice Medeiros et al. Effects of silver sulfadiazine, ipê roxo (tabebuia avellanadae) extract and barbatimão (stryphnodendron adstringens) extract on cutaneous wound healing in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 045-051, 2010.

DA CRUZ FONSECA, Said Gonçalves; BRAGA, Rossana Maria Carvalho; DE SANTANA, Davi Pereira. Lapachol–química, farmacologia e métodos de dosagem. **Rev. Bras. Farm.**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

DA SILVA, Ana Maria Pereira et al. Atividade biológica de naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 7, n. 04, p. 207-215, 2013

DE OLIVEIRA, Luciana Santos et al. Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da reserva biológica do tinguá, RJ, Brasil–metabólitos secundários e aspectos farmacológicos. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 17, 2015.

DE MORAIS, Selene Maia et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

DE OLIVEIRA, Taiane Pires de Freitas et al. Efeito do ácido indol-3-butírico (aib) no enraizamento de miniestacas de Ipê-Roxo (*Handroanthus heptaphyllus* Mattos). **Ciência Florestal**, v. 25, n. 4, p. 1043-1051, 2015.

DONG, Hao-Di; ZHONG, Jian-Jiang. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. **Biochemical engineering journal**, v. 8, n. 2, p. 145-150, 2001.

FERREIRA, Ronize A. et al. Toxoplasma gondii: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1, 4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. **Experimental parasitology**, v. 113, n. 2, p. 125-129, 2006.

FISCHER, E.; THEISEN, I.; LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. In: Kubitzki, k. & Kadereit, J. W. (orgs). The families and genera of vascular plants. **Heidelberg**, v v. 7, p. 9-98. 2004.

FUMAGALI, Elisângela 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**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GONZÁLEZ, Rosa Nelly Cantú et al. Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapêuticas. **Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, v. 14, n. 2, p. 48-56, 2013.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, 2009

LEE, Carolyn WT; SHULER, Michael L. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. **Biotechnology and bioengineering**, v. 67, n. 1, p. 61-71, 2000.

LÓPEZ, L. et al. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. **Revista mexicana de ciencias farmacéuticas**, v. 42, n. 1, p. 6-17, 2011.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, v. 1. Ed. 5. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, 384p. 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: **Editora Plantarum**, 2002. v.1, p.66.

MORAES, Paulo Sávio Paim de et al. **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DA *Tabebuia impetiginosa* (Ipê roxo)**. 2015.

- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- OLIVEIRA, A. K. M. de; SCHELEDER, E. J. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex. DC.) Standl. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.32, n.6, p.1011-1018, 2008.
- PIRES, Tânia CSP. Comparação da bioatividade do entrecasco e diferentes formulações de pau d'arco (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). 2014. **Tese de Doutorado**.
- PREIL, W.; BECK, A. Somatic embryogenesis in bioreactor culture. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 289, p. 179-192, 1991.
- RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.
- SANTANA, C. F.; SILVA, A. A. F. Primeiras observações com o emprego de Lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 1, p. 20-61, 1980.
- SCHNEIDER, P. S. P.; SCHNEIDER, P. R.; FINGER, C. A. G. **Crescimento do Ipê-Roxo, *Tabebuia Impetiginosa* Martius Ex A. P. De Candolle**, na depressão central do estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 91100, 2000.
- SILVEIRA, Paola Faria da. Análise da atividade antiviral de compostos derivados de naftoquinonas naturais e sintéticas sobre a replicação de Dengue vírus em modelo in vitro. 2016. 52 f. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.
- SILVESTRINI, Andrea et al. Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 749-753, 2002.
- SOKMEN, M. et al. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3309-3312, 2004.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1. ed. Brasília: **Embrapa**, v. 1, 1998.
- VERDEIL, J. L. et al. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: Dependence versus autonomy? **Trends Plant Sci.**, v. 12, p. 245-252, 2007.
- WANG, Zhen-Yu; ZHONG, Jian-Jiang. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 2, p. 93-97, 2002.
- ZAPATER, Maria A. et al. Las especies nativas y exóticas de *Tabebuia* y *Handroanthus* (Tecomeae, Bignoniaceae) en Argentina. **Darwiniana, nueva serie**, v. 47, n. 1, p. 185-220, 2009.

CAPITULO 1 – ARTIGO 1

Obtenção de naftoquinonas no cultivo *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* (Mart, ex DC.) Mattos.

*Gabriel Chiari^a (chiarigabriel@hotmail.com), Giovana Esteves^a (gii.esteves@hotmail.com), Breno Régis Santos^a (Brenors@yahoo.com.br).

a- Universidade Federal de Alfenas, Alfenas/Minas Gerais, Brasil

Resumo

O lapachol é a principal naftoquinona da espécie *Handroanthus impetiginosus* cuja as atividades biológicas foram confirmadas pela ciência como anti-inflamatórios, analgésicos, antibióticos, antifúngicos e antineoplásicos. Este trabalho teve como objetivo o estudo de um método de obtenção de naftoquinonas de ipê-roxo *in vitro* e o estudo de suas aplicações farmacológicas. Sementes de ipê-roxo foram germinadas em meio MS e segmentos caulinares de 1 cm foram extraídos e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, em dois tratamentos com 4 mg L⁻¹ do elicitor1 e do elitor2. Novos segmentos caulinares foram inoculados em biorreatores contendo 50 mL e 500 mL de meio MS suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose 4 mg L⁻¹ do elicitor1. Após isso, o meio de cultura fora liofilizado e posteriormente macerado, obtendo-se um pó semi-fino, para as análises dos perfis moleculares foi utilizando um equipamento MALDI-TOF MS onde foi aplicado 1 µL de matriz α-CHCA em poços individuais de uma placa de aço livres ou onde 1 µL das amostras haviam sido depositados. A análise antimicrobiana foi avaliada por difusão em ágar. A atividade citotóxica foi realizada utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e sal de MTT com leitura em espectrofotomtrico de microplacas a 560 nm (Zenit), os dados foram analisados usando regressão linear para obter valores de CC₅₀ / IC₅₀. A média dos elicitores foi considerada diferente de acordo com teste T-Studenty a 95% de significância, sendo o elicitor 1 mais eficiente com média de 1,90. As análises de MALDI-TOF demonstraram altas possibilidades de o extrato conter lapachol em sua composição. O composto não apresentou atividade antimicrobiana, porém o resultado para a IC₅₀ foi de 147,1833 µg mL⁻¹ demonstrando ser satisfatório para posteriores análises em células cancerígenas.

Palavras-chave: Lapachol; Cultura de tecidos; Elicitor; Citotoxicidade; ipê-roxo.

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é conhecido como uma das maiores savanas do mundo e encontra-se entre os biomas prioritários para a conservação da biodiversidade em nível global devido à rápida destruição que ameaça sua elevada riqueza biológica (MYERS *et al.*, 2000; SILVA e BATES, 2002).

Handroanthus impetiginosus (Mart. Ex DC) Mattos pertence à família das Bignoniaceae e é uma espécie arbórea encontrada principalmente em áreas de cerrado, fazendo parte da vegetação nativa do centro-oeste brasileiro. Esta espécie é popularmente conhecida como ipê-roxo e desperta interesse econômico devido às diversas aplicações para a sociedade (LIMA *et al.*, 2014).

A família Bignoniaceae é cientificamente conhecida pelas naftoquinonas que produzem. Estes metabólitos secundários merecem uma atenção especial devido às inúmeras atividades biológicas já confirmadas pela ciência: como anti-inflamatórios, analgésicos, antibióticos, antifúngicos e antineoplásicos. (DA SILVA *et al.*, 2013). O lapachol e a β -lapachona (Figura 1), são as naftoquinonas mais conhecidas entre os gêneros desta família de plantas e, conseqüentemente, as mais estudadas.

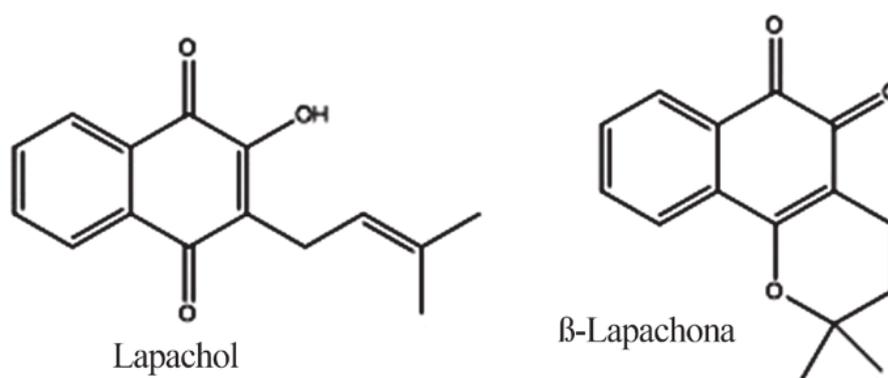


Figura 1: Estrutura química do lapachol e da β -lapachona (WISINTAINER *et al.*, 2014).

No entanto, a extração destas naftoquinonas ocorre do lenho da planta, o que gera morte do indivíduo. A maioria das plantas produz quantidades pequenas de compostos bioativos, e sua produção só ocorre em certas circunstâncias de estresse. Na cultura de tecidos vegetais, os elicitores bióticos e abióticos podem ser utilizados para estimular a biossíntese do metabólito secundário em calos/tecidos. Diversos estudos na

literatura científica confirmaram que a acumulação de diferentes metabólitos secundários pode ser eficientemente induzida pela aplicação de elicitores (GUPTA *et al.*, 2015).

Este mecanismo de obtenção *in vitro* acaba gerando um produto mais fácil de purificar e comercializar como fármacos e/ou produtos naturais. Além disso, este método contribui para a conservação das espécies de ipê, principalmente o roxo, uma vez que necessita somente de suas sementes.

Com isso, este trabalho teve como objetivo o estudo de um método de obtenção de naftoquinonas de *Handroanthus impetiginosus* utilizando elicitores *in vitro* e o estudo de suas atividades biológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Sementes de Ipê-Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) foram coletadas na localização 21°25'20.4"S 45°56'55.9"W nos períodos de setembro a outubro de 2017 foram lavadas em água corrente por 1 min e desinfestadas em etanol 70% por 1 min e hipoclorito de sódio 2,5% por 5 min, após este processo os explantes foram lavados três vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS sem sacarose autoclavado a 1 atm e 120° C por 20 min. Posteriormente os tubos foram colocados em sala de crescimento a 25° C e fotoperíodo de 8 h de escuro e 16 h de claro por 20 dias.

2.2. ELICIAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Segmentos caulinares extraídos de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* estabelecidas *in vitro* foram utilizados como explantes. Estes, com 1 cm, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, em dois tratamentos com 4 mg L⁻¹ do elicitador 1 e do elicitador 2. O controle foi realizado sem adição dos compostos químicos. O meio foi solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120° C, durante 20 min. Após a inoculação na câmara de fluxo laminar, o material foi mantido em sala de crescimento a 27±2° C de temperatura e ausência de luz. Após 30 dias de cultivo os tubos foram

analisados quanto à presença de coloração e os dados seguidos para a análise estatística em software R (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013) . Foram realizados 20 repetições para cada tratamento.

2.3. BIORREATOR

Novos segmentos caulinares foram usados para o aumento de escala. Estes, também com 1 cm, foram inoculados em biorreatores contendo 50 mL e 500 mL de meio MS suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 mg L⁻¹ do elicitor 1. O meio teve seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120° C, durante 20 min. Após inoculação na câmara de fluxo laminar, os biorreatores contendo 50 mL foram mantidos no escuro em agitação utilizando shaker a 27±2° C de temperatura, e os de 500 mL foram agitados utilizando uma bomba de ar IPX4 de 1,1 W e 127 V ligado a uma pipeta de 5 mL em contato com o meio de cultura, uma vez que o ar era esterilizado através de um filtro de seringa milipore de 0,22 µm. Após 30 dias de cultivo os tubos foram analisados quanto à coloração, que neste caso evidenciou a produção dos metabólitos secundários.

2.4. OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS

O meio de cultura dos biorreatores foram liofilizadas e posteriormente maceradas, obtendo-se um pó semi-fino, que foi estocado para utilização na medida em que foram feitos os testes descritos em 2.5, 2.6 e 2.7.

2.5. ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSAS

As análises dos perfis moleculares foram realizadas utilizando um equipamento comercial AutoFlex Speed MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemanha) com um laser de nitrogênio (337 nm) utilizando calibração externa (íons de matriz α -CHCA em 190,04 e 379,09 *m/z*) em modo refletido positivo na faixa de *m/z* 100 a 1000, com 100 disparos do laser por ponto (2000 disparos por espectro). Foi aplicado 1 µL de matriz α -CHCA (10 mg mL⁻¹ de α -CHCA em 70:30 ACN-0,5% TFA aq.) em poços individuais de uma placa de aço (MTP 384, Bruker Daltonics) livres ou onde 1 µL das

amostras haviam sido depositados. A matriz depositada foi secada à temperatura ambiente antes das análises por MALDI-TOF MS.

2.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O extrato foi testado contra as seguintes linhagens: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231 mantidas no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG. A atividade antimicrobiana foi avaliada por difusão em ágar segundo metodologia definida nos documentos M7A6 (Clinicaland Laboratory Standards Institute - CLSI 2003) para bactérias, com ligeiras modificações. Para as linhagens bacterianas serão utilizados o Ágar Mueller Hinton e para as leveduras o Ágar Mueller Hinton adicionado de 2% de glicose. O ágar será perfurado com tubo metálico para obtenção de poços de aproximadamente 4 mm de diâmetro. A suspensão de microrganismos foram inoculados na superfície do meio de cultura, após padronização em solução salina com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland para as bactérias e tubo 1,0 para as leveduras. O extrato do Ipê-Roxo foi dissolvido em água destilada nas concentrações de 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 mg mL⁻¹ e em seguida, filtrados em membrana Millipore (0,45 µm de diâmetro de poro) e colocados nos poços juntamente com os controles positivo (solução de clorexidina a 0,12%) e negativo (água destilada e caldo Casoy).

As placas foram incubadas a 37° C por 24 h. Após este processo, foi feita a leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano em volta dos poços com o auxílio de uma régua.

2.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

A citotoxicidade do extrato de ipê-roxo foi realizada nas concentrações de 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,90, 1,95, e 0,98 µg mL⁻¹ usando 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas pela passagem do sangue heparinizado em solução Histopaque (Sigma-Aldrich). As PBMC foram ressuspensas na concentração de 1,5 x 10⁶ mL⁻¹ em RPMI 1640 contendo 1,6% de L-glutamina (estoque de 200 mM) e 3% de uma mistura de antibiótico e 5% de soro humano normal inativado e foram

adicionados 100 μL da suspensão celular em cada poço contendo o composto de teste a diferentes concentrações, incubadas a 37° C numa incubadora a 5% de CO_2 por 48 h em placa de 96 poços de fundo chato estéreis. Após o período de incubação, foram adicionados 10 μL de corante MTT (1 mg mL^{-1}) e as células foram incubadas novamente por um período adicional de 4 h. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido e adicionado a 100 μL de DMSO para solubilização de cristais de formazan. As placas foram agitadas durante 5 min e a absorbância de cada amostra foi medida num leitor espectrofotométrico de microplacas a 560 nm (Zenit). A porcentagem de citotoxicidade foi calculada como $[(A-B)^{-A} \times 100]$, onde A e B são as absorbâncias das células controle e tratadas, respectivamente. Os dados foram analisados usando regressão linear para obter valores para CC_{50} (concentração citotóxica para 50%). Os índices de seletividade foram expressos como a razão $\text{CC}_{50} / \text{IC}_{50}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o crescimento dos seguimentos caulinares foi possível observar que os metabólitos secundários foram sendo excretados no meio de cultura, podendo ser observado ao longo do cultivo à mudança na coloração do ágar para amarelo, cor característica do lapachol. Os explantes não induziram nenhuma brotação, raiz ou indução de calos, foi observada somente a indução das substâncias e com isso foi possível classificar todas as repetições de ambos os tratamentos adotando uma escala que variou de 0 a 3.

A análise estatística realizada pelo teste de T-student com 95% de significância mostrou que as médias foram consideradas diferentes entre si analisando o p-valor de 7,688e-05, rejeitando então a hipótese nula (Tabela 1). Todos os tratamentos também diferiram do controle, uma vez que não houve indução na produção dos metabólitos.

Tabela 1: Médias dos tratamentos e p-valor referentes ao controle, elicitor1 e elicitor2

Tratamentos	Médias	p-valor
Controle	0 ^c	
Elicitor1	1,90 ^a	7,688e-05
Elicitor2	0,75 ^b	

Com isso, foi possível construir o gráfico de BoxPlot (Figura 2) para melhor visualização das diferenças entre os tratamentos.

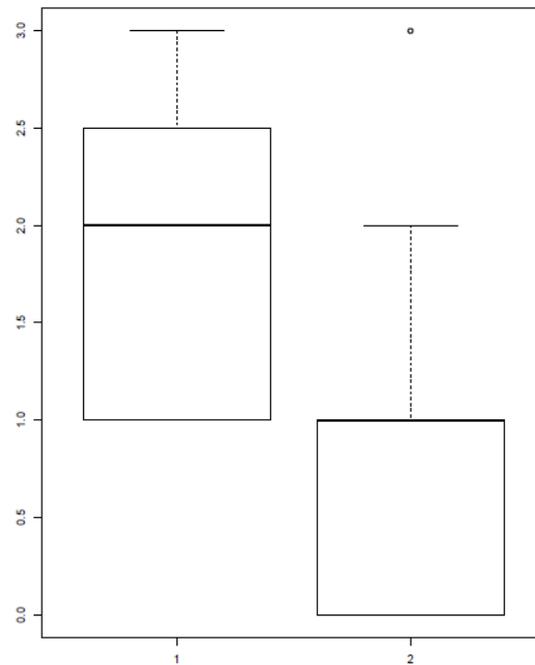


Figura 2: BoxPlot onde no eixo x são os elicitador1 e elicitador2 e no eixo y a coloração.

O elicitador mais eficiente foi testado no aumento de escala em biorreator sendo eficiente na produção dos metabólitos como mostra a figura 2. Foi possível a obtenção de quantidades mais elevadas destes compostos e com maior pureza, uma vez que o ágar não interferiu na composição do meio de cultura. Após a liofilização em um frasco de 50 ml, de meio de cultura, foi possível obter uma média de 2 g de pó fino.

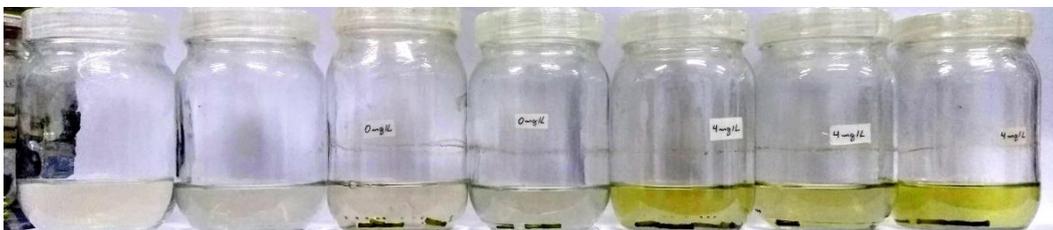


Figura 3: Diferença observada com relação à coloração dos meios de cultura, onde os dois primeiros potes estão com meio e sem explante, os dois seguintes estão com meio e explante, mas sem o elicitador1 e os três últimos contendo meio, explante e elicitador1.

Uma das hipóteses levantadas neste trabalho sugere que o elicitor1 modificou a rota metabólica do explante inoculado. Quando observamos as rotas metabólicas do ácido chiquimico, a sacarose participa em segundo plano. Na via da glicólise a sacarose é transformada em D-gliceraldeido-3-P, paralelamente a isso o elicitor1, atuou como precursor e agiu deslocando o equilíbrio químico para formação de compostos fenólicos (antraquinonas e naftoquinonas), logo o vegetal começa a transformar o D-gliceraldeido-3P em D-eritrose-4P. A D-eritrose-4P então é usada juntamente com o elicitor1 para formação de derivados de lapachol e β -lapachona (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O mesmo resultado foi obtido por Chen *et al.* (2014) utilizando NaCl como eliciador de compostos fenólicos. O autor conseguiu dois picos de produção destes compostos em duas concentrações de sal, 25 e 175 mM, o qual observou um aumento de quercetina na dose mais baixa e de kaempferol na maior dose de NaCl. Milech (2016) utilizando outros compostos químicos como elicitores de betacianinas e flavonoides obteve também resultados positivos. O autor utilizando calos de *Alternanthera sessilis* verificou que a qualidade de luz azul associada ao regulador de crescimento Benzilaminopurina (BAP) foi capaz de incrementar a produção dos compostos alvo.

Com a realização do MALDI-TOF foi possível obter os espectros de massas do extrato e sugerir as principais moléculas encontradas, como mostra a figura 5 e a tabela 2.

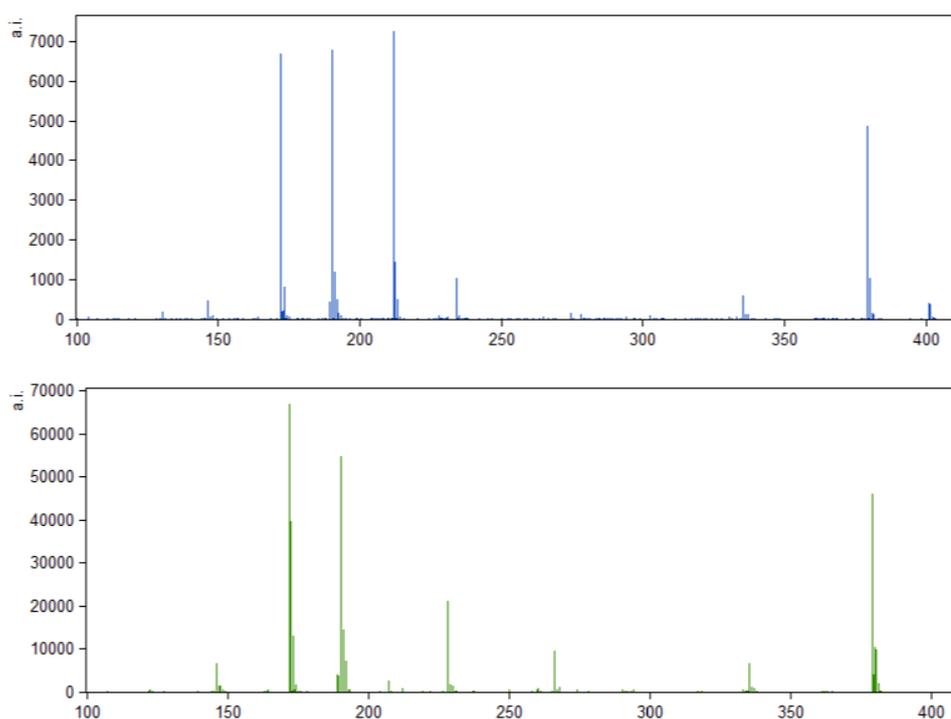


Figura 4: Gráficos obtidos no espectrofotometro de massas (MALDI-TOF) onde o eixo Y é a absorbância e o eixo X é a massa m/z. O primeiro gráfico representa a matriz (a-CHCA) e o segundo gráfico representa o extrato tratado com a matriz.

Tabela 2: Substâncias sugeridas pela análise de MALDI-TOF.

[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	Estrutura sugerida
207	-----	Flaviolin
-----	265	Lapachol
294	-----	Lycoranine A
335	-----	8-Hydroxyquercetagenin
453	-----	Dihydroquercetin-3-xiloside
492	-----	2,5-bis-(4-hydroxybenzoyl)-3,4-bis-(4-Hydroxyphenyl)-1H-pyrrole
524	-----	Jadomycin S
568	-----	Amidepsine E

Com esta análise não é possível afirmar com 100% de certeza a real molécula existente, pois esta técnica é utilizada para moléculas grandes como proteínas e peptídeos (DE MELO, 2014). Porém foi possível supormos a existência de oito substâncias diferentes no extrato obtido neste trabalho. A molécula sugerida de maior importância foi o lapachol, cujo pico foi de 265 m/z demonstrando que o extrato de ipê-roxo obtido *in vitro* utilizando o elicitador1 possui grandes possibilidades de conter a molécula.

Os testes antimicrobianos foram realizados seguindo protocolo do CLSI (2003), porém para o composto obtido *in vitro* não obteve atividade contra os microrganismos testados. Neste trabalho foi testado apenas duas bactérias, uma Gram-negativa e uma Gram-positiva, e uma levedura, não descartando as possíveis atividades contra outras bactérias.

Estudo realizado com lapachol e alguns de seus derivados demonstrou que houve atividade somente contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginos*. O lapachol teve um halo de inibição de 11 mm a uma concentração de 200 µg mL⁻¹, porém seu derivado β-nor-lapachona se mostrou mais eficiente uma vez que obteve de 20 e 19 mm de inibição para as bactérias respectivamente (ANTUNES, 2006).

Na literatura a ação do lapachol como antimicrobiano é questionável, alguns autores afirmam ter atividade contra bactérias gram-negativas e outros concluem que o composto não possui nenhum tipo de ação. Da Cruz Fonseca *et al.*, (2003) demonstraram em seu trabalho que houve uma discrepância de resultados diante de alguns microrganismos sendo atribuídas a metodologias diferentes, tanto de extração quanto de purificação dos compostos. Os autores concluíram que o lapachol não possui atividade contra *S. pyogenes*, *Sh. paradysenteriae*, *E. coli*, *C. pseudotropicalis*, *Pr. vulgaris*, *Pr. morgani*, *Gib. fugikuvoyi*, *Pen. vilacuinum*, *Gest. candidum*, *Asp. niger* e *Fus. lycopersis*.

Todavia, quando partimos para a análise principal do lapachol como substância citotóxica para células humanas e possível utilização anticarcinogênica o obtido neste experimento se mostrou promissor. Quando transformamos os valores de absorbância para porcentagem, verificamos que na concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ houve uma morte de cerca de 44% de todas as células e na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, 25% das células morreram. Pelos dados de porcentagem obtidos foi possível a construção de um gráfico de citotoxicidade (Figura 4) e assim encontrar a equação da reta para calcular a IC50.

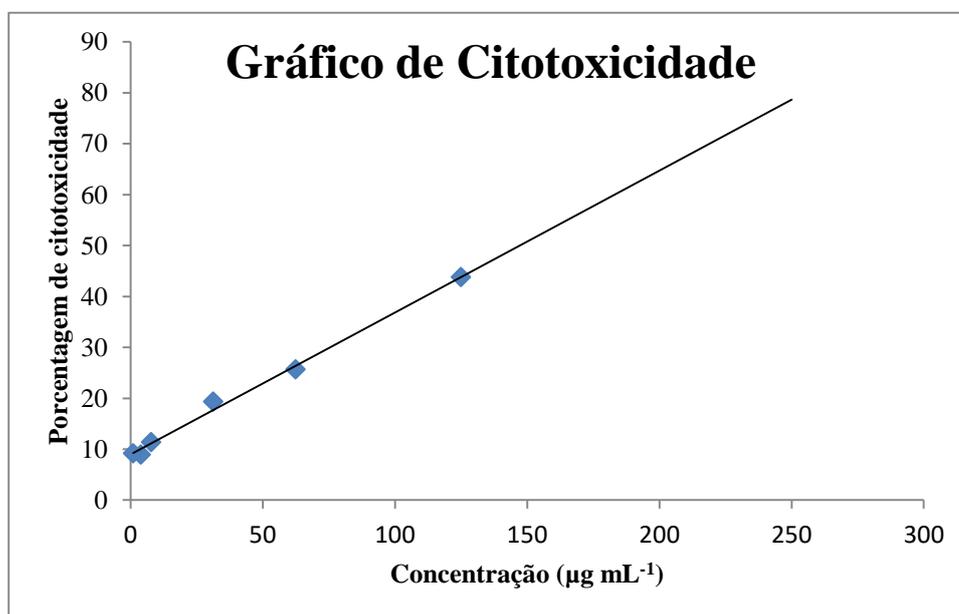


Figura 5: Gráfico utilizado para obtenção da IC50.

Com a equação da reta $Y = 0,2788x + 8,9653$ e $R^2 = 0,995$, foi possível encontrar que a concentração necessária para matar 50% das células humanas testadas é de $147,1833 \mu\text{g mL}^{-1}$. Isto demonstra claramente que este metabolito de ipê-roxo possui grande potencial contra células cancerígenas, uma vez que possui ação citotóxica e

grande potencial para gerar um fármaco, pois a concentração é tida como mediana tendo a possibilidade de ser utilizada em mais de uma dose pelo paciente.

Diversos autores sugerem que a ação do lapachol e seus derivados agem principalmente interferindo na função normal da enzima topoisomerase 2, comprometendo os processos de replicação e empacotamento do DNA. Cunha *et al.*, (2006) demonstraram em seus experimentos que apenas 2 μM de derivados de lapachol foram suficientes para impedir significativamente a atividade desta enzima (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007; KRISHNAN; BASTOW, 2000).

Sunasse *et al.* (2013) concluiu que a β -lapachona obteve cerca que quinze mais citotoxicidade do que o lapachol, com valores de IC_{50} de 1,6 e 24,1 μM respectivamente. Não obstante, quando comparado com a cisplatina que é o medicamento mais utilizado para tratamento de câncer atualmente. A β -lapachona foi dezesseis vezes mais citotóxica com IC_{50} de 1,6 μM , demonstrando que o lapachol e seus derivados tem grande potencial para serem usados como fármacos anticancerígenos.

O lapachol quando utilizado em animais apresentou uma toxicidade aguda (DL_{50}) em torno de 1600 mg Kg^{-1} em ratos, o que é considerado moderado quando comparado com outras drogas usuais, enquanto que a β -lapachona teve dose letal em 80 mg Kg^{-1} . A utilização desta substância em ratos causou alguns efeitos colaterais como depressão do sistema nervoso central, exaustão física, dificuldades respiratórias, por provável anemia hemolítica, sugerida pelo achado de depósito de ferro livre no fígado, bilirrubina urinária, normoblastose e trombocitopenia (ARAÚJO *et al.*, 2002). Pouco se sabe sobre a utilização e efeito destas substâncias no organismo humano, fazendo-se necessários mais estudos principalmente sobre suas toxicidades.

4. CONCLUSÃO

Considerando o que foi descrito no trabalho o elicitor1 foi eficiente para induzir os explantes a produzirem o metabólito secundário e o explante reagiu positivamente no aumento de escala, possibilitando a obtenção de altos rendimentos da substância. As análises de MALDI-TOF demonstraram altas possibilidades do extrato conter lapachol em sua composição, demonstrando grande avanço na produção da molécula. O composto não apresentou atividade antimicrobiana, porém obteve ação citotóxica e o resultado para a IC_{50} foi de 147,1833 $\mu\text{g mL}^{-1}$ demonstrando ser satisfatório para posteriores análises em células cancerígenas, atribuindo então um potencial

farmacológico. Com os testes realizados em biorreator, o explante mesmo em condições de aumento de escala, 500 mL, produziu o metabólito secundário de forma eficiente e sem contaminação. Todos esses testes demonstraram que este trabalho conseguiu um protocolo com resultados satisfatórios para a produção de compostos bioativos de ipê-roxo, em especial o lapachol, e sua produção em larga escala.

REFERENCIAS

- ANTUNES, Rossana Miranda Pessoa et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes, v. 16(4), p. 517-524, Out./Dez. 2006
- ARAÚJO, Evani L.; ALENCAR, João Rui B.; ROLIM NETO, Pedro J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57-59, 2002.
- CHEN, Ying et al. Effect of varying NaCl doses on flavonoid production in suspension cells of Ginkgo biloba: relationship to chlorophyll fluorescence, ion homeostasis, antioxidant system and ultrastructure. **Acta physiologiae plantarum**, v. 36, n. 12, p. 3173-3187, 2014.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3(28). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA.
- CUNHA, A S et. al. Synthesis of novel naphthoquinone-spermidine conjugates and their effects on DNA-topoisomerases I and II-a. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. São Paulo, v. 17, n. 3, p. 439-442, jun. 2006.
- DA CRUZ FONSECA, Said Gonçalves; BRAGA, Rossana Maria Carvalho; DE SANTANA, Davi Pereira. Lapachol—química, farmacologia e métodos de dosagem. **Rev. Bras. Farm.**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.
- DA SILVA, Ana Maria Pereira et al. Atividade biológica de naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 7, n. 04, p. 207-215, 2013.
- DE MELO, Livia Freitas. A utilização da espectrofotometria de massa MALDI-TOF na identificação de microrganismos no controle de qualidade farmacêutico. Tese de especialização, 2014.
- ESTEVES-SOUZA, A et. al. Cytotoxic and DnA-topoisomerase effects of Lapachol amine derivates and interactions with DNA. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 10, p. 1399-1402, jul. 2007.
- FERREIRA, E. B., CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A. (2013). ExpDes.pt : Experimental Designs package (Portuguese). R package version 1.1.2.
- GUPTA, Pratibha; SHARMA, Satyawati; SAXENA, Sanjay. Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of Stevia rebaudiana treated with proline and polyethylene glycol. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 863-874, 2015.
- KRISHNAN, P; BASTOW, K F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivates-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 60, n. 9, p. 1367-1379, nov. 2000.

LIMA, Paulo Ricardo et al. Avaliação morfofisiológica em mudas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos durante a rustificação. **Floresta e Ambiente, Rio de Janeiro**, v. 21, n. 3, p. 316-326, 2014.

MILECH, Cristini. Compostos bioativos induzidos por elicitores em *Alternanthera sessilis*. 2016, 80f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – **Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal**, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunological Methods** v. 65, p. 55-63, 1983.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G.A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

PIRES, Tânia CSP. Comparação da bioatividade do entrecasco e diferentes formulações de pau d'arco (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). 2014. **Tese de Doutorado**.

SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a Tropical Savanna Hotspot. **BioScience**, Washington, D.C., v. 52, n. 3, p. 225-233, 2002.

SUNASSEE, Suthananda N. et al. Cytotoxicity of Lapachol, β -lapachone and related synthetic 1, 4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European journal of medicinal chemistry**, v. 62, p. 98-110, 2013.

TAIZ, LINCOLN; ZEIGER, EDUARDO. Metabólitos secundários e defesa vegetal. **Fisiologia vegetal**, v. 3, p. 309-344, 2004.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1. ed. Brasília: **Embrapa**, v. 1, 1998.

WISINTAINER, Gabrielle GNS et al. Biflorin: an o-naphthoquinone of clinical significance. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1907-1914, 2014.