

Quantificação de flavonóides em culturas *in vitro* de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae)

José Alexandre de Godoy Machado¹, Leandro Vieira Astarita² e Eliane Romanato Santarém³

Introdução

Hypericum perforatum L. (Hypericaceae) é uma espécie herbácea perene, conhecida desde a Idade Média por suas propriedades cicatrizante e antiinflamatória [1]. Nos últimos anos, esta espécie tem sido extensivamente estudada na sua utilização no tratamento de disfunções neurológicas, como casos de depressão leve a moderada [2]. Recentemente, foi relatado que os extratos de hipérico poderiam apresentar atividade inibidora do crescimento de células neoplásicas [3]. A maior classe de compostos secundários do metabolismo identificada nesta espécie é constituída pelos flavonóides. Entre os flavonóides presentes encontram-se a quercetina, a isoquercetina, a rutina, a quercitrina e a amentoflavona, representando de 2 a 4% do peso seco das partes aéreas [4,5]. Estudos têm demonstrado que a rutina, entre outros flavonóides, pode participar das propriedades antidepressivas observadas para *H. perforatum* [6,7]. Foi recentemente sugerido que a rutina poderia aumentar direta ou indiretamente a biodisponibilidade de outros constituintes de *Hypericum*, necessários para sua atividade biológica [7]. Além da contribuição dos flavonóides para o principal efeito farmacológico relatado para *H. perforatum*, estes metabólitos são de particular importância na dieta humana como antioxidantes, tendo sido relatado que seu consumo está associado à redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares [8]. A pesquisa sobre o metabolismo secundário de hipérico tem despertado interesse nos últimos anos devido à importância desta espécie na medicina natural. Alguns estudos têm utilizado a cultura de células e tecidos para avaliar a produção de várias moléculas de interesse medicinal [9,10]. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o conteúdo de flavonóides em diferentes estágios do desenvolvimento organogênico de plantas de hipérico, considerando desde células não diferenciadas até plantas regeneradas *in vitro*.

Material e métodos

A. Estabelecimento dos cultivos *in vitro*

Culturas de massas celulares foram estabelecidas e multiplicadas de acordo com o procedimento estabelecido por Pretto & Santarém [11], utilizando 4,6 μM de cinetina (KIN) e 0,45 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). As brotações adventícias *in vitro* foram obtidas cultivando massas celulares (0,5 cm) em meio de cultivo contendo sais e vitaminas MS

[12], sacarose (30 g L⁻¹), 0,45 μM de benziladenina (BA), 0,05 μM de ácido naftalenoacético (ANA). As partes aéreas desenvolvidas a partir das brotações adventícias foram enraizadas em meio de cultivo MS, suplementado com 4,9 μM de ácido indolbutírico (AIB), sacarose (30 g.L⁻¹), carvão ativado (3 g.L⁻¹). Todos os meios foram solidificados com Phytigel (3 g.L⁻¹). O pH dos meios foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 h, à temperatura de 26 \pm 2°C e irradiância de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plantas com sistema radicular bem desenvolvido foram aclimatadas segundo Pretto & Santarém [11].

B. Quantificação de flavonóides

Massas celulares, agregados de brotos adventícios, brotos alongados (cerca de 2,5 cm) e partes aéreas de plantas regeneradas (com aproximadamente 6 cm) de hipérico foram analisadas quanto ao seu conteúdo dos seguintes flavonóides: rutina, quercetina, quercitrina, apigenina e canferol. As amostras (1 g de massa seca) foram homogeneizadas manualmente em 10 mL de solução de metanol e água (80:20 v/v). Do extrato bruto, 5 mL foram filtrados através de membrana de 0,45 μm e, posteriormente, aplicados em colunas C₁₈ (Sep-Pack™, Waters Co.). A quantificação dos flavonóides glicosilados foi realizada a partir da hidrólise ácida das amostras em solução de HCl (1 M), a 50 °C, por 24 h (modificado de Crozier *et al.* [13]). Todos os extratos foram armazenados a -20 °C até a análise cromatográfica.

A quantificação de flavonóides foi realizada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no sistema Gilson (Gilson Medical Electronics, França), modelo 321, coluna fase reversa MetaSil ODS (5 μm ; 150 x 4,6 mm), utilizando detector UV/VIS, ajustado em 258 nm. O equipamento foi operado à temperatura ambiente (25 \pm 2°C) e os dados cromatográficos foram obtidos e processados pelo sistema Unipoint®. Os solventes utilizados foram 2% de ácido fosfórico em água (v/v) (eluente A) e acetonitrila (eluente B). O gradiente da fase móvel consistiu de 20 a 50% do eluente B de 0 a 25 min, 50 a 100% de B de 25 a 26 min, e 100% de B até 29 min. O fluxo foi mantido em 1 mL.min⁻¹. A identificação e quantificação dos flavonóides foram realizadas a partir de curvas de calibração, considerando-se os tempos de retenção e as

1. Biólogo, Endereço atual: Secretaria da Saúde, Prefeitura Municipal de Teutônia, Teutônia, RS.CEP 95890-000.

2. Professor Adjunto, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av: Ipiranga, 6681, Pd. 12C, Porto Alegre, RS, CEP 90619-900.E-mail: astarita@puers.br

3.Professora Adjunta, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av: Ipiranga, 6681, Pd. 12C, Porto Alegre, RS, CEP 90619-900. E-mail: esantarem@puers.br

Apoio financeiro: FAPERGS; CNPq

áreas dos picos dos padrões adquiridos comercialmente.

C. Análise estatística

As concentrações de flavonóides obtidas pela análise cromatográfica foram submetidas aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (Barlett). Após a normalização dos dados utilizando log (x+1), as variâncias foram analisadas (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de significância, com auxílio do programa estatístico SPSS v.11. Os dados de quantificação dos compostos analisados foram expressos em médias obtidas a partir de quatro leituras cromatográficas para cada tratamento.

Resultados

As análises cromatográficas demonstraram a presença dos flavonóides rutina, quercetina, quercitrina, apigenina e canferol em todos os estágios do processo organogênico, embora o conteúdo dos flavonóides tenha variado entre os tecidos amostrados (Tab. 1). De modo geral, apigenina, canferol e quercetina, livres e conjugados, foram encontrados em baixos níveis nos tecidos avaliados, com concentrações variando entre 0,01 e 0,12 mg.g⁻¹ MS, com exceção de quercetina glicosilada (3,18 mg.g⁻¹ MS).

A rutina, livre ou conjugada, foi encontrada em níveis significativamente mais elevados em plântulas quando comparados aos demais tecidos, atingindo concentrações de 7,5 a 9 vezes maiores do que as partes aéreas alongadas. Da mesma forma, os níveis de quercitrina e canferol livres nas plântulas foram significativamente superiores aos encontrados nas massas celulares e nos brotos. A quercitrina conjugada foi o flavonóide mais abundante em agregados de brotações adventícias e plântulas, atingindo as concentrações de 8,07 e 44,46 mg.g⁻¹ MS, respectivamente. A análise dos resultados obtidos sugere uma relação entre a síntese e/ou acúmulo destas moléculas e a diferenciação dos tecidos e crescimento das plântulas. Por outro lado, os níveis de quercetina e apigenina livres foram maiores nas massas celulares do que nas brotações e plântulas, demonstrando haver diferença entre o perfil de flavonóides dependendo da organização e diferenciação do tecido.

Discussão

Os flavonóides são moléculas abundantes em plantas de *Hypericum perforatum*, atingindo cerca de 4% da matéria seca de plantas coletadas no ambiente [14]. Os estudos da síntese e acúmulo de compostos do metabolismo secundário em sistemas *in vitro* têm demonstrado que, dependendo da molécula e do tecido estudados, a produção destes compostos pode diferir no sistema *in vitro* quando comparado às plantas *in vivo* [9]. No sistema organogênico de *H. perforatum*, foi observado que houve variação tanto no perfil dos flavonóides, quanto entre os tecidos avaliados. A rutina e a quercitrina livres foram os flavonóides encontrados em maior quantidade nas plântulas *in vitro* (4,76 e 0,56 mg.g⁻¹ MS, respectivamente), em comparação às massas celulares e aos brotos. Trabalhos anteriores sugerem que

o conteúdo de flavonóides está fortemente relacionado ao estágio de maturação de plantas de *H. perforatum*, tanto no cultivo *in vitro* quanto *in vivo* [15,16,17]. Por exemplo, em calos produzidos a partir de segmentos nodais de hipérico foi observado que o conteúdo de flavonóides totais foi muito menor do que as concentrações destes compostos encontradas nas plantas *in vivo* [5], que podem apresentar altos níveis de flavonóides como a rutina e a quercitrina (96 e 5,4 mg.g⁻¹ MS, respectivamente) [18].

Entre os flavonóides conjugados, a quercitrina foi o mais abundante (44,46 mg.g⁻¹ MS). Este resultado corrobora a hipótese de variação no perfil de flavonóides em plantas cultivadas *in vitro*, uma vez que estudos relatam que os flavonóides glicosilados mais frequentemente encontrados em maiores concentrações em plantas de hipérico são a quercetina e o canferol [19]. No ambiente natural, grande parte dos flavonóides encontrados nas plantas estão na forma conjugada [19] e apresentam como uma de suas funções, a proteção das plantas contra a radiação UV, representando uma estratégia de adaptação das plantas ao ambiente [8]. É possível que as características de baixa luminosidade e radiação características dos sistemas *in vitro* possam ser responsáveis pelos baixos níveis destas moléculas nas massas celulares e tecidos cultivados de *H. perforatum*.

Diferenças nos níveis de flavonóides observadas entre os resultados obtidos neste trabalho e outros que avaliaram células e tecidos *in vitro* podem ser decorrente do meio de cultivo utilizado para micropropagação, visto que a composição do meio, principalmente reguladores de crescimento, tem sido relatada como fator que influencia a produção de metabólitos *in vitro* [10].

Referências

- [1] ALAN, L. & MULLER, N.D. 1998. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): clinical effects on depression and other conditions. *Alternative Medicine Review* 3(1): 18-26.
- [2] BRISKIN, D. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. 2000. *Plant Physiology*, 124: 507-514.
- [3] SCHEMP, C.M. SIMON-HAARHAUS, B. & SIMON, J.C. 2002. Phototoxic and apoptosis-inducing capacity of pseudohypericin. *Planta Medica*, 68: 171-173.
- [4] BOMBARDELLI, E. & MORAZZONI, P. 1995. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia* 66: 43-60.
- [5] DIAS, A.C.P. et al. 1998. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 48: 1165-1168.
- [6] BUTTERWECK, V.; JURGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A. & WINTERHOFF, H. 2000. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica* 66: 3-6.
- [7] NÖLDNER, M. & SCHÖTZ, K. 2002. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Medica* 68: 577-580.
- [8] HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
- [9] KIRAKOSYAN, A. HAYASHI, H.; INOUE, K.; CHARCHOGLYAN, A. & VARDAPETYAN, H. 2000. Stimulation of production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry* 53: 345-348
- [10] GADZOVSKA, S. et al. 2005. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 591-603.
- [11] PRETTO, F.R.; SANTARÉM, E.R. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62: 107-113

- [12] MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- [13] CROZIER, A.; JENSEN, E.; LEAN, M. E. J.; MCDONALD, M. S. & BLACK, C. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 590-595.
- [14] WHEATLEY, D. 1998. *Hypericum* extract: potential in the treatment of depression. *CNS Drugs* 9(6): 431-440.
- [15] REPCÁK, M. & MARTONFI, P. 1997. The localization of secondary substances in *Hypericum perforatum* flower. *Biologia Bratislava* 52(1): 91-94.
- [16] WALKER, T. S.; BAIS, H. P. & VIVANCO, J. M. 2002. Jasmonic acid-induce hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St John's wort). *Phytochemistry*, 60:289-293.
- [17] SANTARÉM, E.R. & ASTARITA, L.V. 2003. Multiple shoot formation and hypericin determination in different in vitro tissues of *Hypericum perforatum*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15 (1): 43-47.
- [18] DINIZ, A.C.B.; ASTARITA, L.V. & SANTARÉM, E.R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. *Acta Botanica Brasílica, no prelo*.
- [19] SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R.; SIMONIC, M. & KNEZ, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89(2): 191-198.

Tabela 1. Níveis dos flavonóides rutina, quercitrina, quercetina, apigenina e canferol, livres e glicosilados, em diferentes tecidos de *Hypericum perforatum* L. cultivados *in vitro*.

	Flavonóides (mg.g ⁻¹ MS)*									
	Rutina		Quercitrina		Quercetina		Apigenina		Canferol	
	L**	C	L	C	L	C	L	C	L	C
Massas celulares	0,34 b	0,33 b	0,12 b	0,13 d	0,07 a	0,10 b	0,05 a	0,03 ab	0,05 b	0,07 a
Agregados de brotos adventícios	0,10 b	0,11 b	0,15 b	8,07 b	0,01 c	0,04 b	0,04 a	0,01 b	0,04 a	0,07 a
Brotos alongados (2,5 cm)	0,54 b	0,59 b	0,23 b	6,80 b	0,03 b	0,03 b	0,02 b	0,02 b	0,02 b	0,12 a
Partes aéreas (6 cm)	4,70 a	5,36 a	0,56 a	44,46 a	0,01 c	3,18 a	0,02 b	0,08 a	0,02 b	0,07 a

* Letras minúsculas iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

** L: Flavonóide livre; C: flavonóide conjugado.